

00528
87

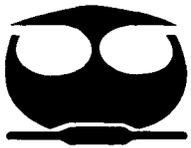


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE PEDIOCINA
EN UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
I SELA SOLÍS RIVERA



MÉXICO, D.F. EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2003



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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Raúl Aguilar Caballero
Vocal	Prof. María del Carmen Wachter Rodarte
Secretario	Prof. Edith Ponce Alquicira
1 er. Suplente	Prof. Alejandro Camacho Cruz
2do. Suplente	Prof. Gabriela Alatorre García

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio S-130 del Área de Bioquímica de Macromoléculas
departamento de Biotecnología. UAM - Iztapalapa

Asesor del tema:



Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesor técnico:



Dr. Marcelo Signorini

Sustentante:



Isela Solís Rivera

*A mis papás y mis hermanas,
por ser ustedes y por permitirme ser junto con ustedes
A Goyo, por el brillo*

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Isela Solís Rivera

FECHA: 07/02/03

FIRMA: 

Agradecimientos

A mis papás, por su amor, su guía, sus consejos, su apoyo incondicional, sus regaños, su comprensión, sus enseñanzas, su sinceridad, su confianza, su respeto hacia mis decisiones y mis actos, en fin, por darme el mejor regalo: la vida.

A mis hermanas Gaby y Claudi, por todo lo que hemos compartido, aprendido y construido juntas, por soñar conmigo y por mantener y estrechar día con día este maravilloso e inquebrantable lazo que nos une.

A Goyo, por enseñarme a ver a través de pequeñas cosas lo grandioso de la vida.

A mis amigas Evelyn, Sabyne y Chio, porque con ustedes aprendí que una verdadera amistad supera cualquier adversidad.

A la UNAM, por ser la máxima casa de estudios y permitirme ser parte de ésta.

A la Facultad de Química, por proporcionarme TODO lo necesario para poder alcanzar esta meta y por que durante cinco años te convertiste en mi verdadero segundo hogar.

A la UAM, por aceptarme y proporcionarme los medios necesarios para realizar esta tesis.

A mi asesora, Edith Ponce, por su ayuda, consejos, paciencia y sobretodo por confiar en mí y darme la oportunidad de ser parte de su maravilloso equipo de trabajo.

A mi asesor técnico, pero sobretodo al compañero de trabajo y amigo, Marcelo Signorini, por el tiempo que generosamente me brindaste, por tu ayuda desinteresada y por TODAS tus invaluable enseñanzas.

A los compañeros del laboratorio S130 de la UAM, por haber hecho tan agradable mi estancia en el laboratorio: Marielena, Magnali, Raquel S, Basy, Marcelo, Chio, Octavio, Elvia, Raquel G, Roberto, Edith, Cuauhtémoc, Ernesto, Silvia, Lulú, Isabel, Hugo, Marisol, Ruth, Conny y en particular a Julio, por tu ayuda y tus consejos.

A los compañeros de la Facultad de Química, especialmente a los de la carrera de Química de alimentos, por los momentos y las vivencias.

A todas aquellas personas que forman ya parte de mi vida y que por lo tanto -en mayor o en menor grado- han influido para que me convirtiera en lo que hasta ahora soy.

A

PAGINACION DISCONTINUA

Contenido

Resumen	IV
Introducción	1
1. Objetivos	2
2. Antecedentes	3
2.1. Generalidades	3
2.2. Películas comestibles	5
2.2.1 Clasificación de películas comestibles	6
2.3. Bacterias ácido-lácticas como microorganismos bioprotectores	11
2.4. Pediocina	18
3. Desarrollo experimental	23
3.1. Etapa I. Producción de recubrimientos	25
3.1.1 Preparación de soluciones de cloruro de calcio y alginato de sodio	25
3.1.2 Preparación de los recubrimientos	25
3.2. Etapa II. Producción de Pediocina	26
3.2.1 Determinación de parámetros óptimos de crecimiento de <i>P. parvulus</i> y para la producción de su pediocina	26
3.2.1.1 Ensayo de la actividad inhibitoria de Pediocina	27

3.2.2 Extracción de pediocina	28
3.2.2.1 Detección del intervalo de pH para la adsorción / desorción de la bacteriocina	28
3.2.2.2 Extracción de pediocina mediante adsorción y desorción	28
3.2.3 Correlación entre halo de inhibición y UA	29
3.3. Etapa III. Inmovilización de Pediocina en los recubrimientos	29
3.3.1 Determinación del pH óptimo para la actividad de la bacteriocina	29
3.3.2 Determinación de la estabilidad de pediocina en la matriz de alginato	29
3.4. Etapa IV. Aplicación de los recubrimientos con pediocina a productos cárnicos procesados	30
3.4.1 Evaluación de la capacidad inhibitoria de las películas formadas en las salchichas	31
3.5. Análisis estadístico	31
4. Resultados y discusión	32
4.1. Producción de recubrimientos	32
4.2. Producción de Pediocina	34
4.3. Extracción de Pediocina	36
4.3.1 Prueba de adsorción / desorción	36
4.3.2 Correlación entre halo de inhibición y UA	39
4.4. Aplicación de la pediocina a los recubrimientos de alginato	40

4.4.1 Determinación de la estabilidad de pediocina en la matriz de alginato	41
4.5. Aplicación de los recubrimientos con pediocina a productos cárnicos procesados	43
4.5.1 Evaluación de la capacidad inhibitoria de las películas formadas en las salchichas	43
4.5.1.1 Inhibición de <i>L. innocua</i>	43
4.5.1.2 Inhibición de <i>E. faecalis</i>	47
4.5.1.3 Medición de pH	51
5. Conclusiones	54
6. Bibliografía	55
Anexo 1. Medios de cultivo empleados	58
Anexo 2. Técnicas empleadas	60
Anexo 3. Resultados anexos	62
Anexo 4. Análisis estadísticos	63

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue formular un recubrimiento de alginato al que se le adicionó la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus*, como un método complementario para inhibir a *Listeria innocua* y *Enterococcus faecalis* y asegurar la calidad microbiológica de productos cárnicos.

Los recubrimientos se prepararon por gelificación de una suspensión estéril de alginato (0.5 a 2%) en presencia de iones calcio (CaCl_2 30-120 mM); evaluando diversas propiedades físicas y reológicas. Los recubrimientos con mejores características se obtuvieron al emplear 1.5% de alginato y 90mM de CaCl_2 .

Asimismo se evaluaron dos distintos medios de cultivo y temperaturas de crecimiento (TGE / 37° C y CGB / 40° C) para el crecimiento de *P. parvulus* y la producción de su pediocina. El medio y la temperatura en los que se obtuvo un mejor crecimiento de la bacteria y la mayor producción de su bacteriocina fue CGB a 40° C.

Adicionalmente para la extracción de la pediocina se empleó el método de adsorción / desorción, evaluando diferentes valores de pH de adsorción y de desorción; los mejores valores obtenidos fueron 5.5 y 1.0, respectivamente.

Una vez extraída la pediocina ésta se adicionó al alginato para la formación de recubrimientos activos que se aplicaron a la superficie de salchichas comerciales, con el fin de evaluar su capacidad inhibitoria sobre *L. innocua* y *E. faecalis*, así como la influencia de la carga inicial de estos microorganismos sensibles.

De este estudio se obtuvo que la pediocina es efectiva para la inhibición de ambas bacterias alterantes, observándose más claramente esta inhibición contra *E. faecalis*. También se observó la no influencia de la carga inicial del microorganismo sensible.

Por lo anterior se concluye que los recubrimientos activos elaborados a partir de alginato y la pediocina producida por *P. parvulus* MXVK 133 son efectivos para la inhibición de microorganismos alterantes de la carne y productos cárnicos y por lo tanto pueden emplearse como un método de preservación de éstos.

Introducción

La carne es uno de los alimentos más perecederos, susceptible de deterioro debido al ataque microbiano (Jay, 1994) y a cambios fisicoquímicos como pérdida de humedad, oxidación lipídica y degradación proteica (Martino, 2000).

Con el fin de disminuir la contaminación microbiana en la superficie de la carne, se han probado diferentes técnicas de preservación entre las que se encuentran el uso de bajas o altas temperaturas, la reducción de aa, la acidificación, la adición de agentes químicos como nitritos, o su utilización en conjunto dentro de la tecnología de barreras (Leistner y col., 1995).

Las bacteriocinas son péptidos producidos por algunas bacterias lácticas, diversos estudios han demostrado la efectividad de estos péptidos como inhibidores del desarrollo de microorganismos y por consiguiente como conservadores de la carne y sus productos (Ming y col., 1997; Cutter y col., 1997; Quintero., 2001).

La incorporación de agentes antimicrobianos en los recubrimientos comestibles proveen una barrera adicional al evitar o retardar el crecimiento de microorganismos (en especial de patógenos) en la superficie de la carne fresca o de productos cárnicos crudos y cocidos (Cutter y col., 1997).

Los objetivos del presente proyecto fueron, inmovilizar a la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* en un recubrimiento a base de alginato y evaluar su estabilidad durante el almacenamiento en refrigeración, con el fin de obtener un recubrimiento comestible que actúe como barrera contra el ambiente para evitar o disminuir el deterioro fisicoquímico y microbiológico de la carne.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

- Inmovilizar la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133 en un recubrimiento a base de alginato, evaluar la estabilidad de la misma en el sistema y probar su acción inhibitoria en un producto cárnico.

1.2. Objetivos específicos

- Extraer la Pediocina e incorporarla en el recubrimiento.
- Verificar la estabilidad de la bacteriocina inmovilizada en el gel de alginato en función del tiempo.
- Aplicar el recubrimiento a un producto cárnico y evaluar la inhibición sobre *Listeria innocua* y *Enterococcus faecalis*.

2. Antecedentes

2.1. Generalidades

La carne y sus productos procesados tienen un elevado contenido de humedad y nutrientes (Tabla 1) lo que permite el rápido desarrollo de una gran variedad de microorganismos.

Tabla 1. Composición química de músculo típico de los mamíferos después del *rigor mortis*

Nombre	Proporción (%)
Agua.....	75.5
Proteína.....	18.0
Grasa.....	2.0
Carbohidratos	
Ácido láctico.....	0.9
Glucosaósfato.....	0.17
Glucógeno.....	0.10
Glucosa.....	0.01
Inorgánicas	
Fósforo total soluble.....	0.20
Potasio.....	0.35
Sodio.....	0.05
Magnesio.....	0.02
Calcio.....	0.007
Zinc.....	0.005
Vitaminas.....	aprox 0.10

Fuente: Jay, J., 1994

Los géneros de bacterias, hongos y levaduras comúnmente encontrados en carne fresca y procesada se presentan en la Tabla 2. Las carnes frescas de res, cerdo, oveja, pescado y carnes procesadas, tienen un valor de pH que entra en el intervalo óptimo para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos listados. Adicionalmente, el contenido de humedad y de nutrientes son adecuados para permitir el crecimiento de una gran variedad de organismos (Jay, 1994).

• Tabla 2. Microorganismos más frecuentemente encontrados en carne fresca

Género	Carne fresca
Bacterias	
<i>Acinetobacter</i>	XX
<i>Aeromonas</i>	XX
<i>Enterococcus</i>	XX
<i>Escherichia</i>	X
<i>Listeria</i>	X
<i>Moraxella</i>	XX
<i>Pseudomonas</i>	XX
<i>Psychrobacter</i>	XX
<i>Staphylococcus</i>	X
Hongos	
<i>Cladosporium</i>	XX
<i>Geotrichum</i>	XX
<i>Mucor</i>	XX
<i>Rhizopus</i>	XX
<i>Sporotrichum</i>	XX
<i>Thamnidium</i>	XX
Levaduras	
<i>Candida</i>	XX
<i>Torulopsis</i>	XX

X = de ocurrencia conocida; XX = más frecuentemente reportado

Fuente: Jay, J., 1994

En México, la carne y productos cárnicos están frecuentemente expuestos a condiciones que promueven la proliferación de microorganismos de descomposición y patógenos; propiciadas por la falta de transporte adecuado, fallas en el sistema de refrigeración y malas prácticas

higiénicas durante su obtención y distribución; que conducen a una notable reducción en la vida de anaquel del producto, pérdidas económicas y riesgo para la salud de los consumidores.

Una manera efectiva de controlar la presencia de microorganismos en la carne fresca es mediante la implementación de buenas prácticas de manufactura e higiene, además del empleo de refrigeración, congelación, el empaque en películas comestibles y no comestibles, así como la bioconservación.

2.2. Películas comestibles

La calidad y la vida de anaquel de los alimentos se ven reducidas cuando, a través de la interacción con su ambiente, ganan o pierden humedad o aroma, entran en contacto con oxígeno (permitiendo el desarrollo de rancidez oxidativa de los lípidos) o llegan a ser contaminados con microorganismos. El empaque protege a los alimentos de su ambiente y del ataque microbiano.

Las películas comestibles se definen como una capa delgada de material comestible formado sobre el alimento como una película, o bien, una capa preformada en la que se coloca el alimento. Las funciones de dichas películas son inhibir la migración de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas, lípidos, etc. transportar aditivos (antioxidantes, antimicrobianos, saborizantes); mejorar las características mecánicas o de manejo de los alimentos, así como también restringir la entrada de microorganismos (Krochta y col., 1997).

Los factores que contribuyen al renovado interés en el desarrollo de películas comestibles incluyen la demanda por parte de los consumidores de alimentos de alta calidad, la necesidad por parte de los productores de alimentos de nuevas técnicas de almacenamiento; consideraciones de tipo ambiental sobre la disposición de materiales de empaque no renovable y oportunidades para el desarrollo de nuevos mercados dando valor agregado a desechos agrícolas (Gennadios y col., 1997).

Algunos beneficios potenciales en el uso de películas comestibles en carne y productos cárnicos son:

- (1) Disminución en la pérdida de humedad durante el almacenamiento.
- (2) Evitar el goteo, absorbiendo los jugos generados.
- (3) Disminución de la velocidad de rancidez (oxidación lipídica) y del deterioro en el color (oxidación de la mioglobina), por medio de la utilización de películas con baja permeabilidad al oxígeno.
- (4) Reducción de la incidencia de microorganismos esporulados y patógenos.
- (5) Restricción de la pérdida de compuestos volátiles y de la entrada de olores externos.
- (6) Producción de películas activas por medio de la adición de antioxidantes o agentes antimicrobianos.
- (7) Mejorar la calidad nutritiva de los alimentos empacados con películas aplicadas antes del empanizado y freído, reduciendo la absorción de aceite (Gennadios y col., 1997).

A continuación se menciona la clasificación de las películas y los materiales propuestos para el empaque de alimentos, dentro de los cuales se incluye el alginato y que son regulados por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA por sus siglas en inglés), con el fin de garantizar que sean seguros al estar en contacto con los alimentos (Kester y col., 1986). En México la Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA) es la dependencia encargada de regular este tipo de materiales.

