



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y
ANTIMICROBIANAS DE PELÍCULAS COMESTIBLES
ADICIONADAS CON NISINA Y/O GLUCOSA OXIDASA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Lic. en Q. MARÍA MAGDALENA MURILLO MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

ASESORES

DRA. ISABEL GUERRERO LEGARRETA

DR. SALVADOR R. TELLO SOLÍS.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

EVALUACIÓN DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ANTIMICROBIANAS DE PELÍCULAS COMESTIBLES ADICIONADAS CON NISINA Y/O GLUCOSA OXIDASA.

Que presentó

Lic. en Q. María Magdalena Murillo Martínez

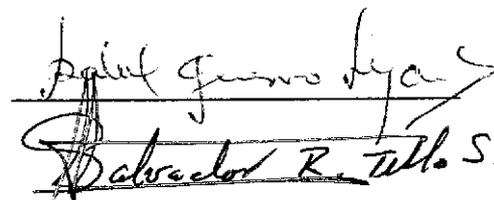
El día 25 de enero del 2008

Director: Edith Ponce Alquicira
Universidad Autónoma Metropolitana

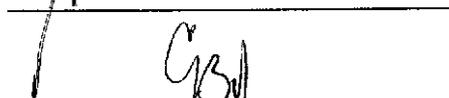


Jurado:

Asesor: Dra. Isabel Guerrero Legarreta
Universidad Autónoma Metropolitana



Asesor: Dr. Salvador Tello Solís
Universidad Autónoma Metropolitana



Sinodal: Dra. Blanca García Almendáres
Universidad Autónoma de Querétaro



Sinodal: M en Q. Miguel Ángel García Sánchez
Universidad Autónoma Metropolitana



El posgrado en la UAM-Iztapalapa está incluido en el padrón de posgrado de excelencia del CONACYT, además cuenta con el apoyo del mismo bajo el convenio 471-O/maestría en Biotecnología.

La presente tesis de maestría forma parte del proyecto titulado “Estudio de la actividad antimicrobiana y funcional de recubrimientos comestibles adicionados con bacteriocinas”, apoyado por Fondo de Investigación Científica Básica SEP-CONACYT 2006, con número de solicitud 053658.

Resumen

El aislado de proteína del suero de leche (APSL) es un biomaterial de gran interés para la fabricación de empaques comestibles ya que les proporciona excelentes propiedades de barrera a gases y humedad. La incorporación de agentes antimicrobianos naturales dentro de la matriz de empaques elaborados a partir de aislado de proteína de suero de leche puede controlar el crecimiento de microorganismos deteriorantes y/o patógenos presentes en productos alimenticios.

El objetivo de éste trabajo fue incorporar dos agentes antimicrobianos naturales en matrices de películas de APSL elaboradas a dos valores distintos de pH, evaluar las propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas de las películas y estudiar su estructura por medio de espectroscopia infrarroja (FTIR).

En este trabajo se elaboraron películas de APSL a pH 5.5 y 8.5, en las que se incorporaron los agentes antimicrobianos glucosa oxidasa (GO) y/o nisina (N) en distintas concentraciones (N: 0, 0.3 y 1.2; GO: 0, 2.4×10^{-3} y 0.05 % p/v). La actividad antimicrobiana de estas películas se evaluó contra los microorganismos *Brochothrix thermosphacta* (NCIB-10018), *Escherichia coli* (JMP 101), *Listeria innocua* (ATCC 33090) y *Enterococcus faecalis* (MXVK22) midiendo los halos de inhibición producidos por las películas.

Las películas que generaron mayores halos de inhibición fueron las adicionadas con GO en sus diferentes concentraciones (2.4×10^{-3} y 0.05 % p/v), el pH al que se elaboraron éstas películas no afectó de manera significativa su actividad antimicrobiana contra los microorganismos sensibles evaluados. Por otra parte, las películas elaboradas a pH 5.5 sólo con nisina y en combinación con GO crearon halos definidos contra, *L. innocua* y *E. faecalis* pero no contra *B. thermosphacta* y *E. coli*; igualmente, el pH afectó la actividad antimicrobiana de éstas películas ya que a pH 8.5 se observaron halos de inhibición menores que los formados a pH 5.5. En base a los resultados obtenidos no es recomendable

incorporar la mezcla de N y GO dentro de las películas debido a que la sola incorporación de GO genera mayor actividad antimicrobiana sin importar el pH al que fueron elaboradas las películas.

Con respecto a el estudio las propiedades fisicoquímicas (transparencia, hidrofobicidad y solubilidad en agua) y mecánicas de las películas (espesor y resistencia al punto de punción), se observó que el pH modificó de manera significativa tanto las propiedades mecánicas como las fisicoquímicas. El efecto de la concentración de N y/o GO adicionada a las películas de APSL influyó de manera significativa en las propiedades fisicoquímicas, como en el caso de la transparencia, las películas con menor transparencia resultaron ser las que contenían la combinación de N y GO a alta concentraciones (N: 1.2 y GO: 0.05 % p/v); por otra parte, las películas que presentaron el mayor espesor fueron las adicionadas con la concentración de 1.2 % p/v de N, los espesores obtenidos fueron de 0.1487 y 0.1530 mm de las películas elaboradas a pH 5.5 y 8.5, respectivamente.

Los espectros de IR obtenidos de las películas de APSL con y sin la adición de N y/o GO fueron similares y característicos de los sólidos amorfos. Los espectros de IR mostraron que las películas elaboradas a pH 5.5 pierden más fácilmente el agua contenida en ellas, en comparación con las películas a pH 8.5, ya que los espectros de las películas elaboradas a pH 5.5 presentaron bandas más nítidas en las regiones 1700 cm^{-1} , características de grupos carbonilo, una banda a 1100 cm^{-1} , característica de vibraciones C-O, que en los espectros de las películas elaboradas a pH 8.5. La pérdida de agua contenida en las películas elaboradas a pH 5.5 puede deberse a que tienen mayor grado de hidrofobicidad a diferencia de las películas elaboradas a pH 8.5 en donde el agua quedo atrapada dentro de la matriz proteica y por lo tanto fue más difícil eliminarla. A pH de 8.5 se facilita el establecimiento de interacciones proteína-agua al encontrarse más alejada del punto isoeléctrico.

Por lo que el pH puede afectar el arreglo estructural y la funcionalidad de películas comestibles de origen proteico alterando su funcionalidad y aplicación.

Abstract

The whey protein isolate (WPI) is a biomaterial of interest in the production of edible packaging since it provides excellent properties as gas and moisture barriers. The incorporation of antimicrobial natural agents into the matrix material of packages elaborated with WPI could control the growth of spoilage and/ or pathogen microorganisms present in food products.

The main aim of this work was to incorporate two antimicrobial agents into the matrix of WPI films, to increase the antibacterial spectra. Additionally, it was considered the pH effect evaluating physicochemical (transparency and hidrofobicity), mechanical (thickness, puncture-strength and water solubility) and antimicrobial properties, and studying the films structure by Fourier transform infrared (FTIR) spectra.

WPI films were elaborated at pH 5.5 and 8.5; the antimicrobial agents tested were glucose oxidase (GO) and/or nisin (N). The antimicrobial activity was studied with different concentrations of GO and N (N: 0, 0.3 and 1.2; GO: 0, 2.4×10^{-3} and 0.05 % w/v) against microorganisms as *Brochothrix thermosphacta* (NCIB-10018), *E. coli* (JMP 101), *L. innocua* (ATCC 33090) and *Enterococcus faecalis* (MXVK22) inoculated in agar plates, their activity were studied measuring the inhibition diameters produced by the films.

Films elaborated at pH 5.5 with N, alone or mixed with GO, showed clear inhibition zones against *L. innocua* and *Enterococcus faecalis* but not against *Brochothrix thermosphacta* and *E. coli*; in addition the antimicrobial activity was also affected by the pH of this films, since pH 8.5 film generated smaller inhibition halos than those for films made at pH 5.5. The films added with GO (2.4×10^{-3} and 0.05 % w/v) shown the highest inhibition diameters. And their antimicrobial activity was not affected by pH under the studied conditions. On basis of obtained

results, addition of N in combination with GO did not increased antimicrobial activity.

On the other hand, it is worth to comment that the pH had significant effects over all physicochemical properties. Certainly, the concentration of N and/or GO into WPI films has a great impact in the final material properties. The films with less transparency were those made with the mixture of both antimicrobial agents at high concentrations (N: 1.2 and GO: 0.05 % w/v). Thicker films were those made with N: 1.2 % w/v without GO; measurements were 0.1487 y 0.1530 mm for films made at pH 5.5 and 8.5, respectively.

All the WPI films were subjected to a thermal process previous to FTIR study to reduce water content in the film matrix. The obtained IR spectra of films with and without the addition of N and /or GO were similar, and characteristic of common amorphous solids. The films elaborated at pH 5.5 loose water easily than those elaborated at pH 8.5, this observation was confirmed by the IR spectra. Films made at pH 5.5 showed sharper bands than those obtained for pH 8.5, thereof, it was possible to see in the regions near to 1700 cm^{-1} , bands characteristic of carbonyl groups, and in the band near to 1100 cm^{-1} , characteristic of vibrations C-O. This observation implies that the water contained in the films made to pH 5.5 could be adsorbed on the film surface, contrary to films made at pH 8.5, where the water was entrapped into the matrix, being more difficult eliminate. Studied films had stable structures at high temperatures, around $70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dedicatorias

*Tu ídolo es convertido en polvo para probar que el polvo de Dios
Es más grande que tu ídolo.*

Rabindranath Tagore

*Estamos más cercanos de los grandes
cuando somos grandes en humildad.*

Rabindranath Tagore

A dos hombres mágicos en mi vida Gaspar Vázquez M. (*q. e. p. d*) y a Rafael Murillo López (*q. e. p. d*) que llenaron mi vida luz, ilusión y esperanza.