2.2.1. Clasificación de películas comestibles

Las películas comestibles se clasifican en 3 grupos en función de su composición como:

a) Películas lipídicas

Debido a su relativa baja polaridad, la principal función de una película a base de lípidos es evitar la transferencia de agua. Dentro de los componentes lipídicos que han sido utilizados como películas protectoras se encuentran (Kester y col., 1986):

- Ceras, grasas y aceites
- Glicéridos y glicéridos acetilados

b) Películas proteicas

Las películas proteicas presentan valores relativamente altos de permeabilidad al vapor de agua y buenas propiedades como barreras contra el oxígeno en ambientes de humedad relativa baja. Dentro de los componentes empleados para la elaboración de estas películas se encuentran (Gennadios y col., 1997):

- Colágeno
- Gelatina
- Proteínas de leche
- Proteínas de cereales
- Proteínas de oleaginosas

c) Películas a base de polisacáridos

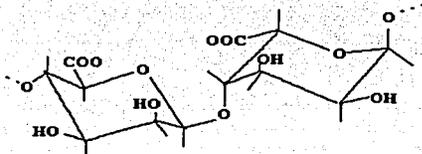
Una gran variedad de polisacáridos y sus derivados se han empleado como recubrimientos y películas comestibles. Debido a la naturaleza hidrofílica, estos polímeros presentan pocas propiedades como barreras contra la humedad. Sin embargo, ciertos polisacáridos usados en forma de recubrimientos gelificados de alta humedad retardan la pérdida de humedad de ciertos alimentos (por ejemplo carne y sus productos) durante el almacenamiento. En esta aplicación el recubrimiento gelificado pierde humedad antes que el alimento se deshidrate significativamente. Adicionalmente, debido a la relación inversa observada entre el vapor de agua y la permeabilidad del oxígeno, ciertas películas de polisacáridos pueden proveer una protección efectiva contra la oxidación de lípidos y otros componentes alimenticios (Kester y col., 1986).

Los principales polisacáridos empleados para la elaboración de recubrimientos o películas comestibles son: alginato, pectina, carragenina, almidón, almidones hidrolizados y derivados de celulosa.

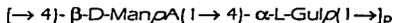
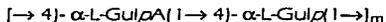
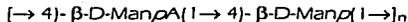
▪ Alginato

Los alginatos se extraen de las algas pardas de la clase *Phaeophyceae* como componentes de la pared celular. Las especies normalmente utilizadas para la obtención son: *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria* spp., *Ascophyllum* spp. y *Sargassum* spp. La extracción se lleva a cabo con álcalis. El polisacárido se precipita posteriormente del extracto como sal cálcica o como ácido alginico.

Los alginatos están constituidos por los ácidos β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G), unidos por enlaces (1 \rightarrow 4):

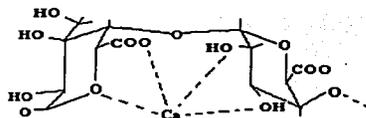


La proporción entre los dos restos suele ser aproximadamente 1:5 (ácido manurónico: ácido gulurónico), pero es variable dependiendo de la procedencia del polisacárido. En la molécula de polisacárido existen tres tipos de unidades estructurales:

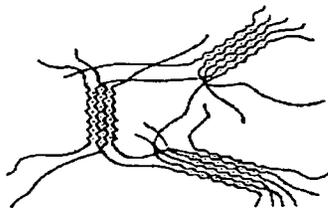


Las disoluciones de alginato sódico gelifican por adición de iones de calcio o por acidificación (Belitz, 1997). La fuerza de la película y su permeabilidad puede ser alterada por la concentración de los cationes polivalentes, la velocidad de su adición y el tiempo de exposición así como por el pH, la temperatura y la presencia de otros constituyentes (por ejemplo hidrocoloides).

El mecanismo de gelificación con calcio implica la asociación cooperativa de los segmentos poliméricos M y G para formar estructuras agregadas con los iones de calcio coordinados en los espacios intersticiales. El efecto de los iones de calcio es el de unir las cadenas de alginato por medio de interacciones iónicas, para la posterior formación de puentes de hidrógeno intercadenas (Kester y col., 1986).



(I)



(II)

Figura 1. Representación esquemática del gel de alginato cálcico. Cadena de alginato (restos de α -L-gulopiranosiluronato con enlace 1,4) (I), Entrecruzamiento por formación de "caja de huevo" (II). Fuente: Belitz, 1997.

Los segmentos de la cadena formados por residuos de ácidos manurónico y gulurónico alternados no interaccionan con el calcio, por el contrario, sirven para unir las estructuras agregadas, produciendo así una red gelificada tridimensional.

Existen dos métodos para la gelificación del alginato de sodio con calcio. En el primer método, los iones divalentes de calcio pueden ser liberados homogéneamente dentro de una solución de alginato para causar la gelificación uniforme. Esto se puede llevar a cabo por medio de la dispersión de una sal de calcio de baja solubilidad. Al tiempo que el calcio ionizado en solución interactúa con los polímeros de ácido alginico, éste se va solubilizando, resultando eventualmente en la formación de un gel homogéneo.

Alteraciones en el pH o la temperatura pueden utilizarse también para controlar la liberación de los iones de calcio hacia la suspensión de alginato. El segundo método de formación de geles de alginato implica la difusión de los iones de calcio en la solución de alginato. Cuando las soluciones de alginato y de calcio tienen contacto, se desarrolla instantáneamente un gel en la interfase. La completa gelificación ocurre cuando los iones de calcio difunden a través de la membrana interfacial del gel.

Muchas sales de calcio pueden ser utilizadas para formar geles de alginato incluyendo, cloruro, acetato, lactato, tartrato, gluconato, sulfato, citrato, y fosfato de di y tri de calcio; sin embargo, diversos estudios han demostrado que las sales de cloruro de calcio forman los geles más fuertes (Kester y col., 1986).

Estos mismos autores proponen que las películas y recubrimientos son impermeables a grasas y aceites, pero son pobres barreras contra la humedad, sin embargo, los recubrimientos de alginato gelificado pueden reducir significativamente la pérdida de humedad de los alimentos actuando por sacrificio (la humedad del recubrimiento se pierde antes de que el alimento se deshidrate significativamente). Las películas y recubrimientos de alginato son buenas barreras del oxígeno, pueden retardar la oxidación lipídica en alimentos y mejorar el sabor y la textura.

Tabla 3. Aplicaciones y funciones de recubrimientos comestibles a base de alginato

Aplicación	Función
Bistecques de res, chuletas de cerdo, pollo sin piel	Mejora de textura y barrera a la humedad
Pescado	Barrera contra la pérdida de humedad
Alimentos empanizados, alimentos en masa	Barrera contra la humedad, lípidos y oxígeno
Camarón congelado	Retención de sabor, color, textura
Helado	Eliminación de goteo
Paté de pollo precocido	Reducción del crecimiento microbiano
Piezas de res, bistecques	Barrera contra el oxígeno

Fuente: Krochta y col. 1997

La incorporación de agentes bactericidas o inhibidores de crecimiento en las formulaciones cárnicas tienen un efecto limitado en la flora superficial contaminante de la carne y sus productos. Además, la aplicación directa de agentes antimicrobianos en la superficie de la carne como ácidos orgánicos, derivados de especias, bacterias ácido lácticas y bacteriocinas como agentes antimicrobianos (Cutter y col., 1997), por inmersión o por aspersion, se ha demostrado que es ineficiente debido a la rápida difusión de los agentes bactericidas (Ouattara y col., 2000).

Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la incorporación de antimicrobianos grado alimenticio en las películas y recubrimientos comestibles puede proveer barreras adicionales para reducir la incidencia de bacterias patógenas y la germinación de las esporas en las superficies de la carne y productos cárnicos.

2.3. Bacterias acidolácticas como microorganismos bioprotectores

Las bacterias acidolácticas (BAL) juegan un papel esencial en los procesos de fermentación de alimentos. Alimentos crudos incluidos la leche, frutas, hortalizas y carne, son usualmente conservados por fermentación acidoláctica (Carolissen-Mackay y col., 1997).

Las BAL son bacterias gram positivas, no esporuladas, microaerofílicas cuyo principal producto de fermentación de carbohidratos es el lactato en el caso de las BAL homofermentativas. Las BAL abarcan tanto cocos (lactococos, vagicocos, leuconostoc, pediococos, aerococos,

tetragenococos, estreptococos, enterococos) como bacilos (lactobacilos, carnobacterium, bifidobacterium) (De Vuyst y col., 1994).

Las BAL se encuentran comúnmente en alimentos incluyendo carne fermentada, hortalizas, frutas, bebidas y productos lácteos, pero también se encuentran en los tractos respiratorio, intestinal y genital de humanos y animales, en aguas cloacales y en vegetales.

Las BAL especialmente los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* han sido tradicionalmente usados como cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos y bebidas debido a su contribución al desarrollo del sabor y aroma y la inhibición de microorganismos patógenos.

Los efectos nutricionales y terapéuticos de las BAL son diversos y de gran importancia, algunos de estos se mencionan a continuación:

- ❖ Desarrollo de la calidad nutricional de alimentos (por ejemplo: lisina para enriquecer cereales fermentados).
- ❖ Estimulación del metabolismo general por producción de vitaminas (ácido fólico) y enzimas (lactasa).
- ❖ Estabilización de la microflora intestinal, por medio de la exclusión de colonización de bacterias patógenas como son: *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *E. coli* enteropatógena, vía adhesión a la pared intestinal, competencia por nutrientes y especialmente por la estimulación del sistema inmune asociado al tracto gastrointestinal.
- ❖ Protección contra infecciones del tracto gastrointestinal y urinario, por ejemplo, por la activación del sistema de la lactoperoxidasa.
- ❖ Reducción del nivel de colesterol en el suero sanguíneo por la asimilación de colesterol, hidrólisis de sales biliares y/o modulación de la relación entre lipoproteínas de alta y baja densidad.
- ❖ Disminución en el riesgo de cáncer de colon por detoxificación de compuestos carcinogénicos y sustancias tóxicas, eliminación de factores antinutricionales (inhibidor de tripsina, glucosinolatos, ácido fitico, etc.) y modulación de enzimas fecales procarcinogénicas como son β -glucuronidasa, azoreductasa y nitroreductasa.

- ❖ Supresión de tumores vía estimulación específica del sistema inmune para producir macrófagos.

Las BAL pueden ser usadas como microorganismos industriales para la síntesis de farmacéuticos y otros productos útiles para humanos, ya que tienen muchas ventajas en fermentaciones industriales:

- ❖ Han sido ingeridos a través de la historia, lo cual implica que son no patógenas.
- ❖ La mayoría de estas bacterias no forman toxinas ni productos tóxicos.
- ❖ Son microaerófilos y aerotolerantes, requiriendo un proceso simple de fermentación.
- ❖ Crecen rápidamente, requiriendo un proceso corto de fermentación.
- ❖ Han sido utilizados en la industria alimenticia por años, implicando que ya existen métodos para su cultivo en gran escala.
- ❖ Pueden fermentar diversos sustratos baratos como son leche, suero, desechos de vegetales, almidón hidrolizado, etc.
- ❖ Su crecimiento disminuye la contaminación de otros microorganismos.
- ❖ Pueden secretar proteínas.

El efecto conservador de las BAL se debe a la generación de condiciones ácidas que crean en el alimento durante su desarrollo por la conversión fermentativa de carbohidratos a ácidos orgánicos (láctico, acético, etc), una característica importante que permite un incremento en la vida útil del producto final.

En décadas recientes, se ha establecido que la acción inhibitoria de las BAL es debida también a sistemas antagonicos más complejos. Las BAL son capaces de producir y excretar otras sustancias inhibitorias además de ácidos orgánicos. Estas sustancias son producidas en menor cantidad que el ácido láctico y el acético, e incluyen, ácido fórmico, ácidos grasos libres, amoniaco, etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetoina, 2-3 butanediol, acetaldehído, benzoato, bacteriocinas y antibióticos, así como muchas sustancias inhibitorias menos definidas o no completamente identificadas. Algunas de estas sustancias desarrollan actividad antagonica contra microorganismos que alteran alimentos y patógenos, incluyendo Lactobacilos psicrótrofos

Leuconostoc spp., *B. cereus*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, etc. (De Vuyst y col., 1994).

Las BAL fermentan los carbohidratos por diferentes vías metabólicas y durante este proceso se obtienen ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico y acético, que no son utilizados por las células y se excretan al exterior. Los ácidos orgánicos contribuyen al desarrollo del sabor, aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos alterantes. El mecanismo de inhibición se basa, en parte, en la entrada de los ácidos orgánicos no disociados a las células, una vez que se encuentran en su interior se efectúa la disociación molecular de los ácidos orgánicos en el citoplasma, lo cual da lugar a la aparición de protones (con la consecuente acidificación del medio) y aniones. Se produce un aumento en el gradiente de protones y las células tienden a transportarlos al exterior mediante bombeo activo de protones, para evitar la desnaturalización de las enzimas presentes en las estructuras celulares expuestas (pared celular, membrana y espacio periplásmico), pudiendo causar también desestabilización de la permeabilidad de la membrana e implicando un gasto de energía que lleva a la muerte celular.

Las BAL también producen peróxido de hidrógeno como mecanismo de protección frente al oxígeno, mediante la acción de oxidasas o NADH peroxidasas. El peróxido de hidrógeno se acumula en el medio de crecimiento debido a que las BAL no producen catalasa. La acción bactericida del peróxido de hidrógeno se atribuye a su efecto altamente oxidante, mediante peroxidación de los lípidos de la membrana y la destrucción de la estructura básica molecular de proteínas celulares.

El diacetilo (2,3-butanodiona) es un compuesto producido por bacterias lácticas fermentadoras del citrato. Posee un efecto antimicrobiano a elevadas concentraciones debido a que a bajas concentraciones puede ser metabolizado por algunos microorganismos. Su acción antimicrobiana es mayor frente a microorganismos Gram negativos, levaduras y hongos. El grupo α,α -dicarbonil de la molécula reacciona con la porción guanido del aminoácido arginina en enzimas microbianas (alcohol deshidrogenasa, adenilato ciclasa, glutamato deshidrogenasa, transcetolasa), desactivándolas por bloqueo o por modificación de la zona catalítica (Requena y col., 1995).

Las bacteriocinas son péptidos producidos por bacterias acidolácticas y otras bacterias Gram positivas. En general, estos péptidos bioactivos son catiónicos, anfipáticos, tienen estructuras de α -hélice y de lámina β , pueden ser ricos en tirosina o histidina y pueden presentar puentes disulfuro y tioéter o grupos tiol libres. La presencia de una estructura anfipática α -helicoidal con caras opuestas polares y no polares permite a los péptidos bioactivos interactuar con la fase acuosa y la lipídica de la superficie de una membrana biológica cuando se une a ésta (Ray y col., 2001).

En la Tabla 4 se presentan algunas bacteriocinas de diversos géneros y especies de bacterias acidolácticas que han sido aisladas hasta el momento.

Tabla 4. Algunas bacterias acidolácticas benéficas

Género	Especies, subespecies	Cepas conocidas como productoras de bacteriocinas
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	+
	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	+
	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis diaceylactis</i>	+
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>	+
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>	+
	<i>L. casei</i>	
	<i>L. delbrueckii</i>	
	ssp. <i>dulganicus</i>	
	<i>L. fermentum</i>	
	<i>L. helveticus</i>	
	<i>L. lactis</i>	
	<i>L. plantarum</i>	+
	<i>L. reuteri</i>	
	<i>L. sake</i>	+
	<i>L. curvatus</i>	+
	<i>L. mesenteroides</i>	
	Diversos ssp	+
	<i>L. lactis</i>	
<i>L. carnosum</i>	+	
<i>L. gelidum</i>	+	
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>	+
	<i>P. pernosceus</i>	+
	<i>P. parvulus</i>	+
<i>Tetragenococcus</i>	<i>T. halophilus</i>	+
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	+
	<i>E. faecium</i>	+
<i>Carnobacterium</i>	<i>C. piscicola</i>	+
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i>	+
	<i>B. infantis</i>	
	<i>B. adolescentis</i>	

Fuente: Ray y col., 2001

En general las bacteriocinas producidas por bacterias acidolácticas tienden a ser activas contra un amplio rango de bacterias Gram-positivas relacionadas filogenéticamente, aunque algunas se han reportado también como activas frente a bacterias Gram-negativas (Jack y col., 1995). Asimismo, algunas bacteriocinas inhiben a patógenos de los alimentos incluyendo *Clostridium botulinum*, *Bacillus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Carolissen-Mackay y col., 1997).