A Lorenza Martínez Sabino por siempre dar lo mejor de su persona para ayudarme a salir adelante. Mamá mi cariño, respeto y admiración hacia ti son infinitos.

A Álvaro Vázquez M. por siempre contar con su amor, apoyo, comprensión y compañía.

A mi maravillosa pandilla, mis hermanos, José Luis, Fernando, Rafael, Margarita, Ricardo, Alejandro, Francisco Javier y Juan Alberto, que han sido mis grandes amigos, cómplices y confidentes de tantas y tantas aventuras de mi vida.

A mis sobrinos, Edgar, Cristian, Ivette, Alí, Jenifer, Brian, Itzel y Evelin, por su amor y ante todo por su maravillosa amistad.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Edith Ponce Alquicira, por confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollar este proyecto, por su paciencia infinita para escucharme en momentos difíciles y siempre brindarme su apoyo, por resolver mis múltiples dudas, y sobre todo por su gran amistad.

Mis más sinceros agradecimiento a la Dra. Isabel Guerrero Legarreta y al Dr. Salvador Tello, mis asesores, por su apoyo incondicional y por sus aportaciones científicas a este proyecto.

A Miguel Ángel García S., por ser mi confidente y amigo, por transmitirme todos sus conocimientos de química y por estar conmigo en todo momento.

A la Dra. Blanca García Almendáres, por brindarme su amistad y apoyo, por sus consejos y por sus maravillosas e interesantes pláticas.

A Doris, mi gran amiga, por su motivación y por su amistad.

A Juan Manuel Regalado M. y a su hermosa familia, por ser una parte clave en mi vida y quienes me brindaron su amistad y su cariño para llenar mi vida de paz en momentos complicados.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de bioquímica de macromoléculas, Miriam Ivette, Lety, Elvia, Miriam, Rodrigo, Víctor, Yenizey, Gabriela, Isadora, Octavio, Raquel, Jarumi, Marisol, por sus consejos, por su apoyo y por su amistad.

A todos mis amigos y compañeros de licenciatura y de generación de maestría por compartir momentos inolvidables.

La presente tesis de maestría forma parte del proyecto titulado “Estudio de la actividad antimicrobiana y funcional de recubrimientos comestibles adicionados con bacteriocinas”, apoyado por Fondo de Investigación Científica Básica SEP-CONACYT 2006, con número de solicitud 053658.

Índice General

Resumen	i
Abstract	iii
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	x
Índice de ecuaciones	xii
1. Introducción	1
2. Justificación	4
3. Revisión Bibliográfica	5
3.1 Importancia e innovación de los empaques en alimentos.....	5
3.2 Películas y recubrimientos comestibles.....	6
3.3 Películas elaboradas a partir de proteínas.....	8
3.4 Aislado de proteína del suero de leche.....	8
3.4.1. Aplicaciones de las proteínas del suero de leche.....	12
3.5 Empaques Activos.....	14
3.5.1 Empaques activos con actividad antioxidante.....	17
3.5.2 Empaques activos con actividad quelante.....	17
3.5.3 Empaques activos con actividad antimicrobiana.....	18
3.6 Bacteriocinas.....	20
3.7 Lactoferrina, Sistema lactoperoxidasa y Glucosa oxidasa.....	25
4. Objetivos	29
5. Hipótesis	30
6. Metodología	31
6.1 Materiales empleados para la elaboración de películas con actividad Antimicrobia.....	31
6.2 Estudios preliminares para la selección de agentes antimicrobianos.....	31
6.2.1 Producción, aislamiento y purificación de la bacteriocina producida por <i>Pediococcus Parvulus MXVK 133</i>	32
6.2.2. Cuantificación de la actividad antimicrobiana.....	33
6.2.3. Preparación del sistema lactoperoxidasa.....	33
6.2.4. Prueba de turbidez.....	34
6.3 Elaboración de las soluciones formadoras de películas (SFP).....	35
6.4 Elaboración de películas con actividad antimicrobiana adicionadas con glucosa oxidasa y/o nisina.....	36
6.5 Microorganismos y medios de cultivo.....	36
6.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de películas.....	37
6.7 Evaluación de propiedades fisicoquímicas y mecánicas de películas elaboradas a partir de APSL.....	37
6.7.1 Espesor.....	37
6.7.2 Transparencia.....	38
6.7.3 Resistencia a la punción.....	39
6.7.4 Determinación de la solubilidad en agua.....	39
6.7.5 Hidrofobicidad.....	40
6.8 Estudio estructural por espectroscopia infrarroja (IR).....	41
6.9 Análisis estadístico.....	41
7. Resultados y discusión	42
7.1 Estudios preliminares.....	42