En la actualidad, más de 20 bacteriocinas de bacterias ácido lácticas han sido secuenciadas, muchas contienen menos de 60 aminoácidos y algunas están desprovistas de carbohidratos y lípidos. Las moléculas son catiónicas, hidrofóbicas y tienen puntos isoeléctricos que van desde 8.6 a 10.4.

Debido a su naturaleza hidrofóbica, estas moléculas presentan una tendencia a agregarse, especialmente cuando se almacenan en altas concentraciones o por largo tiempo. Su potencia antibacteriana es mayor a pHs bajos, son destruidas a pHs superiores a 10, relativamente estables al calor pero parcialmente destruidas por calentamiento superior a 100°C y no se afectan con el tratamiento con sustancias químicas orgánicas e inorgánicas (por ejemplo acetona, cloroformo, isopropanol, etilalcohol, hexano, acetonitrilo, EDTA, SDS, Tris y los iones como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^{+} y Na^{+}). Sin embargo, algunos aniones interfieren con la actividad dependiendo de su concentración (Ray y col., 2001). Debido a su naturaleza proteica, todas las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y α - quimotripsina) y algunas de origen gástrico (como la pepsina) siendo inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal sin ser absorbidas como compuestos activos (Requena y col., 1995).

Las bacteriocinas de bacterias acidolácticas usualmente sufren muy poca alteración estructural después de la traducción, considerándose así como péptidos traducidos ribosomalmente. En el nivel de traducción, la molécula designada como prebacteriocina (prenisina, prepediocina) contiene un péptido líder en el fragmento N-terminal y un propéptido en el fragmento C- terminal. Las moléculas son transportadas fuera del citoplasma a través de la membrana por una proteína transportadora ABC (dependiente de ATP) con gasto de energía. Durante el transporte, la actividad de endopeptidasa del transportador ABC remueve el péptido

lider antes de que el propéptido sea liberado al ambiente. Después de la liberación de la bacteriocina madura, ésta puede permanecer libre o puede unirse vía atracción electrostática a la superficie de la célula productora. Alrededor de pH 6, una gran fracción de moléculas permanecen en el estado adsorbido mientras que a un pH de 2 o por debajo de este, muchas bacteriocinas son liberadas al ambiente (Ray y col., 2001).

Los genes estructurales que codifican para prebacteriocinas pueden estar localizados en plásmidos (Pediocina PA-1 / AcH) o en el genoma de una bacteria hospedera (Sakacina P). En otros casos, los genes productores están codificados en copias de transposones integradas al genoma (Nisina).

Con base en diversas características químicas estructurales las bacteriocinas se han clasificado en diferentes grupos (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación de las bacteriocinas de bacterias acidolácticas

Conteniendo lantioninos	
Lantibióticos (clase I)	5 anillos tioéter (Nisina A) 3 anillos tioéter (Lacticina 8B) 2 anillos tioéter (Lactocina S)
Conteniendo cisteína	
Cistibiótico (Clase IIa; tipo- pediocina)	4 cisteínas con dos puentes disulfuro (Pediocina PA-1 / AcH) 2 cisteínas con 1 puente disulfuro (Leucocina A)
Tiolibiótico	1 cisteína (Lactococcina B) 2 cisteínas (Carnobacteriocina A)
Misceláneo	
No cisteínico	Lactococcina A
Dos péptidos	Lacticina F
Péptidos largos (> 30 kD)	Helveticina J

Fuente: Ray y col., 2001

Las bacteriocinas de las bacterias acidolácticas causan la pérdida de viabilidad en células Gram-positivas sensibles muy rápidamente y a una concentración relativamente baja (0.01 µg/mL).

La actividad bactericida de las bacteriocinas se atribuye a la desestabilización de las funciones de la membrana citoplásmica de las células blanco. Inicialmente las moléculas de bacteriocina se adsorben a la membrana, es entonces cuando forman poros transitorios permitiendo la pérdida del potencial de membrana. Ésto altera las propiedades de permeabilidad de la membrana y pequeñas moléculas escapan del citoplasma, los nutrientes no pueden ser transferidos del exterior al interior y el ATP no puede ser sintetizado. Estas pérdidas funcionales provocan la muerte celular.

Los factores que tienen una mayor influencia en el nivel de producción de una bacteriocina incluyen, la naturaleza de la cepa productora, la composición del medio de cultivo de crecimiento, la temperatura, el tiempo de crecimiento y el pH inicial y final.

2.4. PEDIOCINA

El término "pediocinas" se aplica a los péptidos antibacterianos sintetizados ribosomalmente o bacteriocinas producidas por ciertas cepas de especies que están comúnmente incluidas en el género *Pediococcus* (Ray y col., 2000).

El género *Pediococcus* incluye 8 especies. Las células son esféricas y se dividen en 2 planos para formar tétradas, sin embargo, células en pares pueden estar presentes en el cultivo, pero nunca en cadenas o como células sencillas. Son bacterias Gram positivas, no móviles, anaerobias facultativas y fermentativas homolácticas, con una temperatura óptima de crecimiento de 25 a 40°C. No producen gas pero algunas cepas pueden producir diacetilo o acetoina a partir de piruvato. Son catalasa negativo, pero algunas cepas pueden contener pseudocatalasa.

De las 8 especies de pediococos, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus* y *P. parvulus* están relacionadas filogenéticamente.

Tanto *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* se encuentran naturalmente en semillas, productos lácteos y vegetales. Están también asociadas con la fermentación natural y controlada de vegetales y carnes y como flora secundaria del queso. *P. parvulus*, *P. inopinatus* y *P. dextrinicus*

han sido aisladas de vegetales fermentados y *P. halophilous* ha sido encontrada en salsa de soya. También se ha encontrado que *P. damnosus* está implicada en la contaminación de la cerveza (Ray y col., 1994).

Desde 1960 se han estudiado diversas pediocinas producidas por distintas cepas de *Pediococcus pentosaceus* y de *Pediococcus acidilactici*, aisladas de diferentes fuentes. Las primeras en ser estudiadas fueron designadas como Pediocina PA-1 y Pediocina AcH, estudios posteriores revelaron que ambas pediocinas tenían la misma secuencia aminoacídica y nucleotídica, concluyendo, por tanto que la Pediocina AcH como la PA-1 son la misma por lo que se decidió nombrarla Pediocina PA-1/AcH. Posterior a este hallazgo se han estudiado muchas pediocinas, principalmente de *P. acidilactici* y todas tienen la misma secuencia que la Pediocina PA-1/AcH. Además de las cepas de *P. acidilactici*, dos cepas de *Pediococcus parvulus*, aisladas de vegetales, se encontraron que producían pediocinas y en un análisis se encontró que tenían una secuencia idéntica que la Pediocina PA-1/AcH (Ray y col., 2000).

Al igual que otras bacteriocinas de bacterias Gram-positivas de bajo peso molecular, la Pediocina PA-1/AcH inicialmente es traducida en el citoplasma como una prepediocina conteniendo 62 aminoácidos. A pesar de que la prepediocina tiene actividad bactericida, en el ambiente reducido del citoplasma, permanece inactiva debido a la inhabilidad de las cuatro cisteínas (en forma tiólica) de formar los dos puentes disulfuro que son indispensables para la actividad bactericida. Como las moléculas de prepediocina son sensibles a la acción hidrolítica de proteasas citoplásmicas, necesitan ser rápidamente transportadas a las proteínas *Pap C* y *Pap D* localizadas en la membrana citoplásmica por un transportador dependiente de ATP a través de la membrana. Un segmento de 18 aminoácidos en el fragmento N-terminal de la prepediocina, designada como péptido líder, ayuda en el reconocimiento del sistema de transportación específico. Durante la translocación por medio del transportador ABC *pap D*, el péptido líder es removido enzimáticamente a un sitio de unión doble de glicina ($\text{Glr}^2\text{-Glr}^1$). Una vez que la prepediocina cruza la membrana, los dos puentes disulfuro entre las cisteínas 9 y 14 y 24 y 44 se forman espontáneamente y la molécula se vuelve biológicamente activa al tiempo que es excretada al ambiente conteniendo 44 aminoácidos. La proteína de inmunidad *pap B* protege la membrana de las células productoras del ataque de las pediocinas del exterior, sin embargo este

mecanismo hasta el momento es desconocido. Una vez que la pediocina es liberada al ambiente puede permanecer electrostáticamente adsorbida a la superficie celular o puede pasar al ambiente dependiendo del pH. Con el tiempo, las enzimas proteolíticas, tanto las excretadas por las células como las liberadas después de la muerte celular o lisis, degradarán las moléculas de pediocina en el cultivo (Ray y col., 2000 y 2001).

La Pediocina PA-1/AcH forma poros transitorios en la membrana y provoca un colapso del potencial de membrana y fuerza motil protónica permitiendo la pérdida de iones de las células y en consecuencia la muerte celular. La formación de dichos poros no requiere una diferencia en el voltaje entre el exterior y el interior de la membrana, tampoco es necesaria la presencia de receptores específicos de proteínas en la membrana para la actividad de pediocina. Por el contrario, las moléculas catiónicas de pediocina se unen a los ácidos aniónicos lipoteicóicos y teicóicos en forma dependiente al pH en la pared celular de las células productoras y otras bacterias Gram-positivas. Sin embargo, el mecanismo de la acción bactericida de la Pediocina PA-1/AcH no está completamente entendido aún. Una hipótesis del mecanismo de acción puede ser la siguiente:

- La mitad N-terminal de la molécula adopta una conformación lámina β , probablemente después de su unión a la membrana, la cual es estabilizada por una unión S-S entre Cys 9 y Cys 14.
- Los aminoácidos catiónicos (Lys 11 e His 12) se unen a los fosfolípidos aniónicos en la membrana a través de interacciones electrostáticas.
- No es esencial un receptor de proteínas para que la pediocina se una, sin embargo podría ser que la presencia de este receptor mejore la acción de la pediocina.
- La mitad C-terminal puede tener también una conformación al azar en el ambiente acuoso, pero la unión S-S entre Cys 24 y Cys 44 y la conformación lámina β , pueden ayudar a transformarla en una estructura anfífilica α -helicoidal, entrando en contacto con la bicapa lipídica.
- Las moléculas de pediocina subsecuentemente se pegan en la membrana causando la formación del poro. Esto causa la disipación de la fuerza motriz protónica debido a el colapso del gradiente de pH y el potencial de membrana en una forma independiente al voltaje.

- La células pierden iones intracelulares, ATP y ya no pueden transportar aminoácidos y glucosa.
- Estos cambios finalmente provocan la muerte celular.

La molécula es catiónica debido a la presencia de 4 lisinas y 3 histidinas y tiene un punto isoeléctrico de 9.6. La carga neta varía con el pH del ambiente, especialmente en el intervalo ácido, debido a la histidina. La pediocina PA-1/AcH tiene 4 residuos de cisteína los cuales retienen el grupo tiol (SH) en un ambiente reducido, pero en un ambiente oxidado forman dos puentes disulfuro (-S-S-) entre -Cys9-Cys14- y -Cys24-Cys44-. Este estado oxidado es esencial para las propiedades bactericidas de la pediocina. En el fragmento N-terminal se encuentran 5 aminoácidos, -Tyr3, Gly 4, Asn 5, Gly 6 y Val 7 (-YGNGV-) los cuales se han encontrado en todas las bacteriocinas de la familia de las pediocinas y son importantes para la actividad bactericida.

La molécula es hidrofóbica debido a la presencia de un número relativamente alto de aminoácidos no polares. La mitad N-terminal es proporcionalmente más hidrofílica que la mitad C-terminal de la molécula. Debido a su naturaleza hidrofóbica las moléculas tienden a agregarse, especialmente en un estado concentrado y a un pH por debajo de 6.

A continuación se describe la influencia de diversos factores en las propiedades bactericidas de la Pediocina PA-1/AcH (Ray y col., 2000).

1. Enzimas. Siendo un péptido, las pediocinas como otras bacteriocinas de bacterias Gram - positivas, son hidrolizadas por enzimas proteolíticas y pierden su actividad bactericida. Las pediocinas en general, son sensibles a quimotripsina, tripsina, ficina, papaína y proteasas: (IV, IX, X, XIV, XV y XIX). En general, no son sensibles a lipasas, amilasas, RNAsas o DNAsas.
2. Calor. El efecto bactericida de las pediocinas de cepas de *P. acidilactici* más estudiadas permanece estable después del calentamiento a 80° C por 60 minutos. La inactivación parcial ocurre posterior al calentamiento a 121° C por 15 minutos.
3. pH. Las pediocinas de cepas de *P. acidilactici* retienen su actividad bactericida en un intervalo de pH entre 3 a 9. A valores más elevados de pH, la Pediocina PA-1/AcH pierde su actividad después de almacenarla a 25° C a pH 10.0 por 24 horas. En general las bacteriocinas son estables a valores bajos de pH.

4. Solventes orgánicos y químicos. La Pediocina PA-1/AcH retiene completamente su actividad después de su exposición a diversos químicos orgánicos, por ejemplo, acetona (100%), cloroformo (40%), isopropanol (80%), etilalcohol (80%), hexano (80%), acetonitrilo (70%), EDTA (10mM), SDS (1%) y Tris (0.6M).
5. Iones. Los cationes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^{+} y Na^{+} no reducen la actividad bactericida de la Pediocina PA-1/AcH. En contraste, los aniones (especialmente Cl^{-} y $(\text{PO}_4)^{3-}$) reducen en gran medida su eficiencia bactericida. Sin embargo, este efecto depende de las concentraciones relativas de la pediocina y de los aniones.
6. Tiempo de almacenamiento y temperatura. La Pediocina PA-1/AcH en cultivo y en preparaciones parcial y completamente purificadas, en estado líquido y seco, retiene completamente su actividad a -20°C y menor temperatura por más de 6 meses.

En el Área de Bioquímica de Macromoléculas del departamento de Biotecnología de la UAM Iztapalapa, se han efectuado estudios de la Pediocina producida por *P. parvulus* MXVK 133. Esta cepa fue obtenida a partir de muestras de salchichas frescas y cedida generosamente por el Dr. Victor Kuri de la Universidad de Queen's Belfast, Irlanda del Norte, Reino Unido.

Las propiedades fisicoquímicas y biológicas evaluadas se resumen a continuación. El extracto crudo mostró una actividad bactericida contra varias cepas de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Listeria*. La esterilización reduce considerablemente la actividad bactericida, pero se mantiene completamente cuando se somete a pasteurización y en almacenamiento a temperaturas de refrigeración o de congelación por más de uno y cuatro meses respectivamente. La actividad tampoco se ve reducida cuando al extracto de pediocina se le somete a valores de pH en el intervalo de 4.5 a 10 durante 24 horas almacenado a 4°C . Finalmente, el peso molecular aparente obtenido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS-Tricina es de 4.2 kDa. Por lo tanto, la pediocina producida por *P. parvulus* MXVK 133 presenta propiedades similares a la pediocina PA-1/AcH (Hernández, 2002). Los estudios para determinar la secuencia aminoácídica y nucleotídica para la completa identificación de la Pediocina producida por *P. parvulus* MXVK 133 se están llevando a cabo en estos momentos.