7.1.1. Obtención y purificación de la bacteriocina.....	42
7.1.2. Optimización del sistema lactoperoxidasa.....	42
7.1.3. Prueba de turbidez.....	43
7.2 Obtención de películas.....	46
7.3 Actividad antimicrobiana de películas adicionadas con N y/o GO.....	49
7.4 Propiedades fisicoquímicas y mecánicas.....	52
7.4.1 Espesor.....	52
7.4.2 Transparencia.....	54
7.4.3 Resistencia a la punción.....	56
7.4.4 Hidrofobicidad.....	58
7.4.5 Determinación de la solubilidad en agua.....	61
7.5 Espectros IR.....	63
8. Conclusiones.....	66
9. Perspectivas.....	68
10. Referencias.....	69
11. Anexo I.....	77

Índice de Tablas

Tabla 3.1. Aplicación y función de películas y/o recubrimientos comestibles elaborados con distintos biomateriales.....	7
Tabla 3.2. Ejemplos de aplicaciones de envasados activos en alimentos.....	15
Tabla 3.3. Propiedades de películas y/o recubrimientos comestibles.....	16
Tabla 3.4. Agentes antimicrobianos incorporados en películas y/o recubrimientos elaborados con distintos biomateriales.....	19
Tabla 3.5. Clasificación de las bacteriocinas según Cotter <i>et al.</i> , (2005).....	21
Tabla 6.1. Concentración y proporción de los componentes de LPOS.....	34
Tabla 7.1. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de <i>E. faecalis</i>	45
Tabla 7.2. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de <i>L. innocua</i>	45
Tabla 7.3. Efecto antimicrobiano de las películas de APSL adicionadas con N y/o GO elaboradas a dos valores distintos de pH.....	50
Tabla 7.4. Espesores de películas de APSL elaboradas a diferentes valores de pH y adicionadas con y sin N y/o GO.....	53
Tabla 7.5. Transparencia de películas de APSL y adicionadas con N y/o GO a diferentes concentraciones y elaboradas a dos valores de pH 8.5 y 5.5.....	55
Tabla 7.6. Resistencia al punto de punción de las películas elaboradas a dos valores distintos de pH y a diferentes concentraciones de antimicrobianos.....	58
Tabla 7.7. Grado de hidrofobicidad de películas elaboradas a dos valores de pH y adicionadas con N y/o GO.....	59
Tabla 7.8. Porcentaje de solubilidad de las películas la concentración de proteína en la solución empleada para disolver la película.....	62

Índice de Figuras

Figura 3.1. Estructura primaria de la β -lactoglobulina.....	10
Figura 3.2. Estructura primaria de la α -Lactoalbúmina.....	11
Figura 3.3. Fuerzas moleculares implicadas en las interacciones proteína-proteína.....	13
Figura 3.4. Mecanismo de acción de las bacteriocinas ácido lácticas que consiste principalmente en la formación de poros en la membrana celular.....	24
Figura 3.5. Mecanismo de acción del sistema lactoperoxidasa.....	26
Figura 3.6. Reacción enzimática de glucosa oxidasa.....	27
Figura 3.7. Reducción del H_2O_2	28
Figura 7.1. Cambios de absorbancia (a 600 nm) de medio CGB (10 mL) conteniendo diferentes porcentajes (p/v) de LPOS y/o pediocina e inoculado con un mililitro de <i>Enterococcus faecalis</i> con densidad óptica de 0.3.....	43
Figura 7.2. Cambios de absorbancia (a 600 nm) de medio TSB (10 mL) conteniendo diferentes porcentajes (p/v) de LPOS y/o pediocina e inoculado con un mililitro de <i>Listeria Innocua</i> con densidad óptica de 0.3.....	44
Figura 7.3. Película elaborada a partir de APSL sin N y/o GO (a), y película de APSL adicionadas con GO (b), N (c) y la mezcla de N y GO (d).....	48
Figura 7.4. Actividad antimicrobiana de las película a pH 5.5 contra <i>E. faecalis</i> . En la figura se muestra halos de inhibición causado por la combinación de GO y N a diferentes concentraciones dentro de la película.....	49
Figura 7.5. Espectro IR de películas de APSL a pH 5.5 y sometidas a un tratamiento térmico de 70°C por 72 h.....	64
Figura 7.6. Espectro IR de películas de APSL a pH 8.5 y sometidas a un tratamiento térmico de 70°C por 72 h.....	64

Figura 7.7. Espectro IR de películas de APSL a pH 5.5, adicionadas con N y GO a altas concentraciones y sometida a un tratamiento térmico de 70°C por 72 h.....65

Figura 7.8. Espectro IR de películas de APSL a pH 8.5, adicionadas con N y GO a altas concentraciones y sometida a un tratamiento térmico de 70°C por 72 h.....65

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1: Transparencia.....	38
Ecuación 2: Porcentaje de solubilidad en agua.....	39

1. Introducción

El crecimiento de microorganismos es una de las principales causas de deterioro en los alimentos lo cual afecta económicamente a la industria de los alimentos y a la salud de los consumidores. El desarrollo microbiano se inicia generalmente en la superficie de los productos, afectando sus propiedades sensoriales y nutricionales, además de poner en riesgo la salud humana.

La contaminación de alimentos por microorganismos como *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, se ha convertido en una preocupación dentro de la industria alimentaria debido a que pueden estar presentes tanto en carne fresca, como en productos cárnicos, vegetales y en productos alimenticios mínimamente procesados, y además están asociados con enfermedades gastrointestinales severas.

La función primaria de los empaques es la de contener al producto y actuar como una barrera de protección frente al medio ambiente, brindar integridad física y facilitar el manejo de alimentos en la cadena de comercialización y distribución. Entre la gama de empaques se encuentran los “empaques activos”, que son aquellos empaques que además de proporcionar protección frente al medio ambiente, oxígeno y humedad, pueden presentar actividad antioxidante, quelante y/o antimicrobiana (Tu y Mustapha, 2002; Oussalah *et al.*, 2004; Min y Krochta, 2005a; Min *et al.*, 2005b; Rojas-Graü *et al.*, 2006; Han y Krochta 2007; Tapia *et al.*, 2007). Los hay además de distintos tipos de materiales que les dan la propiedad de ser o no biodegradables. Los empaques biodegradables pueden ser elaborados a partir de proteínas, lípidos y/o polisacáridos; mientras que los no biodegradables están hechos a base de polímeros plásticos. Dichos empaques

tienen dos objetivos principales: extender el periodo de conservación, además de facilitar el procesamiento y consumo de los alimentos (Fernández, 2000).

La función de las películas como empaques o recubrimientos biodegradables es reducir la migración de la humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas, lípidos, además de servir como vehículo de acarreamiento de ingredientes activos (Krochta y De Mulder-Johnson, 1997).

Existen varios estudios sobre la incorporación de compuestos antimicrobianos en una gran variedad de materiales formadores de películas. Sin embargo son muy pocos los estudios realizados en relación con los factores que podrían afectar la actividad antimicrobiana, las propiedades mecánicas y de barrera, así como, la difusión de agentes antimicrobianos adicionados.

La incorporación de agentes antimicrobianos a empaques tiene ventajas relevantes en la industria alimentaria, ya que pueden aumentar la vida de anaquel de los alimentos y evitar la adición directa de aditivos a los alimentos (Rojas Gante, 2005). En los últimos años, la incorporación directa de conservadores químicos al alimento ha sido cuestionada cada vez más por el consumidor, ya que estamos en una era de los productos “mínimamente procesados” (Cudjoe y Kapperud, 1991; Stiles, 1996). La tendencia de consumir alimentos frescos y con un bajo nivel de procesamiento ha motivado diversas investigaciones relacionadas con el diseño de nuevos empaques para la conservación de los alimentos entre los que se encuentran las películas comestibles adicionadas con agentes antimicrobianos naturales tales como: ácidos orgánicos, bacteriocinas (nisina, pediocina, lacticina), enzimas (lisozima, lactoferrina), extractos de especias, el sistema lactoperoxidasa, entre otros (Delves-Broughton *et al.*, 1998; Han, 2000; Min *et al.*, 2005 b; Rojas-Graü *et al.*, 2006).

Las películas comestibles y/o recubrimientos, proporcionan una barrera de protección adecuada y mantienen el color en los alimentos durante la distribución y almacenamiento (Min y Krochta, 2005a). Existen proteínas como zeína, el aislado de proteína de suero de leche y proteína de soya que combinadas con agentes plastificantes (glicerol o sorbitol) que en solución pueden moldearse fácilmente para la fabricación de recubrimientos y/o películas comestibles (Krochta y De Mulder-Johnson, 1997).