3. Desarrollo experimental

La metodología para la determinación de la estabilidad de Pediocina en recubrimientos realizados a base de alginato se llevó a cabo en 4 etapas:

- I. Producción de recubrimientos. Determinación de proporciones y concentraciones óptimas de cloruro de calcio y alginato de sodio para la elaboración de los recubrimientos.
- II. Producción de Pediocina. Determinación de los parámetros óptimos para el crecimiento de *P. parvulus* y para la producción de su pediocina (medios de cultivo y temperaturas de incubación). Extracción de Pediocina. Evaluación de la actividad inhibitoria de la pediocina. Determinación de Unidades de actividad (UA) de la pediocina.
- III. Aplicación de la pediocina a los recubrimientos. Determinación de la concentración y proporciones adecuadas de pediocina y alginato de sodio para la elaboración de los recubrimientos activos. Determinación de la estabilidad de la pediocina dentro de la matriz de alginato.
- IV. Aplicación de los recubrimientos con pediocina a salchichas inoculadas con 2 diferentes bacterias (*Listeria innocua* y *Enterococcus faecalis*). Evaluar la posible inhibición de crecimiento de dichas bacterias.

En el diagrama general se encuentra esquematizada la metodología llevada a cabo (Figura 2).

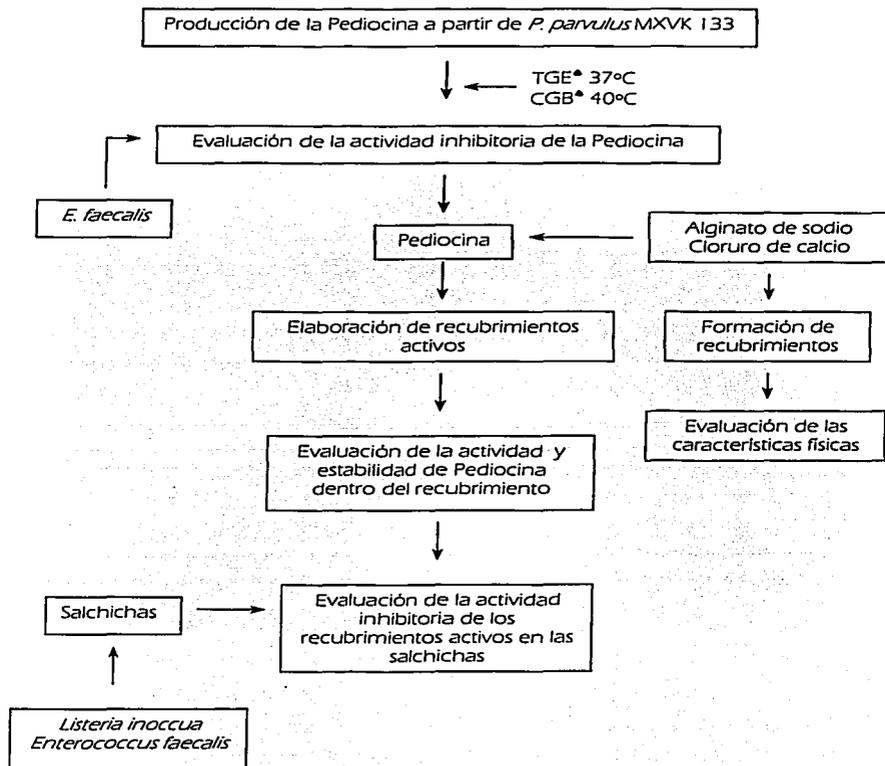


Figura 2. Diagrama general del desarrollo experimental.

* Medios de cultivo empleados para el crecimiento de *P. parvulus* y para la producción de su pediocina

3.1. Etapa I. Producción de recubrimientos

3.1.1 Preparación de soluciones de cloruro de calcio y alginato de sodio

Se prepararon 4 soluciones de alginato de sodio (SIGMA, San Luis, EUA) con una concentración de: 0,5, 1, 1,5 y 2 %, calentando hasta la completa disolución para las concentraciones 1,5 y 2%. Asimismo se prepararon 5 soluciones de cloruro de calcio (J.T. Baker, Xalostoc, México) con una concentración de 30, 60, 80, 90 y 120 mM. Todas las soluciones se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.1.2 Preparación de los recubrimientos

Se realizaron diversos recubrimientos, primero variando la concentración de alginato y dejando constante la de cloruro de calcio en 90mM. Una vez que se obtuvo el recubrimiento con mejores características de color, maleabilidad, grosor y suavidad, se elaboraron recubrimientos probando las distintas concentraciones de cloruro de calcio.

Los recubrimientos se elaboraron de la siguiente manera: en una superficie plana de geometría cuadrada con un área de aproximadamente 30 cm², se vació el cloruro de calcio y sobre éste con probeta, se adicionó el alginato, agitando el molde durante la adición. Se permitía la formación de la película a temperatura ambiente variando el tiempo de formación de las películas desde 17 a 24 horas dependiendo de la concentración de los reactivos.

Se evaluaron las características reológicas mediante la prueba de esfuerzo constante empleando un Reómetro Bohlin CVO 50 (Bohlin Instruments, Nueva Jersey, EUA). Mediante esta prueba el material es sujeto a un esfuerzo instantáneo y se observa la deformación producida a través del tiempo. El reómetro fue equipado con una geometría de platos planos paralelos de 25 mm de diámetro, utilizando un espacio entre planos de 1 mm. Las muestras fueron colocadas entre los platos y sometidas a una esfuerzo oscilatorio máximo de 100 Pas, a 25°C. Los datos fueron colectados durante 120 segundos. El desarrollo del recubrimiento fue estudiado en tiempo real mediante la medición de viscosidad (η), elasticidad al aplicar una fuerza constante (J_{oc}) y recuperación al eliminar la fuerza aplicada (J_{or}). Para cada uno de los recubrimientos este procedimiento se realizó por triplicado.

3.2. Etapa II. Producción de Pediocina

Para el cumplimiento de esta sección se emplearon las siguientes cepas bacterianas:

- a) Cepa productora de pediocina: *Pediococcus parvulus* MXVK 133.
- b) Cepa sensible a pediocina: *Enterococcus faecalis* MXVK 22.

Ambas cepas se conservaron en medio de cultivo sólido MRS (Difco, Detroit, EUA) almacenado a 4° C. Antes de realizar cualquier prueba, las cepas fueron reactivadas en medio MRS líquido. Para el caso de la cepa sensible, se realizaron dos resiembras, la primera por 18 horas (D.O = 1.15) en 10 mL de medio y la segunda tomando 1 mL de la primera y colocándolo en 9 mL de medio por 2 horas, ambas incubadas a 37°C. Para la cepa productora se colocó una asada en medio líquido incubada a 37°C por 12 horas.

3.2.1 Determinación de parámetros óptimos de crecimiento de *P. parvulus* y para la producción de su pediocina

Para tal efecto, se realizaron cinéticas de crecimiento probando dos medios de cultivo y temperaturas de crecimiento diferentes, TGE a 37° C (Ver Anexo 1, Tabla 1) y CGB a 40° C (Ver Anexo 1, Tabla 2).

Para la elaboración de las curvas, se inocularon los medios de cultivo por evaluar con un inóculo al 1% de la cepa productora reactivada. Una vez inoculados se agitaron y se dejaron en incubación a la temperatura correspondiente por 24 horas, se midió el crecimiento microbiano mediante la densidad óptica (DO) del cultivo a 660nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Beckman Fullerton, EUA) y el pH utilizando un potenciómetro Beckman (Beckman, Fullerton, EUA). Una vez determinados ambos parámetros cada muestra se sometió a un tratamiento térmico a 70° C por 30 minutos, para inactivar células y proteasas. Finalmente se efectuó el ensayo de actividad inhibitoria de cada uno de los tubos muestreados, el cual se llevó a cabo mediante el método de difusión en placas de agar (ver Desarrollo experimental 3.2.1.1. Ensayo de la actividad inhibitoria de pediocina) (Bhunia y col, 1988) (Ver Anexo 2, Figura 1).

3.2.1.1 Ensayo de la actividad inhibitoria de Pediocina

Se llevó a cabo mediante el método de difusión en placas de agar (Bhunia y col, 1988), el cual se indica a continuación (Ver Anexo 1, Figura 1). Este ensayo se realizó con el objetivo de evaluar la posible actividad de la pediocina producida por *P. parvulus* y la sensibilidad de *E. faecalis* frente a dicha pediocina.

a) Preparación del extracto libre de células de la cepa productora

Después del tratamiento térmico (70° C / 30 minutos), el pH del cultivo se ajustó a 1 con HCl 1N. Posteriormente se agitó en parrilla de agitación a la mínima velocidad durante dos horas a 4° C para permitir la completa desorción de la pediocina de la pared celular de la bacteria, para después separar las células por centrifugación utilizando una centrifuga IEC International (Needham Height MA. EUA) a 4437 g (4200 rpm) por 15 minutos a 4° C. Las células se descartaron y el pH del sobrenadante conteniendo la pediocina se ajustó a 6 con NaOH 1N. Finalmente el sobrenadante se esterilizó por filtración con membrana de 0.2 µm de diámetro de poro (Millipore, Durapore, Ireland).

b) Preparación de la cepa sensible

Se tomaron 100 µL del cultivo de la cepa sensible reactivada y se transfirieron a 9.9 mL de solución salina estéril (dilución 10⁻²) y de este último se tomaron 70 µL y se colocaron en 10 mL de medio MRS conteniendo 0.8% de agar bacteriológico (agar suave).

c) Preparación de cajas

Se adicionaron 10 mL de medio MRS con agar bacteriológico al 1.5% (agar base) en una caja petri estéril, se dejó solidificar en refrigeración durante una hora. Sobre esta capa, se adicionaron 10 mL del agar suave previamente inoculado con la bacteria sensible, se dejó solidificar y se refrigeró por una hora. Transcurrido este tiempo se realizaron pozos en la capa de agar superior con la base de una pipeta pasteur estéril (5 mm de diámetro). En cada uno de los pozos se colocaron 40 µL del extracto libre de células al que se le evaluó la actividad de pediocina. Se incubó a 37° C por 18 horas y se evaluó la actividad de pediocina midiendo los halos de inhibición producidos, con ayuda de vernier.

3.2.2 Extracción de Pediocina

Se utilizó la técnica basada en el principio de adsorción / desorción dependiente del pH, la cual ha sido exitosamente utilizada en la extracción de diversas bacteriocinas asociadas a la célula en grandes cantidades y en forma relativamente pura (Daba y col., 1994).

3.2.2.1 Detección del intervalo de pH para la adsorción / desorción de la bacteriocina

Antes de realizar la extracción de la pediocina se realizaron pruebas para determinar el mejor pH de adsorción y el de desorción. Para la realización de dichas pruebas, se reactivó la cepa productora en medio CGB líquido a 40°C por 12 horas. Se inocularon al 1% 9 matraces conteniendo 100 mL de caldo CGB. Se incubó a 40°C por 12 horas. Después de este tiempo los matraces conteniendo el cultivo de *P. parvulus* se sometieron a tratamiento térmico a 70°C por 30 minutos para posteriormente ajustarles el pH. Los valores de pH evaluados fueron: 1, 2, 3, 4, 5, 5.5, 6, 6.5 y 7, y se dejaron en agitación lenta a 4°C por dos horas. Posteriormente se centrifugaron por separado a 4437 *g* por 15 minutos a 4°C. A los sobrenadantes obtenidos se les ajustó el pH a 6 y se filtraron en membrana de 0.2 µm de diámetro de poro (Millipore). Por otra parte las células se resuspendieron en 5mL de agua destilada estéril con agitación. A los nueve sobrenadantes y sus respectivas células se les midió actividad de bacteriocina (apartado 3.2.1.1).

3.2.2.2 Extracción de pediocina mediante adsorción y desorción (Ver Anexo 2, Figura 2)

Luego de activar la cepa productora se tomó un inóculo al 1% y se colocó en el medio CGB líquido contenido en matraces, el cual se incubó a 40°C por 12 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se aplicó un tratamiento térmico a 70°C por 30 minutos, posteriormente se les ajustó el pH a 5,5 para permitir la adsorción de la pediocina a la pared celular bacteriana y se dejaron en agitación lenta por dos horas a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 4437 *g* por 15 minutos a 4°C. A las células se les dieron dos lavados centrifugando a 4437 *g* a 4°C con 50 mL de amortiguador de fosfatos 25 mM pH 6.5. El pellet obtenido tras el segundo lavado, conteniendo las células con la pediocina se resuspendieron en 100 mL de una solución de cloruro de sodio 100 mM pH 1 y se dejó en agitación suave por dos horas a 4°C promoviendo así la completa desorción de la pediocina de la pared celular. Posteriormente se centrifugó a 4437 *g* por 15 minutos a 4°C. Al sobrenadante obtenido conteniendo la pediocina se le midió la actividad.

El extracto de Pediocina obtenido fue el que se utilizó para realizar las pruebas restantes del desarrollo experimental (Etapas III y IV).

3.2.3 Correlación entre halo de inhibición y Unidades de actividad (UA)

Con el fin de conocer las UA a partir de los halos de inhibición determinados en cualquier prueba de actividad se realizó esta curva de correlación. A partir del extracto de Pediocina obtenido (sobrenadante obtenido en 3.2.2.2) se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:20, etc.) con amortiguador de fosfatos 25 mM pH 6. Porciones de 40 μ L de cada una de las diluciones por duplicado fueron colocadas sobre placas de CGB y dichas placas incubadas en estufa a 37° C por 18 horas y examinadas las zonas de inhibición de crecimiento (Apartado 3.2.1.1. Yang, 1994).

Las Unidades de actividad (UA) mL⁻¹ de cada una de las diluciones en las placas de CGB fueron calculadas multiplicando el inverso de la mayor dilución que dio un halo de inhibición de 2 mm por el factor de dilución que en este caso correspondió a 25 (1000 μ L / 40 μ L) (Yang y col., 1994; Bhunia y col., 1988).

3.3. Etapa III. Inmovilización de Pediocina a los recubrimientos de alginato

La solución de alginato (1.5%) y pediocina se gelificó en forma de esferas, dejando gotear la solución de alginato en una de cloruro de calcio (90 mM) .

3.3.1 Determinación del pH óptimo para la actividad de la bacteriocina

El pH de la solución de bacteriocina se ajustó a 3, 4.41, 5.89, 6.15, 6.46 y 7.1, se adicionó al alginato y se formaron diferentes esferas a las cuales se les evaluó la actividad inhibitoria después de 0, 4, 6 y 10 días.

3.3.2 Determinación de la estabilidad de pediocina en la matriz de alginato

Una vez elegido el pH óptimo de la pediocina se evaluaron diferentes concentraciones de ésta para ser mezclados con el alginato. Dichas concentraciones fueron 112.5, 75, 56.25, 37.5, 18.75, 7.5 UA. Con estas concentraciones se realizaron esferas de alginato, las cuales se conservaron a 4° C en cajas petri de vidrio selladas con parafilm, evaluándoles su capacidad

inhibitoria durante 19 días, siguiendo el mismo procedimiento que en 3.2.1.1, colocando las esferas directamente sobre las capas de agar. Después de 18 horas de incubación a 37° C se midió el halo de inhibición de crecimiento producido.

3.4. Etapa IV. Aplicación de los recubrimientos con pediocina a productos cárnicos procesados

Para medir la capacidad de inhibición de la Pediocina dentro de los recubrimientos sobre las salchichas se utilizaron las siguientes microorganismos indicadores:

- a) *Listeria innocua* ATCC 33090
- b) *Enterococcus faecalis* MXVK 22

L. innocua fue conservada a -80° C en una mezcla de medio de caldo de soja y tripticasaina (TSB, Difco, Detroit, EUA) y glicerol al 20%. Antes de la realización de las pruebas, las cepas fueron reactivadas en medio TSB (Difco) a 30-32° C por 18 horas (D.O = 0.5) para *L. innocua*. La reactivación de *E. faecalis* se realizó como se había indicado anteriormente (Apartado 3.2).