En general las películas y recubrimiento comestibles presentan propiedades mecánicas y de barrera inferiores a las películas plásticas, pero la principal ventaja es que son comestibles y reducen la contaminación del ambiente pues están elaboradas a partir de materiales biodegradables. Las propiedades fisicoquímicas, mecánicas como flexibilidad, transparencia, porcentaje de elongación, entre otras, están relacionadas con la naturaleza del material utilizado para la elaboración de películas comestibles. Dichas propiedades mecánicas de las películas son muy importantes ya que aumentan la integridad del alimento, apariencia y previenen la rancidez del alimento (Rojas-Graü *et al.*, 2006; Gontard *et al.*, 1992; Choi y Han, 2002).

En el presente trabajo se elaboraron películas comestibles a partir de aislado de proteína de suero de leche, en las que se incorporaron dos agentes antimicrobianos naturales a dos diferentes concentraciones, nisina y glucosa oxidasa, esta última es una enzima que forma parte del sistema lactoperoxidasa. Por otra parte, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y mecánicas, además se realizó un estudio estructural de las películas por medio de espectroscopia infrarroja.

2. Justificación

La incorporación de agentes antimicrobianos como bacteriocinas y enzimas con función antimicrobiana en recubrimientos o películas comestibles, permite su liberación gradual y controlada, prolongando así su acción bioprotectora. Estructuralmente la bacteriocina nisina presenta estabilidad en un amplio intervalo de pH y en altas temperaturas manteniendo su actividad inhibitoria contra microorganismos Gram-positivos como *Listeria monocytogenes*. La glucosa oxidasa es una enzima que forma parte del sistema lactoperoxidasa y tiene un amplio espectro de inhibición particularmente contra bacterias Gram-negativas. Glucosa oxidasa en combinación con la nisina podrían aumentar el espectro inhibitorio en los empaques comestibles. La eficiencia de los agentes antimicrobianos naturales incorporados a películas y recubrimientos comestibles ha sido poco investigada es de ahí la importancia de estudiarlos, así como también el efecto que tienen su incorporación sobre las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de las películas.

En trabajos anteriores reportados en la literatura se probó que las películas elaboradas a partir de proteína del aislado de suero de leche pueden contener a la nisina para inhibir el desarrollo de microorganismos como *L. monocytogenes*, sin embargo, el espectro de acción es limitado. La incorporación de nisina mezclada con glucosa oxidasa podría ampliar el efecto antimicrobiano en las películas de aislado de proteína de suero de leche.

3. Revisión Bibliográfica

3.1 Importancia e innovación de los empaques en alimentos

El periodo de conservación, es el tiempo necesario para que el alimento se encuentre en condiciones aceptables para su consumo, desde una perspectiva nutricional, microbiológica o de seguridad. El uso empaques para la preservación de alimentos durante el periodo de almacenamiento se ha utilizado desde hace ya varias décadas, algunos de estos empaques están elaborados de distintos materiales como cueros, hojas de plantas, papel, plásticos, entre otros; muchos de ellos son biodegradables o pueden reciclarse; sin embargo, el mismo proceso de reciclado puede ser una fuente de contaminación para el medio ambiente.

La demanda de alimentos mínimamente procesados ha traído como consecuencia la generación de un gran número de investigaciones e innovaciones de nuevos empaques con propiedades antimicrobianas. Dichos empaques pueden actuar como vehículo de compuestos activos como ácidos orgánicos, agentes antioxidantes, antimicóticos, extractos de especias, lisozima, antibióticos, el sistema lactoperoxidasa, bacteriocinas, y lactoferrina entre otros (Han, 2000; Oussalah *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2005a; Min *et al.*, 2005c). Dentro de los materiales formadores de películas a base de proteína destacan: el aislado de proteína de suero de leche, la proteína de soya, y zeína, entre otras.

3.2 Películas y recubrimientos comestibles

El uso de películas comestibles para extender la vida útil de los alimentos no es un nuevo concepto. En China durante el siglo XII y XIII, los recubrimientos elaborados a base de cera se aplicaban a limones y naranjas para evitar su desecación (Kester y Fennema, 1986). Más tarde, en el siglo XVI se aplicaron por primera vez los recubrimientos hechos a base de lípidos (Cutter y Sumner, 2002). Sin embargo, las patentes en películas comestibles surgieron en el año de 1950, e incluyen películas comestibles de almidón, lípidos y gomas, éstas fueron utilizadas para reducir la pérdida de humedad durante la congelación de carne, en productos derivados de aves y del mar (Guilbert *et al.*, 1996).

Las barreras comestibles producidas a partir de fuentes renovables tienen la misma función que los materiales plásticos, con la ventaja de ser fácilmente biodegradados. Adicionalmente, se ha explorado el uso de subproductos de la industria cárnica como gelatina, keratina, proteínas miofibrilares de pescado y quitosano obtenido de caparzones de crustáceos en la fabricación de películas y recubrimientos (Krochta y De Mulder-Johnson, 1997).

Distintos tipos de empaques como recubrimiento o películas, hechos a base de proteínas tienen la propiedad de ser biodegradables (Cho *et al.*, 2002) y poseen propiedades de permeabilidad de vapor de agua similares a los empaques no biodegradables elaborados con polímeros sintéticos. Las películas comestibles a base de proteínas y/o lípidos pueden actuar como barrera contra: el vapor de agua, aromas, oxígeno y solutos diversos, aumentando con esto la vida de anaquel de alimentos envasados dentro de ellas (**tabla 3.1**).

La aplicación de recubrimientos comestibles en carne y productos cárnicos ofrecen las siguientes ventajas: reducen la pérdida de humedad, previenen la formación de exudado, retardan la oxidación de lípidos cuando se emplean materiales con baja permeabilidad al oxígeno y reducen la absorción de compuestos volátiles que deterioran el sabor.

Los empaques fabricados con lípidos pueden actuar fácilmente como barrera al vapor de agua por sus características hidrofóbicas. En carne y productos cárnicos es fundamental prevenir la pérdida de humedad y la oxidación. Se han empleado monoacilglicéridos con varios grados de acetilación para mantener el color y la calidad general de carne de res, cerdo y pollo en refrigeración o congelación. Sin embargo, después de un almacenamiento prolongado la cobertura tiende a fragmentarse y aparecen sabores ácidos o amargos.

Tabla 3.1. Aplicación y función de películas y/o recubrimientos comestibles elaborados con distintos biomateriales.

Biomaterial	Aplicación en alimentos	Función
Lípidos (ceras, grasas o aceites)	Frutas frescas Vegetales Carnes frescas: res, cerdo, pollo y pescado Carnes refrigeradas	<ul style="list-style-type: none"> • Barrera al vapor de agua y oxígeno.
Polisacáridos (almidón, alginatos, carragenina, celulosa, quitosano, gomas, amilosa, entre otros)	Carnes refrigeradas: res, cerdo, pollo, pescado y mariscos Carnes procesadas	<ul style="list-style-type: none"> • Reduce la pérdida de humedad • Barrera a gases (CO₂ y O₂).
Proteínas (colágeno, gelatina, proteínas de la leche, gluten de trigo, proteínas de soya, zeína, proteínas de cacahuete)	Carne fresca: res, cerdo, pollo, pavo, pescado y mariscos Carnes procesadas Cacahuates Tabletas farmacéuticas	<ul style="list-style-type: none"> • Barrera al vapor de agua • Barrera a gases (CO₂ y O₂).

(Gennadios et al., 1997)

Evaluación de propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas de películas comestibles adicionadas con nisina y/o glucosa oxidasa

3.3 Películas elaboradas a partir de proteínas

Las proteínas del gluten de trigo, aislado de soya y aislado de proteína de suero de leche son biomateriales empleados para la fabricación de películas. Cada tipo de proteína brinda distintas propiedades fisicoquímicas y mecánicas a las películas comestibles; la incorporación y liberación de sustancias activas dentro de las películas elaboradas a base de proteínas depende tanto de la clase de proteína con la que fue laborada la película, así como de la estructura molecular del compuesto activo (Ko *et al.*, 2001). En la literatura se ha reportado que las películas elaboradas con proteínas adicionadas con agentes antimicrobianos pueden ampliar la vida de anaquel de alimentos como la carne fresca, pavo, productos cárnicos, productos de confitería y palomitas (Gennadios *et al.*, 1997; Fu *et al.*, 1999; Theivendran *et al.*, 2006).

3.4 Aislado de proteína del suero de leche

El suero líquido de la leche, es un producto proveniente de la manufacturación de quesos. El aislado de proteína del suero de leche (APSL) contiene un 90% de proteína del suero y un 10% de otros compuestos, está integrado por 4 tipos de proteínas (α -Lactoalbuminas, β -Lactoglobulinas, albúminas del suero, Inmunoglobulinas, y macropéptidos), lípidos, lactosa y minerales. Las proteínas que se encuentran en mayor cantidad en el aislado de proteína del suero de leche son las β -Lactoglobulinas (50%) y α -Lactoalbuminas (22%).

La desnaturalización de estas proteínas por tratamientos térmicos se da en un intervalo de 50 a 70°C y es acompañada por el desdoblamiento de la

estructura proteica y la exposición de grupos SH e hidrofóbicos. Cuando las proteínas del suero están desnaturalizadas, se vuelven insolubles y forman agregados (Townend y Gyuricsek, 1973; Onwulata *et al.*, 2005). El efecto del desdoblamiento de la estructura nativa de las proteínas, promueve el establecimiento de interacciones hidrofóbicas y enlaces disulfuro (Guckian *et al.*, 2005). Últimamente se ha reportado que las proteínas del aislado del suero de leche forman geles y películas insolubles debido a los diversos tipos de interacciones intermoleculares que se generan después de su desnaturalización (Smith, 1994; Torres, 1994).