De cada una de estas cepas se evaluaron dos diferentes diluciones bacterianas, 1:100 y 1:10, preparadas con agua peptonada (0.1%) estéril.

Se utilizaron salchichas de cerdo tipo viena empacadas (presentación de 200g) Marca FUD, cortadas en trozos de 10 gramos cada uno, trabajando en campana de flujo laminar y con cuchillo estéril.

Con ayuda de clips estériles, se inocularon 10 gramos de salchichas con las dos diferentes bacterias, sumergiendo los trozos en las diluciones bacterianas (D.O = 0.04 para la dilución 1:100 y D.O = 0.1 para la dilución 1:10) durante 10 minutos, para después drenar por 30 segundos. Posteriormente se sumergieron en la solución de alginato y pediocina durante un minuto. Se dejaron escurrir por 30 segundos y transcurrido este tiempo, las salchichas se transfirieron a la solución de cloruro de calcio, en donde permanecieron por un minuto. Se escurrieron y se colocaron en refrigeración para permitir la completa formación de la película. Una vez formada

ésta (aproximadamente después de 4 horas), las salchichas se guardaron en bolsas de plástico y se almacenaron a 4° C. Para las salchichas control, se siguió el mismo procedimiento, utilizando alginato estéril sin pediocina. Todo este proceso se llevó a cabo por cuadruplicado.

3.4.1 Evaluación de la capacidad inhibitoria de las películas formadas en las salchichas

Cada tercer día durante 10 días se homogenizaron los 10 gramos de salchicha recubierta con 90 mL de agua destilada estéril en una licuadora casera estéril (Oster, Bartlesville, EUA) a máxima velocidad durante 30 segundos. A partir de esta dilución (10^{-1}) se realizaron diluciones seriadas empleando agua destilada estéril como diluyente.

En cada uno de los muestreos, se midió el pH de la dilución 10^{-1} en un potenciómetro Beckman (Beckman, Fullerton, EUA).

Para realizar los conteos microbianos se inocularon por duplicado 0.1 mL de las diluciones pertinentes en la superficies de los medios de cultivo empleados (para *L. innocua* agar selectivo PALCAM-Listeria y suplementos PALCAM-Listeria, Merck, Alemania, y para *E. faecalis* medio KF, ver composición en Anexo 1, Tabla 3), esparciendo el inóculo con varillas de vidrio estériles, dejando incubar el tiempo y a la temperatura óptimas para cada una de las bacterias empleadas (30-32°C por 48 horas para *L. innocua* y 37°C por 48 horas para *E. faecalis*).

Adicionalmente se realizó el conteo de mesófilos aerobios totales, llevando a cabo el procedimiento arriba descrito utilizando agar nutritivo (BIOXON, Dickinson, México) como medio de crecimiento, incubando a 37°C durante 48 horas.

3.5. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos por duplicado y cuadruplicado se analizaron en el paquete estadístico SPSS versión 8.0 mediante un modelo lineal de covarianza y ANOVA, así como una prueba de Duncan para la comparación múltiple de medias.

4. Resultados y discusión

4.1. Producción de recubrimientos

Se prepararon dos tipos de películas, una variando la concentración de alginato y otra variando la concentración de calcio. Se evaluó el color, el grosor, la suavidad y la maleabilidad y con base en estas propiedades elegir la concentración de alginato y calcio con las que se obtenían las mejores películas. Las características físicas de las películas elaboradas variando las concentraciones de alginato y las de cloruro de calcio se presentan en las tablas 6 y 8 respectivamente.

Tabla 6. Características de las películas formadas, utilizando como variable la concentración de alginato.

Concentración de CaCl_2 (mM)	Concentración de alginato (%)	Características de las películas
90	0.5	No se formó
90	1.0	Opaca, delgada, flexible, suave
90	1.5	Opaca, gruesa, flexible, suave
90	2.0	Muy opaca, gruesa, dura, poco flexible

Con base en los resultados de esta tabla, se observa que las mejores películas se obtenían con las concentraciones de alginato de 1.0 y 1.5%, ya que con 0.5% de alginato la película no llegó a formarse completamente, mientras que con 2.0% la película formada era poco flexible, gruesa, opaca y dura.

Visualmente las características evaluadas de las películas elaboradas con 1.0 y 1.5 % de alginato fueron muy parecidas. Posteriormente a estas películas se les determinaron las características de viscosidad (η), elasticidad en la muestra al aplicarle una fuerza constante (J_{oc}) y la recuperación al eliminar la fuerza aplicada (J_{or}). Las características de resistencia evaluadas se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Características de resistencia de los recubrimientos elaborados.

Conc. CaCl ₂ (mM)	Conc. Alginato (%)	η (Pa/s)	J _{OC} (1/Pa)	J _{OR} (1/Pa)
90	1.0	$8.77 \cdot 10^3$	$1.17 \cdot 10^4$	$2.70 \cdot 10^3$
90	1.5	$6.98 \cdot 10^4$	$1.98 \cdot 10^4$	$3.19 \cdot 10^3$

De esta tabla se observa que la concentración con la cual se obtiene reológicamente la mejor película es 1.5% de alginato, debido a que la viscosidad es menor, presenta una mayor elasticidad lo cual implica que la película se deforma para impedir su ruptura y adicionalmente a esta gran deformación su capacidad de recuperación también es mayor.

Tabla 8. Características de las películas formadas, utilizando como variable la concentración de CaCl₂.

Concentración de CaCl ₂ (mM)	Concentración de alginato (%)	Características de las películas
30	1.5	No hubo formación
60	1.5	Opaca, grosor medio, muy poco flexible (fácilmente rompible), muy suave
80	1.5	Opaca, delgada, flexible, muy suave
90	1.5	Opaca, delgada, flexible, suave
120	1.5	Opaca, gruesa, poco flexible, dura

Con base en esta tabla se deduce que la mejor concentración de calcio es 90mM, ya que con concentraciones menores las películas eran muy débiles y se rompían con el menor esfuerzo y con una concentración mayor a 90mM, la película formada era muy dura y por lo tanto muy poco flexible.

Las concentraciones de calcio y alginato elegidas coinciden con lo citado por Siragusa y col. (1992) y Cutter y col. (1997).

4.2. Producción de Pediocina

El crecimiento de *P. parvulus* y la producción de su bacteriocina se llevaron a cabo evaluando dos diferentes medios de cultivo y temperaturas a diferentes tiempos durante 24 horas. El primer medio de cultivo evaluado fue el medio TGE a 37°C mientras que el segundo medio evaluado fue el CGB a 40°C, el cual muestra la misma composición base del medio TGE pero con citrato de amonio y fosfato de sodio dibásico como amortiguadores con una mayor cantidad de triptona y menor cantidad de glucosa y extracto de levadura (Ver Anexo 1, Tabla 1 y 2). Para evaluar la capacidad inhibitoria de la pediocina producida por *P. parvulus* se utilizó la cepa de *E. faecalis* MXVK 22 como microorganismo indicador.

En la figura 5 se observa que para el medio de cultivo CGB la producción de pediocina estuvo directamente relacionada con el crecimiento, no observándose tan claramente para el medio TGE. En el medio TGE, la producción de la pediocina se observó durante toda la fase estacionaria mientras que para el medio CGB la producción se pudo observar desde la fase exponencial y durante toda la fase estacionaria de crecimiento. Cuando *P. parvulus* creció en medio TGE a 37°C la mayor actividad de pediocina se observó a las 16 horas mientras que en medio CGB a 40°C se obtuvo a las 12 horas y en general durante toda la fase estacionaria de crecimiento.

Contrario a lo citado por Ray y colaboradores en diversos estudios (1994, 2000 y 2001) en donde se establece que la pediocina PA-1/AcH, obtenida de cepas de *P. acidilactici*, tiene su máxima actividad en medio TGE no amortiguado, el crecimiento microbiano de *P. parvulus* MXVK 133 fue ligeramente menor en medio CGB a 40°C observándose una actividad de su pediocina marcadamente mayor a la obtenida en medio TGE a 37°C durante la fase estacionaria de crecimiento, sin embargo en el medio CGB existe un suplemento de triptona lo cual hace más complejo el medio, esto también fue observado por Yang y Ray (1994) donde establecen que la

suplementación de triptona, glucosa y/o extracto de levadura incrementan la producción de pediocina.

Diversos estudios también han demostrado que a pesar de que medios simples permiten la obtención de altas cantidades de pediocina, los medios complejos son mejores para un alto nivel

de producción de ésta. Adicionalmente esta tendencia fue observada también por Hernández (2002). Las temperaturas evaluadas (37 y 40°C) entran en el intervalo óptimo de crecimiento del género de *Pediococcus* y de producción de pediocina, por lo que este parámetro no tuvo efecto considerable en la producción.

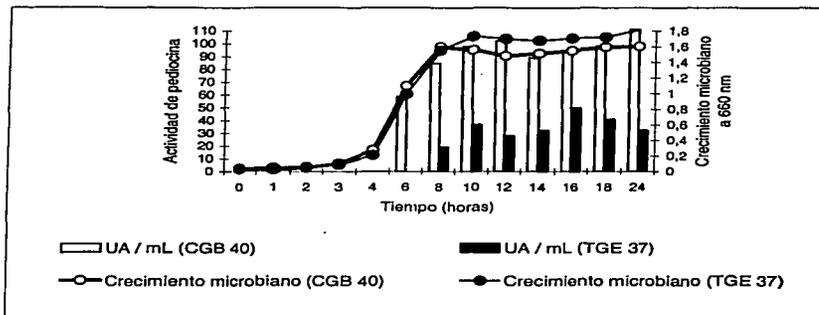


Figura 5. Curva de crecimiento de *P. parvulus* MXVK 133 y de actividad de su Pediocina en medio de cultivo TGE 37°C y en medio CGB a 40°C. Para el crecimiento microbiano (CGB 40), el coeficiente de variación fue menor a 8.7%, para el crecimiento microbiano (TGE 37) el coeficiente de variación fue menor a 5.81%, para el pH (CGB 40) el coeficiente de variación fue menor a 4.5% y para el pH (TGE 37) el coeficiente de variación fue menor a 1.87%.

Para los dos medios evaluados se determinó el pH, observándose un descenso de éste conforme aumentaba el crecimiento microbiano debido a la producción de ácido láctico

asociada a dicho crecimiento (Figura 6). Este descenso fue menos marcado en el medio CGB debido a la presencia del citrato de amonio y fosfato de sodio dibásico como amortiguadores.

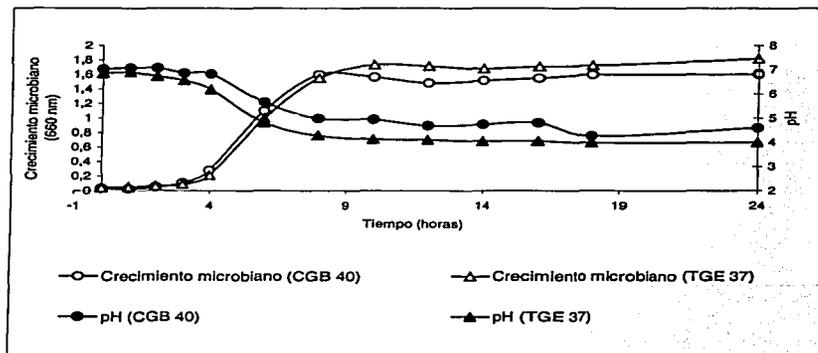


Figura 6. Curvas de crecimiento y de medición de pH de *R. parvulus* MXVK 133.

4.3. Extracción de pediocina

4.3.1. Prueba de adsorción / desorción

Varios estudios han probado que en general, las células de una cepa bacteriana productora de bacteriocinas adsorben las moléculas de bacteriocina que producen. Se ha destacado también que la Pediocina ACh se adsorbe 100% en un intervalo de pH de 6.0 a 6.5 y la completa desorción se efectúa a pH de 1.5 y por debajo de este valor (Yang, y col., 1992).

Al hacer la evaluación a diferentes valores de pH, se observó la mayor adsorción de pediocina en las células a valores de pH de 3, 5, 5.5, 6 y 6.5 de los cuales, los valores 5 y 5.5 presentaron la menor actividad en los respectivos extractos libres de células. Por otro lado, la menor desorción de pediocina en las células se presentó a pH de 1 el cual coincidió con la mayor actividad de pediocina en los extractos. En la figura 7 se muestra la actividad de las células y sus respectivos extractos a los diferentes valores de pH evaluados.

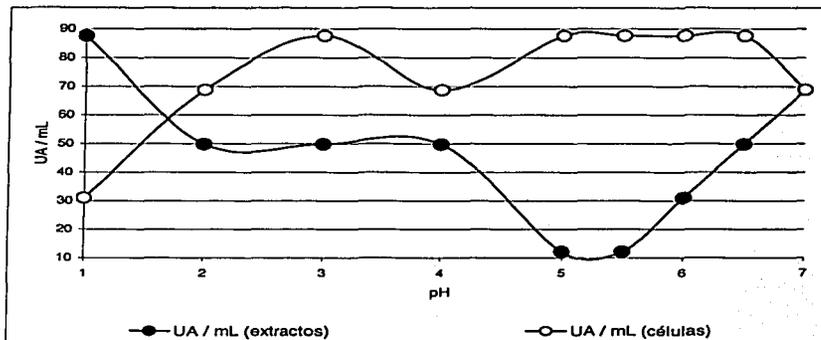


Figura 7. Actividad inhibitoria de la Pediocina de *P. parvulus* MXVK 133 determinada a diferentes valores de pH de adsorción / desorción.

Por lo anterior, se dedujo que el mejor pH de adsorción en la pared de las células bacterianas es 5.5 debido a que corresponde al punto donde se observa la menor actividad de los extractos libres de células estando en coincidencia con lo reportado en la literatura (Daba y col., 1994, Yang y col., 1992). Mientras que, el mejor pH de desorción de la pared de la célula bacteriana es 1 en donde se observó la mayor actividad en los extractos libres de células y la menor actividad de las células.

En la figura 8 se observa un ejemplo de los halos de inhibición generados por las células y su respectivo extracto determinados a pH de 2.

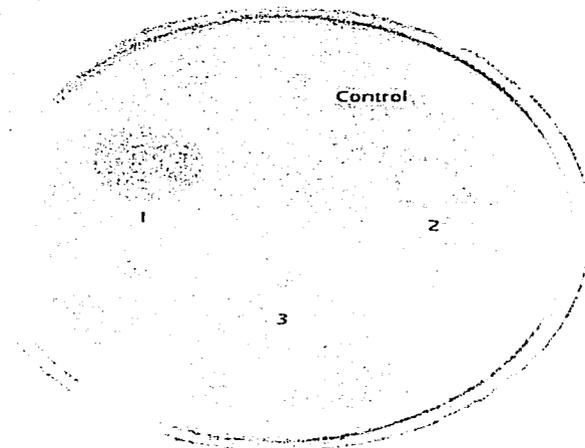


Figura 8. Determinación de la actividad inhibitoria de la Pediocina de *P. parvulus* MXVK 133 empleando *E. faecalis* MXVK 22 como microorganismo sensible mediante los halos de inhibición generados por el extracto de desorción [1], las células desorbidas [2] y las esferas de alginato formadas con 1.5 mL de alginato al 1.5% y 112.5 UA / mL de Pediocina [3]. Las zonas claras indican que el crecimiento de *E. faecalis* fue completamente inhibido.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.3.2. Correlación entre halo de inhibición y Unidades de actividad (UA)

La figura 9 corresponde a la curva de correlación obtenida a partir de diversas diluciones seriadas del extracto de pediocina obtenida por la prueba de adsorción / desorción dependiente del pH. El extracto crudo obtenido contenía 750 UA / mL de pediocina.

En todas las diluciones realizadas se logró observar una relación directa entre dilución y halo de inhibición lo que permitió obtener la curva de correlación entre halos de inhibición y unidades de actividad, corroborado por el coeficiente de correlación obtenido por correlación lineal ($R^2 = 0.92$).

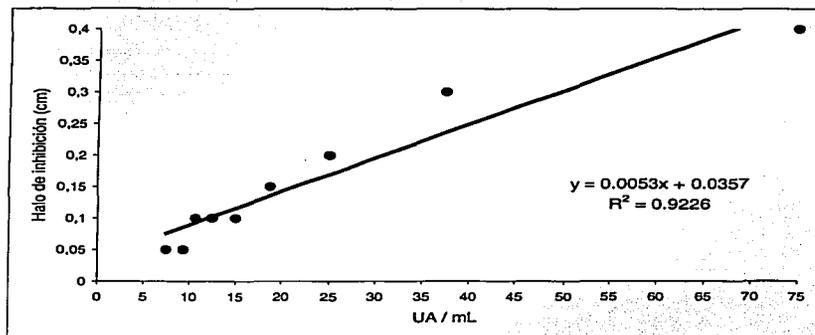


Figura 9. Correlación entre halo de inhibición y UA de la pediocina de *P. parvulus* MXVK 133 adsorbida.

4.4. Aplicación de la pectina a los recubrimientos de alginato

De acuerdo a lo reportado por Belitz (1997) el alginato gelifica por acidificación y por adición de iones calcio. Al mezclar la pectina (pH 1) con el alginato (pH 6.73) éste gelificó espontáneamente por lo que se evaluaron diferentes valores de pectina para evitar dicha gelificación.

Los pHs evaluados y los finales se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Valores de pH evaluados en las esferas elaboradas a base de alginato de sodio y pectina.

pH (Pectina)	pH (Alginato de sodio)	pH final (alginato + Pectina)
3.33	6.73	6.44
4.41	6.73	6.36
5.89	6.73	6.89
6.15	6.73	7.07
6.46	6.73	7.55
7.1	6.73	7.8

El valor mínimo de pH de la solución de pectina con el cual no se observó gelificación espontánea al mezclarlo con el alginato fue de tres. Cada una de las mezclas a diferentes pHs se gelificaron en forma de esferas (de aproximadamente 3 mm de diámetro) en presencia de calcio a las cuales se les determinó su actividad en función del tiempo (Tabla 11).

Tabla 11. Diámetros de los halos de inhibición en milímetros producidos por las esferas de alginato y pectina a distintos valores de pH.

pH pectina	pH final	Tiempo (días)			
		0	4	61	10
3.33	6.44	6	5	4.5	4
4.41	6.36	6	5	4.5	3.5
5.89	6.89	6	5	4	3.5
6.15	7.07	5	5	4.5	4.5
6.46	7.55	5.5	5	4	3
7.1	7.8	5	5	4.5	3

Las esferas evaluadas a los diferentes pHs presentaron actividad antimicrobiana con una reducción progresiva de ésta a través del tiempo de estudio. Sin embargo esta reducción no fue significativa ($p > 0.05$) para ninguno de los valores de pH evaluados (Ver Anexo 4, Tabla 1).

Se eligió el pH de 3.3 para ser utilizado en las pruebas posteriores debido a que a ese valor se observó una buena actividad inhibitoria, disminuyendo con respecto al tiempo, pero no en forma significativa con respecto al resto de los pHs evaluados. Ese pH fue el mínimo en el cual no se presentó gelificación espontánea del alginato y además este valor entra en el intervalo óptimo de actividad de la Pediocina. Finalmente el pH de la mezcla alginato y pediocina pH 3.3 fue de 6.44 este valor entra en el intervalo de pH que presentan las salchichas (6.3 – 6.6), no modificando por lo tanto el pH del producto final.

4.4.1. Determinación de la estabilidad de pediocina en la matriz de alginato

El alginato (1.5 mL) se gelificó en forma de esferas en presencia de calcio en exceso evaluando distintas concentraciones de pediocina medidas en Unidades de actividad, su correspondencia en μL se presenta en la tabla 12.

La estabilidad de la bacteriocina dentro de la matriz se verificó midiendo la actividad inhibitoria de las diferentes esferas expresada como actividad residual, tomando como 100% el halo de inhibición obtenido el día de producción de las esferas (Figura 10).

Tabla 12. Correspondencia entre UA/mL y μL de pediocina.

Pediocina (μL)	Pediocina (UA / mL)
10	7.5
25	18.75
50	37.5
75	56.25
100	75
150	112.5

Las esferas de alginato conteniendo la pediocina mostraron una actividad antimicrobiana contra *E. faecalis*, la cual se vio reducida con el transcurso del tiempo especialmente en aquellas conteniendo la menor cantidad de pediocina (7.5 y 18.75 UA / mL) las cuales al término del estudio tuvieron 0% de actividad residual. Las esferas que contenían 56.25, 75 y 112.5 UA / mL mostraron una actividad inhibitoria estadísticamente no significativa a través del tiempo de estudio al igual que las esferas con 37.5, 56.25 y 112.5 UA / mL ($p > 0.05$) (Ver Anexo 4, Tabla 2).

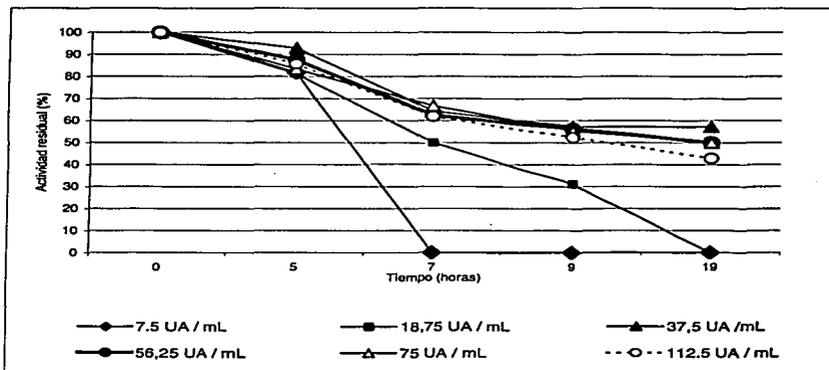


Figura 10. Estabilidad de la pediocina de *P. parvulus* MxVK 133 en las esferas elaboradas a base de alginato de sodio durante 19 días, expresada como actividad residual en porcentaje.

La concentración de pediocina elegida fue 75 UA / mL, debido a que su equivalente en μL corresponde a menos del 10% de la cantidad de alginato utilizada la cual no modifica la concentración de éste. Junto con la concentración 112.5 UA / mL presentó los mayores halos de inhibición evaluados (Ver Anexo 3, Tabla 1) y como se indicó arriba no mostró diferencia significativa con los valores inmediatos superior e inferior, sin embargo existió diferencia

significativa entre esta y la concentración de 37.5 UA / mL ($p < 0.05$) pero se debe a que la concentración de 37.5 UA / mL presentó halos de inhibición iniciales pequeños comparados con los obtenidos con 75 UA / mL (0.7 y 0.9 cm respectivamente) y a pesar de que el halo final de ambas concentraciones fue parecido (0.4 para 37.5 UA / mL y 0.45 para 75 UA / mL). Al hacer la conversión a actividad residual el descenso no es tan marcado para la concentración 37.5 UA / mL contrario a lo observado para 75 UA / mL (57.14 y 50 % de actividad residual final respectivamente).

En la figura 8 se muestra un ejemplo de los halos de inhibición generados por las esferas de alginato (1.5 mL al 1.5%) conteniendo 112.5 UA / mL de pediocina.

4.5. Aplicación de los recubrimientos con pediocina a productos cárnicos procesados

4.5.1. Evaluación de la capacidad inhibitoria de las películas formadas en las salchichas

4.5.1.1. Inhibición de *Listeria innocua*

El género *Listeria* está muy difundido en la naturaleza, pudiéndose encontrar en la materia vegetal en descomposición, en los suelos, en las heces de los animales, en las aguas residuales, en el ensilado y en el agua. De este género, la principal especie patógena es *L. monocytogenes* (Jay., 1994).

Dado que la listeriosis es un problema de salud pública, se decidió estudiar el efecto de la pediocina producida por *P. parvulus* MXVK 133 sobre esta población. Sin embargo, debido a que las condiciones del laboratorio no son las adecuadas para el estudio de especies patógenas se estudió el efecto de la pediocina sobre *L. innocua* que es considerada una variante no patógena de *L. monocytogenes* (Jay., 1994).

Para probar el efecto de la pediocina sobre el crecimiento de *L. innocua* se emplearon dos diluciones (1:10, D.O. 0.1 y 1:100, D.O. 0.04) con las cuales se pretendía probar que la concentración inicial de *L. innocua* tenía influencia en la acción inhibitoria de la pediocina (a menor carga inicial del microorganismo sensible, mayor será el efecto antimicrobiano).

Las salchichas recubiertas con la película de alginato conteniendo la pediocina, mostró los menores recuentos de *L. innocua* (cuando éste se inoculó con una dilución 1:100) con respecto a las salchichas control no tratadas con la bacteriocina ($p < 0.05$) (Figura 11) (Anexo 4, Tabla 3).

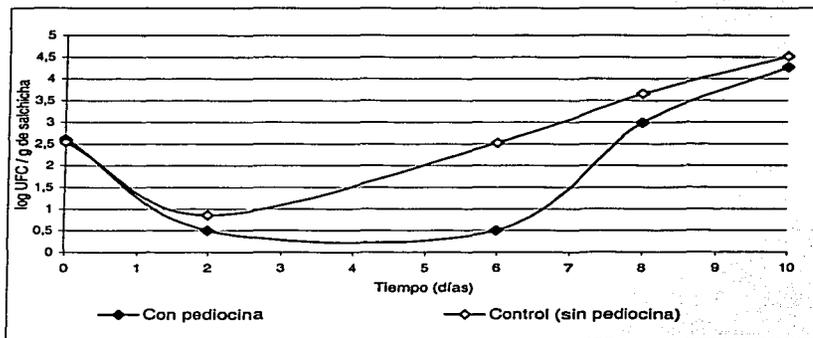


Figura 11. Variación de la población de *Listeria* en salchichas inoculadas por inmersión en una solución 1:100 de *L. innocua*, durante 10 días de almacenamiento a 4°C.

Partiendo con la misma carga de *L. innocua*, la reducción fue más marcada en los días 2, 6 y 8, obteniéndose al final del experimento una reducción pequeña pero significativa (menos de 0.5 ciclos logarítmicos) con respecto al control. Al inicio (días 2 y 6) se observó una reducción muy

rápida en el crecimiento de *L. innocua* en las salchichas con recubrimiento con pediocina, incrementando lentamente hacia el día 8, lo cual concuerda con lo establecido por Ray (2000), quien indica que dentro de la población de las cepas sensibles siempre existen algunas variantes celulares que son capaces de crecer en presencia de pediocina.

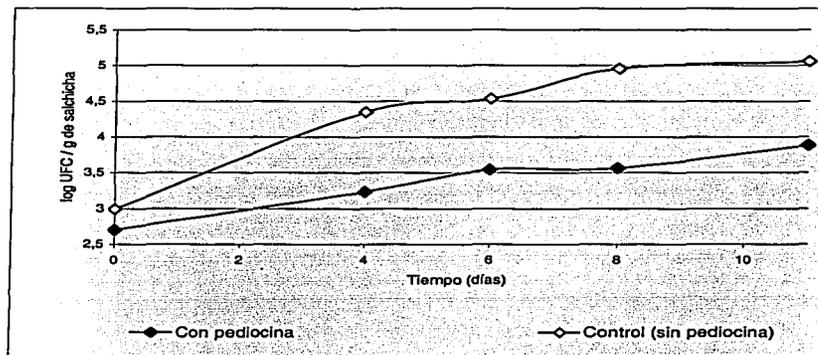


Figura 12. Variación de la población de *Listeria* en salchichas inoculadas por inmersión en una solución 1:10 de *L. innocua*, durante 11 días de almacenamiento a 4° C.

Al evaluarse la población de *L. innocua* en las salchichas inoculadas con la dilución 1:10 de la bacteria no se observó una reducción del crecimiento, sin embargo comparado con lo obtenido en las salchichas control el crecimiento fue significativamente menor (de 1 ciclo logarítmico) desde el inicio y conservándose este efecto durante todo el estudio ($p < 0,05$) (Ver Anexo 4, Tabla 4). En la figura 12 se observa el crecimiento de *L. innocua* en las salchichas con recubrimientos con pediocina y control (sin pediocina).

Al hacer la comparación del efecto antibacteriano de la pediocina sobre *L. innocua* entre las dos diluciones probadas no se nota el efecto esperado, debido a que la carga inicial en ambas diluciones fue parecida (diferencia de aproximadamente 0,5 ciclos logarítmicos), obteniendo al

final del estudio una concentración final de *L. innocua* muy parecida (4.3 y 4 log de UFC / g de salchicha tratada con pediocina para las diluciones 1:100 y 1:10 respectivamente).

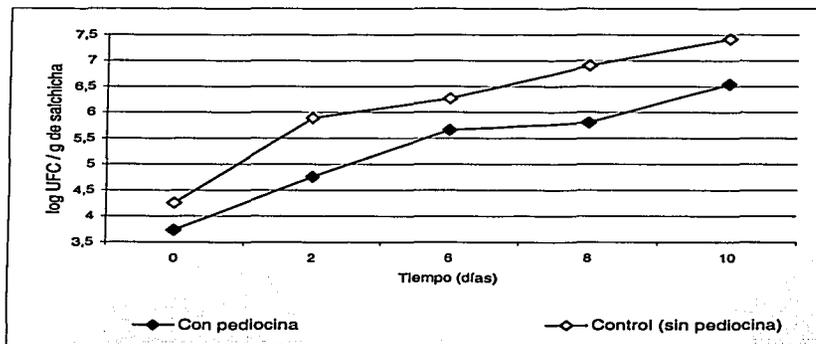


Figura 13. Variación en la población de mesófilos aerobios en salchichas inoculadas por inmersión en una solución 1:100 de *L. innocua*, durante 10 días de almacenamiento a 4° C.

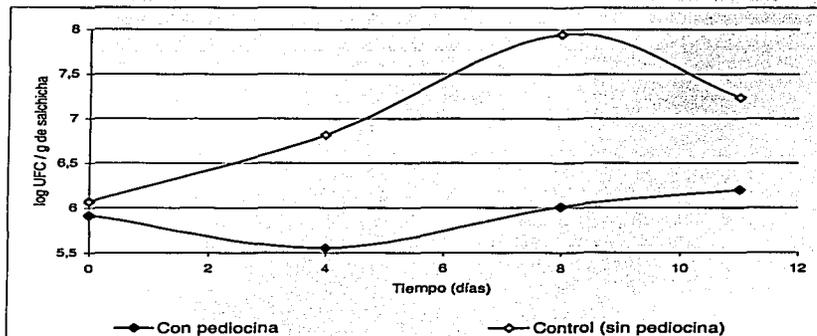


Figura 14. Variación en la población de mesófilos aerobios en salchichas inoculadas por inmersión en una solución 1:10 de *L. innocua*, durante 11 días de almacenamiento a 4° C.

A la par del crecimiento de *L. innocua* se evaluó el de mesófilos aerobios (Figuras 13 y 14), observándose en ambas diluciones muestreadas un mayor efecto inhibitorio de la pediocina en las salchichas tratadas con ésta con respecto a las salchichas control ($p < 0.05$) (Ver Anexo 4, Tablas 5 y 6).

Haciendo la comparación entre las diluciones evaluadas, se observó como se esperaba una mayor carga inicial en la dilución 1:10. Sin embargo el crecimiento y la concentración final de mesófilos aerobios fue muy parecida en ambas diluciones (6.6 y 6.3 log de UFC / g de salchicha tratada con pediocina para las diluciones 1:100 y 1:10 respectivamente).

4.5.1.2. Inhibición de *Enterococcus faecalis*

Debido a que *E. faecalis* es de las principales bacterias lácticas causantes de alteración de salchichas y en general de la carne, además de que es un microorganismo capaz de crecer dentro del intervalo de temperaturas comprendido entre 0°C y 30°C o a temperaturas superiores a ésta (Jay., 1994), se decidió estudiar el efecto inhibitorio de la pediocina contra la población de esta bacteria.

Al igual que con *L. innocua* se decidió estudiar el efecto de la concentración de *E. faecalis* sobre la acción inhibitoria de pediocina por medio de dos diferentes diluciones microbianas (1:100 y 1:10).

La Pediocina presente en los recubrimientos aplicados en las salchichas inoculadas con la dilución 1:100 de *Enterococcus faecalis* mostró un efecto antibacteriano sobre ésta ($p < 0.05$), alcanzando reducciones de 1 ciclo logarítmico los días 2 y 9 y de 2 ciclos logarítmicos los días 5 y 7 del estudio con respecto al control (Ver Anexo 4, Tabla 7). En la figura 15 se observa el crecimiento de *E. faecalis* en presencia y ausencia de pediocina (control).

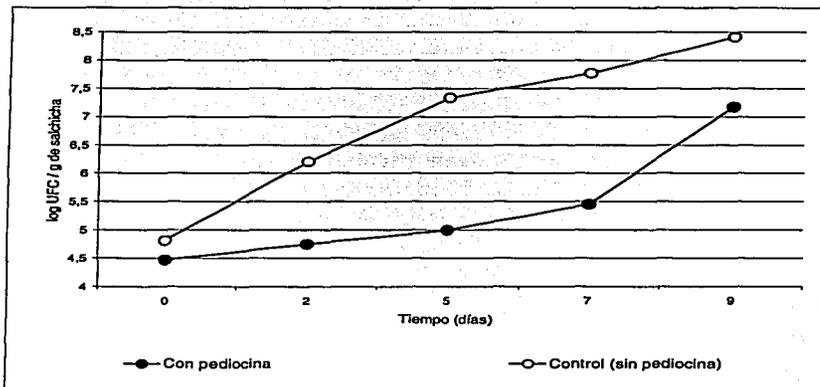


Figura 15. Variación de la población de *Enterococcus faecalis* en salchichas inoculadas por inmersión en una solución 1:100 de *E. faecalis*, durante 9 días de almacenamiento a 4° C.

El estudio inició con una concentración de 4.5 log UFC / g para ambos tratamientos, alcanzando concentraciones finales significativamente menores en el tratamiento con pediocina con respecto al control ($p < 0.05$) (7 y 8.5 log UFC / g respectivamente).

En la figura 16 se muestra el crecimiento de *E. faecalis* aplicada a las salchichas en dilución 1:10 en presencia y en ausencia de pediocina (control), donde se observa claramente el efecto bactericida ocasionado por la pediocina, mostrando un efecto inhibitorio significativo con respecto al control ($p < 0.05$) (Ver Anexo 4, Tabla 8). Partiendo de la misma carga microbiana (aproximadamente 6 log UFC / g), se alcanzó para los días 2 y 6 una reducción de 1 ciclo logarítmico y para el final del estudio mostró la mayor reducción, de poco más de 2 ciclos logarítmicos.

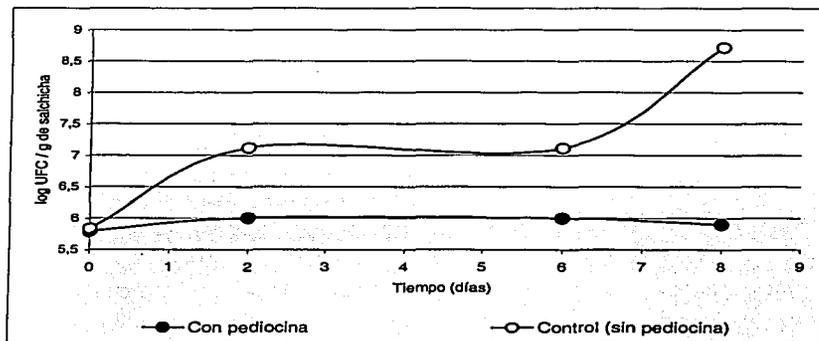


Figura 16. Variación de la población de *Enterococcus faecalis* en salchichas inoculadas por inmersión en una solución 1:10 de *E. faecalis*, durante 9 días de almacenamiento a 4° C.

Haciendo la comparación entre las dos diluciones evaluadas, se observa el efecto contrario al esperado. Partiendo de una concentración inicial mayor (para el caso de la dilución 1:10) la acción inhibitoria es mucho más notable no observándose crecimiento durante el estudio, contrario a lo observado en la dilución 1:100 en donde se observó crecimiento de *E. faecalis* significativamente menor al del control.

En las figuras 17 y 18 se observa el crecimiento de mesófilos aerobios en presencia y ausencia de pediocina, evaluando las diluciones 1:100 y 1:10 respectivamente.

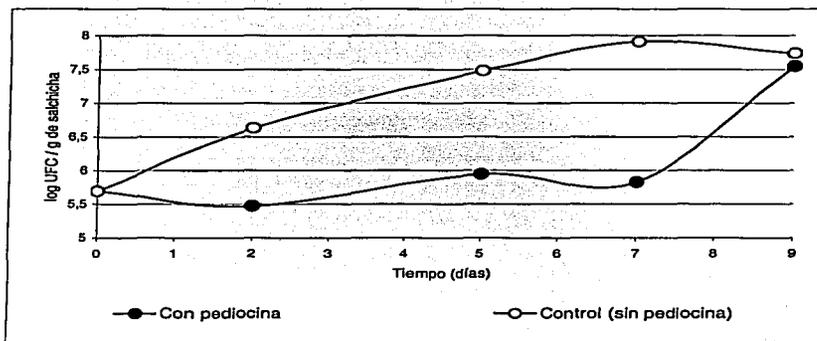


Figura 17. Variación en la población de mesófilos aerobios en salchichas inoculadas por inmersión en una solución 1:100 de *E. faecalis*, durante 11 días de almacenamiento a 4° C.

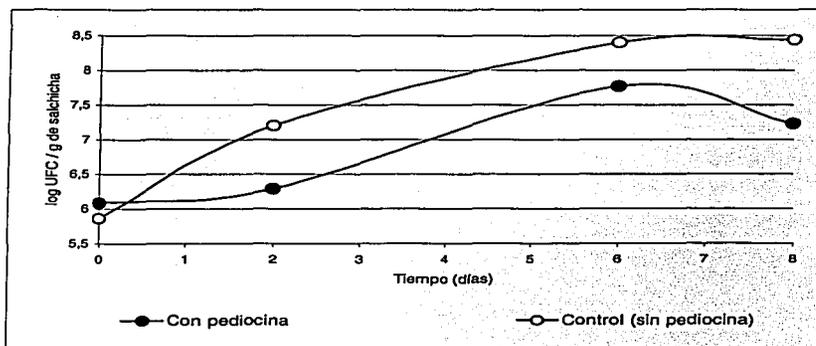


Figura 18. Variación en la población de mesófilos aerobios en salchichas inoculadas por inmersión en una solución 1:100 de *E. faecalis*, durante 11 días de almacenamiento a 4° C.

Para la dilución 1:100 se observa en general el mismo efecto inhibitorio que contra *E. faecalis*, mostrando para los días 5 y 7 el mayor efecto de más de 1.5 ciclos logarítmicos con respecto al control, pero a diferencia de lo observado con *E. faecalis*, la concentración final de mesófilos aeróbios en ambos tratamientos (con pediocina y control) fue casi la misma (7.55 y 7.74 log UFC / g respectivamente) sin embargo, significativamente menor con respecto al control durante el transcurso del estudio ($p < 0.05$) (Ver Anexo 4, Tabla 9). Esto posiblemente debido a que en la cuenta de mesófilos aerobios se recuenta toda la flora con estas características presente en la salchicha.

Para la dilución 1:10 el efecto inhibitorio de mesófilos aerobios no fue tan notoria como con *E. faecalis*, ya que aquí sí se observó un crecimiento significativamente menor (de aproximadamente 0.5 ciclos logarítmicos) con respecto al control ($p < 0.05$) (Ver Anexo 4, Tabla 10), mostrando al final del estudio (día 8) la mayor reducción, de un poco más de un ciclo logarítmico con respecto al control.

Se puede observar también que el recubrimiento con pediocina tuvo un mejor efecto inhibitorio contra *Enterococcus faecalis* con respecto al de *Listeria innocua* debido a que *E. faecalis* está filogenéticamente más relacionada con *Pediococcus parvulus* que con *L. innocua*.

4.5.1.3. Medición del pH

La medición del pH se efectuó a la par de la medición del crecimiento microbiano para ambas cepas y diluciones evaluadas. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 19 y 20.

Para la dilución 1:100 de *L. innocua* las salchichas recubiertas con alginato y pediocina generaron una mayor disminución del pH pero no estadísticamente significativa con respecto al control ($p > 0.05$) (Ver Anexo 4, Tabla 11).

Para la dilución 1:10 por el contrario, se obtuvo una disminución estadísticamente significativa de las salchichas control ($p < 0.05$) (Ver Anexo 4, Tabla 12), correspondiendo a lo obtenido con

el crecimiento microbiano, un mayor efecto inhibitorio de la pediocina en la dilución 1:10, por lo tanto observando una disminución más marcada del pH de las salchichas control y también con respecto a las salchichas inoculadas con la dilución 1:100 de *L. innocua*.

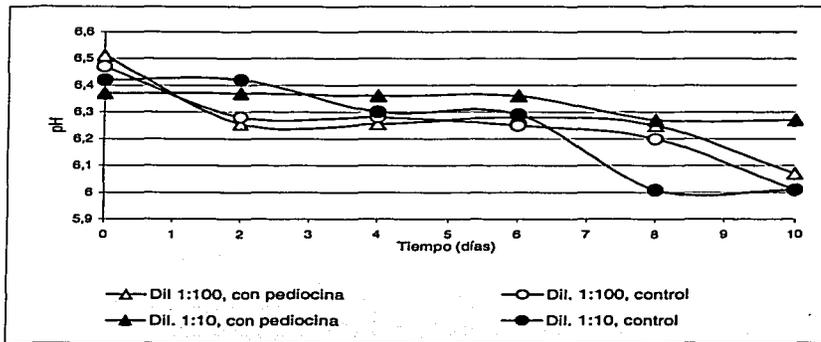


Figura 19. Evolución del pH en salchichas con recubrimiento con pediocina y control (sin pediocina) inoculadas con *L. innocua* a diferentes diluciones.

En lo que respecta a las diluciones de *E. faecalis* evaluadas, para ambos casos las salchichas control mostraron una disminución significativamente mayor con respecto a las salchichas con recubrimiento con pediocina ($p < 0.05$) (Ver Anexo 4, Tablas 13 y 14), lo que concuerda con lo observado en el crecimiento microbiano, en ausencia de pediocina se obtiene un mayor crecimiento microbiano el cual genera una mayor reducción del pH.

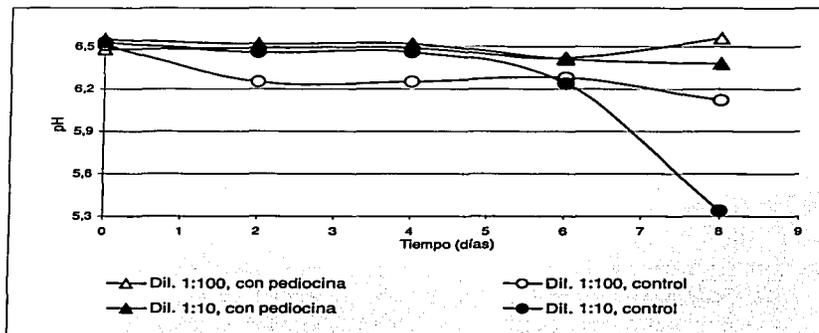


Figura 20. Evolución del pH en salchichas con recubrimiento con pediocina y control (sin pediocina) inoculadas con *E. faecalis* a diferentes diluciones.

De las dos bacterias evaluadas, se observó una mayor disminución del pH por parte de *Enterococcus faecalis* con respecto a la generada por *Listeria innocua* y esto es debido a que esta última metaboliza la glucosa para dar principalmente ácido láctico, mientras que *E. faecalis* lo hace con un amplio rango de carbohidratos para dar también principalmente ácido láctico (Holt y col., 1994).

5. Conclusiones

- Las concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio con las que se obtuvieron los mejores recubrimientos fueron: 1.5% y 90 mM respectivamente.
- El medio de cultivo en el que se obtuvo la mayor producción de pediocina a partir de *P. parvulus* MXVK 133 es el medio CGB a una temperatura de 40°C. Entre la hora 10 y la 12 de incubación de *P. parvulus* MXVK 133 en ese medio de cultivo y a esa temperatura se obtiene la mayor producción de pediocina.
- La prueba de adsorción / desorción dependiente del pH es un método eficaz para purificar mayor cantidad de pediocina. Para la producción de pediocina utilizando la prueba señalada, el mejor pH de adsorción es 5.5 mientras que el mejor pH de desorción es 1.
- Al adicionar pediocina en valores de pH menores de 3 al alginato de sodio ocasiona gelificación espontánea de éste (en ausencia de iones calcio).
- Las concentraciones óptimas de alginato y pediocina para la elaboración de los recubrimientos fueron 1.5 mL de alginato al 1.5% y 75 UA / mL de pediocina (100 µL).
- La adición de pediocina a los recubrimientos a base de alginato controló eficazmente el crecimiento de *L. innocua* ATCC 33090 y *E. faecalis* MXVK 22. La pediocina de *P. parvulus* MXVK 133 tiene un efecto antimicrobiano más efectivo contra bacterias relacionadas filogenéticamente.

6. Bibliografía

Belitz, H.D., Grosch, W., Química de los alimentos. Segunda edición. Editorial Acribia S.A. España. 1997. pp. 316-317 y 324-325

Bhunja, A.K., Johnson, M.C., Ray, B., (1998). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology* 65: 261-268.

Carolissen-Mackay, V., Arendse, G., Hastings, J.W., (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International Journal of Food Microbiology* 34: 1-16.

Cutter, C.N., Siragusa, G.R., (1997). Growth of *Brochothrix thermosphacta* in ground beef following treatments with nisin in calcium alginate gels. *Food Microbiology* 14: 425-430.

Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R.E., Lemieux, L., (1994). Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *Journal of Applied Bacteriology* 77: 682-688.

De Vuyst, L., Vandamme, E.J., (1994). Lactic acid bacteria and bacteriocins: Their practical importance; Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Microbiology, Genetics and Applications, Eds. De Vuyst, L., Vandamme, E., Primera edición. Blackie Academic & Professional. Great Britain. Pp. 1-11, 91-142

Gennadios, A., Hanna, M.A., Furth, L.B., (1997). Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. *Lebensm. Wiss. U. Technology* 30: 337-350.

Hernández, L. J.C., (2002). Caracterización parcial de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-I.

- Holt, J., Kriieg, N., Sneath,P., Staley, J., Williams, S., Bergey's Manual of Determinative bacteriology. Ninth edition. Williams & Wilkins. USA. 1994. pp. 538, 543, 566 y 567.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., (1995). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiological Reviews* 59 (2): 171-200.
- Jay, J.M., Microbiología moderna de los alimentos. Tercera edición. Editorial Acirbia. España. 1994. pp. 63, 235-238, 255, 605, 612-613.
- Kester, J.J., Fennema, O.R., (1986). Edible films and coatings: a review. *Food Technology* 40: 47-56.
- Krochta, J., De Mulder-Johnston, C., (1997). Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology* 51: 61-74.
- Leistner, L., Gorris, L.G.M., (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology* 6: 41-45.
- Martino, M., (2000). The use of edible films and coatings to preserve meat quality. *Memorias del 46^m IcoMST*. Buenos Aires, Argentina 2: 752.
- Ming, X., Weber, G., Ayres, J., Sandine, W.E., (1997). Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *Journal of Food Science* 62: 413-415.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A., Holley, R.A., (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology* 62: 139-148.
- Quintero, S.B., (2001). Efecto de la fermentación láctica sobre la calidad de carne de pollo almacenada en condiciones de abuso de temperatura. Tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-I

- Ray, B., (1994). Pediocin of *Pediococcus species*. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications. Eds. De Vuyst, L., Vandamme, E., Primera edición. Blackie Academic & Profesional. Great Britain. pp. 465-495.
- Ray, B., Miller, K.W., (2000). Pediocin. In Natural Food Antimicrobial Systems. Ed. Naidu, A.S., CRC Press. USA. pp. 525-566.
- Ray, B., Miller, K.W., Jain, K., (2001). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Current Perspectives. *Indian Journal of Microbiology* 41: 01-21.
- Requena, T., Peláez, C., (1995). Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas (Revisión). *Revista española de ciencia y tecnología de alimentos* 35 (1): 19-44
- Siragusa, G.R., Dickson, J. S., (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on beef tissue by application of organic acids immobilized in a calcium alginate gel. *Journal of food science* 57: 293-296.
- Yang, R., Johnson, M., Ray, B., (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology* 58 (10): 3355-3359.
- Yang, R., Ray, B., (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 11: 281-291.

Anexo 1: Medios de cultivo empleadosTabla 1. Medio TGE para crecimiento de *P. parvulus* y producción de su pediocina

Composición	g / 100 ml
Triptona	1.5
Glucosa	2
Extracto de levadura	1.5
Tween 80	0.2
Sulfato de Magnesio	0.005
Sulfato de manganeso	0.005

Ajustar pH a 6.8 con NaOH 1N

Tabla 2. Medio CGB para el crecimiento de *P. parvulus* y producción de su pediocina

Composición	g / 100 ml
Triptona	2.0
Glucosa	1.0
Extracto de levadura	0.5
Citrato de amonio	0.2
Fosfato de sodio dibásico	0.2
Sulfato de Magnesio	0.01
Sulfato de manganeso	0.005
Tween 80	0.1

Ajustar pH a 7 con NaOH 1N

Tabla 3. Agar KF, selectivo para *Streptococos*

Composición	g/L
Peptona de caseína / Peptona de carne	10.0
Extracto de levadura	10.0
Cloruro sódico	5.0
Glicerofosfato sódico	10.0
Maltosa	20.0
Lactosa	1.0
Azida sódica	0.4
Púrpura de bromocresol	0.015
Agar bacteriológico	15.0

Disolver y esterilizar cuidadosamente en autoclave (10 minutos a 121°C), no sobrecalentar. Dejar enfriar hasta 50°C aproximadamente e incorporar 10 mL de una solución al 1% de TTC (cloruro de 2, 3, 5 trifeniltetrazolio).

Anexo 2. Técnicas empleadas

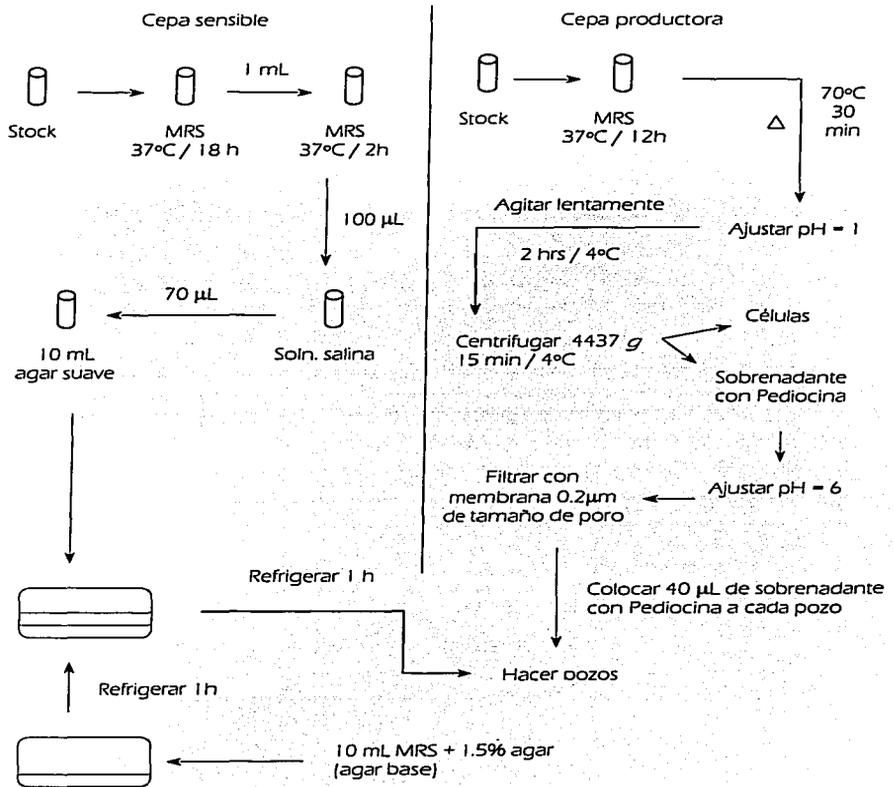


Figura 1. Método de difusión en placas de agar (Bhunia y col., 1988).

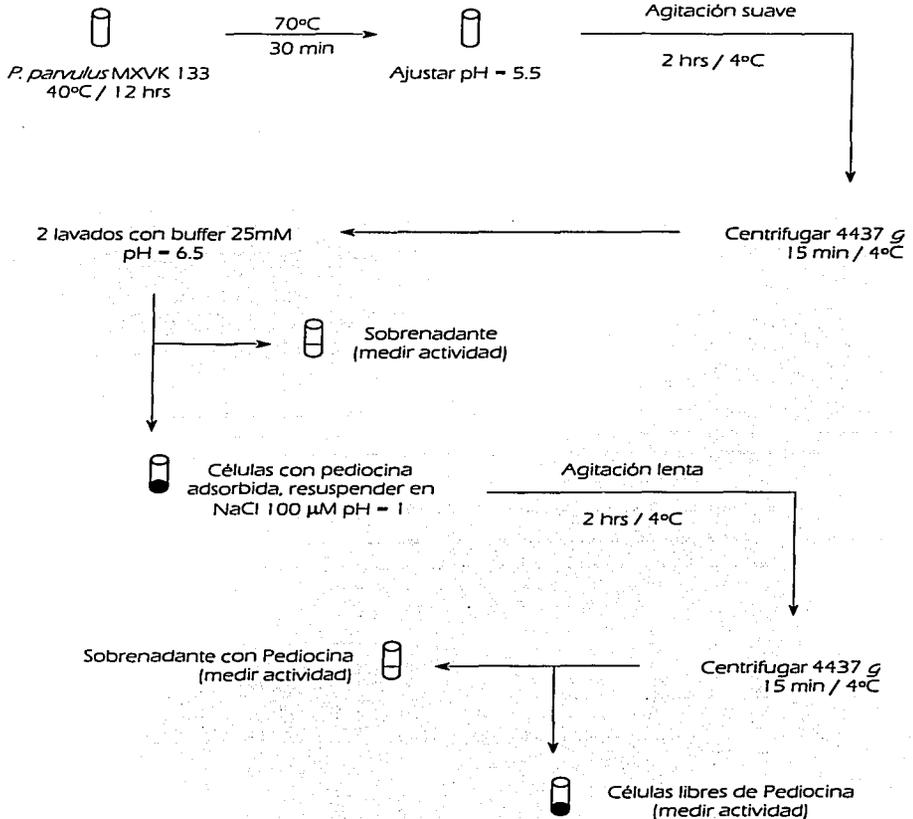


Figura 2. Técnica de adsorción / desorción dependiente del pH para la extracción de Pediocina.

Anexo 3: Resultados anexos

Tabla 1. Estabilidad de la pediocina en la matriz de alginato medida mediante halos de inhibición en cm.

Cantidad de pediocina (UA / mL)	Día 0	Día 5	Día 7	Día 9	Día 19
7.5	0.5	0.45	0	0	0
18.75	0.8	0.65	0.4	0.25	0
37.5	0.7	0.65	0.45	0.4	0.4
56.25	0.8	0.7	0.5	0.45	0.4
75	0.9	0.75	0.6	0.5	0.45
112.5	1	0.9	0.65	0.55	0.45

Anexo 4: Análisis estadísticos

Tabla 1. Actividad inhibitoria de las esferas de alginato a diferentes valores de pH de peditocina.

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
pH	0.1	pH	Media
		6.44	4.875 b
		6.36	4.750 ab
		6.89	4.625 ab
		7.07	4.750 ab
		7.55	4.375 a
		7.8	4.375 a
Tiempo	0.001	Tiempo (días)	
		0	5.58 d
		4	5.0 c
		6	4.33 b
		10	3.55 a
pH * Tiempo	0.05		

Tabla 2. Actividad residual en porcentaje de las esferas de alginato evaluada a diferentes cantidades de bacteriocina

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
Cant. de bacteriocina (UA/mL)	0.001	Cant. Bac.	Media
		7.5	38 a
		18.75	52.5 b
		37.5	74.278 d
		56.25	71.250 cd
		75	60.07 bc
		112.5	71 cd
Tiempo	0.001	Tiempo (días)	Media
		0	100 d
		5	87.47 c
		7	46.39 b
		9	38.36 ab
		19	33.68 a
Cant bac * tiempo	0.005		

* Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 3. Crecimiento de *Listeria innocua* Dil. 1:100

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
Tratamiento	0.010	Tratamiento	Media
		Con bacteriocina	2.073 a
		Sin bacteriocina	2.821 b
Tiempo	0.001	Tiempo	Media
		0	2.57 c
		2	0.43 a
		6	1.51 b
		8	3.32 c
		10	4.39 d
Tratamiento * tiempo	0.175		

Tabla 4. Crecimiento de *Listeria innocua* Dil. 1:10

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
Tratamiento	0.001	Tratamiento	Media
		Con bacteriocina	3.385 a
		Sin bacteriocina	4.376 b
Tiempo	0.001	Tiempo	Media
		0	2.846 a
		4	3.791 b
		6	4.039 bc
		8	4.259 bc
		11	4.469 c
Tratamiento * tiempo	0.223		

* Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 5. Crecimiento de Mesófilos aerobios Dil. 1:100

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
Tratamiento	0.001	Tratamiento	Media
		Con bacteriocina	5.36 a
		Sin bacteriocina	6.18 b
Tiempo	0.001	Tiempo	Media
		0	3.994 a
		2	5.47 b
		6	6.055 c
		8	6.351 c
		10	6.98 d
Tratamiento * tiempo	0.799		

Tabla 6. Crecimiento de Mesófilos aerobios Dil. 1:10

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
Tratamiento	0.001	Tratamiento	Media
		Con bacteriocina	5.99 a
		Sin bacteriocina	7.04 b
Tiempo	0.001	Tiempo	Media
		0	5.99 a
		4	6.185 a
		6	5.913 a
		8	7.10 b
		11	7.38 b
Tratamiento * tiempo	0.010		

* Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 7. Crecimiento de *Enterococcus faecalis* Dil. 1:100

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
Tratamiento	0.001	Tratamiento	Media
		Con bacteriocina	5.366 a
		Sin bacteriocina	6.665 b
Tiempo	0.001	Tiempo	Media
		0	4.040 a
		2	5.474 b
		5	6.165 bc
		7	6.610 c
		9	7.79 d
Tratamiento * tiempo	0.006		

Tabla 8. Crecimiento de *Enterococcus faecalis* Dil. 1:10

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
Tratamiento	0.001	Tratamiento	Media
		Con bacteriocina	5.799 a
		Sin bacteriocina	7.196 b
Tiempo	0.001	Tiempo	Media
		0	5.816 a
		2	6.561 b
		6	6.305 ab
		8	7.308 c
Tratamiento * tiempo	0.001		

* Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 9. Crecimiento de Mesófilos aerobios Dil. 1:100

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
Tratamiento	0.001	Tratamiento	Media
		Con bacteriocina	6.151 a
		Sin bacteriocina	7.184 b
Tiempo	0.001	Tiempo	Media
		0	5.69 a
		2	6.05 a
		5	6.84 b
		7	7.00 b
		9	7.74 c
Tratamiento * tiempo	0.001		

Tabla 10. Crecimiento de Mesófilos aerobios Dil. 1:10

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
Tratamiento	0.081	Tratamiento	Media
		Con bacteriocina	6.53 a
		Sin bacteriocina	7.47 a
Tiempo	0.056	Tiempo	Media
		0	5.97 a
		2	6.74 ab
		6	8.08 b
		8	7.20 ab
Tratamiento * tiempo	0.344		

* Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 11. Evolución del pH. *L. innocua* Dil. 1:100

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
Tratamiento	0.183	Tratamiento	Media
		Con bacteriocina	6.27 a
		Sin bacteriocina	6.24 b
Tiempo	0.001	Tiempo	Media
		0	6.487 c
		2	6.267 b
		6	6.266 b
		8	6.226 b
		10	6.041 a
Tratamiento * tiempo	0.811		

Tabla 12. Evolución del pH. *L. innocua* Dil. 1:10

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
Tratamiento	0.001	Tratamiento	Media
		Con bacteriocina	6.378 a
		Sin bacteriocina	6.191 b
Tiempo	0.001	Tiempo	Media
		0	6.40 d
		2	6.197 ab
		6	6.331 c
		8	6.250 b
		10	6.146 a
Tratamiento * tiempo	0.001		

* Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05

Tabla 13. Evolución del pH. *E. faecalis* Dil. 1:100

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
Tratamiento	0.001	Tratamiento	Media
		Con bacteriocina	6.42 a
		Sin bacteriocina	6.088 b
Tiempo	0.001	Tiempo	Media
		0	6.498 c
		2	6.373 b
		5	6.356 b
		7	6.342 b
		9	5.716 a
Tratamiento * tiempo	0.001		

Tabla 14. Evolución del pH. *E. faecalis* Dil. 1:10

Fuente de variación	p <	Prueba de Duncan*	
Tratamiento	0.001	Tratamiento	Media
		Con bacteriocina	6.466 a
		Sin bacteriocina	6.21 b
Tiempo	0.001	Tiempo	Media
		0	6.541 c
		2	6.493 bc
		6	6.329 b
		8	5.99 a
Tratamiento * tiempo	0.001		

* Letras diferentes indican diferencias significativas con una significancia = 0.05