β -lactoglobulina

β -lactoglobulina (**figura 3.1**), es la más abundante de las proteínas del suero y contiene 162 residuos de aminoácidos dentro de su estructura. La β -lactoglobulina en su estructura secundaria contiene un 10% de α -hélices, 43% laminas β antiparalelas y 47% de estructura desordenada. La presencia de dos enlaces disulfuro y de un grupo tiol libre, provoca una estructura espacial relativamente rígida, éste grupo tiol libre puede variar entre los residuos de aminoácidos 119 y 121 (Cheftel *et al.*, 1989). La proteína es de tipo globular con una masa molecular de 18,400 Da (Kontopidis *et al.*, 2004). Las β -lactoglobulinas se pueden asociar según el pH del medio: y se presenta como monómero arriba del pH 8 y como dímero en un intervalo de pH entre 5 y 8, que se polimeriza en octámero, cuando el pH varía de 3.5 a 5.2 (Gálvez *et al.*, 2006). La interacción de grupos tioles e hidrofóbicos, de las β -lactoglobulinas después la termodesnaturalización son los responsables primarios de la formación de películas (Maté y Krochta, 1995).

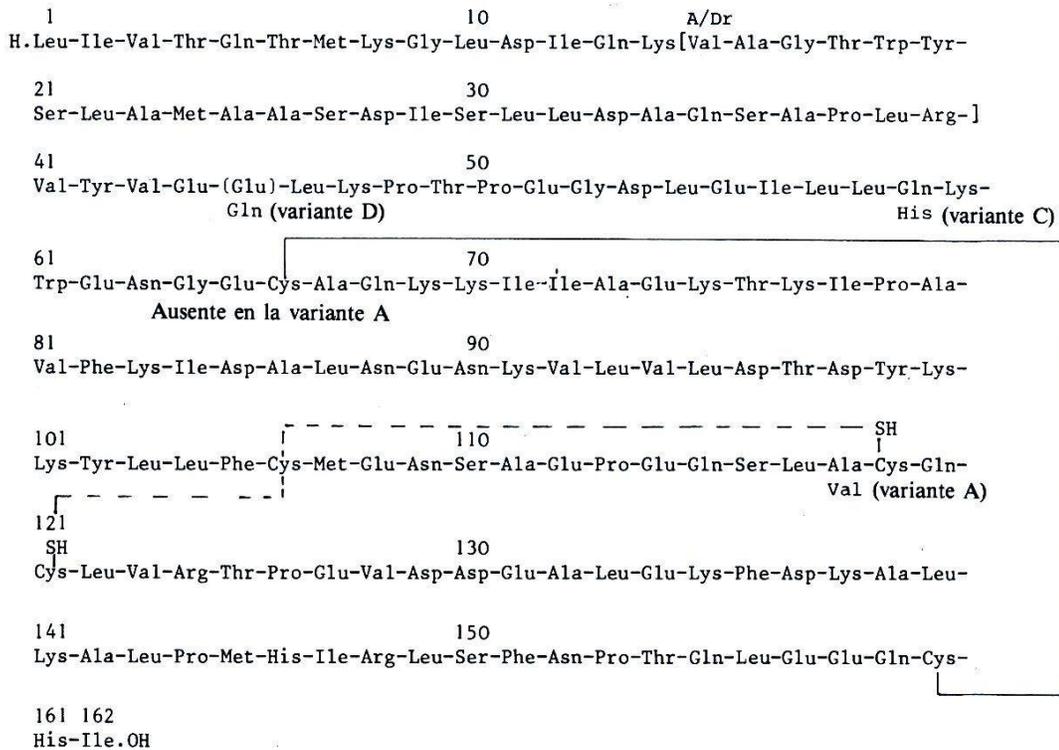


Figura 3.1. Estructura primaria de la β-lactoglobulina (Cheftel *et al.*, 1989).

α-Lactoalbúmina

Es la segunda proteína en importancia del suero de la leche, la **figura 3.2** muestra su secuencia de residuos de aminoácidos. Tiene actividad biológica ya que es parte constitutiva del sistema enzimático requerido para la síntesis de la lactosa y al igual que la β-lactoglobulina es una proteína globular. La masa molecular reportada de la α-Lactoalbúmina varía entre 15 y 16 kDa; sin embargo, la masa calculada a partir la composición de residuos de aminoácidos es de 14,437 Da (Ebner y Brodbeck, 1968). Contiene residuos de ácido glutámico y leucina en posiciones terminales, tiene un alto contenido de residuos de triptófano en toda su estructura y además cuatro enlaces disulfuro. No presenta grupos sulfhidrilo libres a pesar de alto su contenido de cisteína. Al igual que la β-

lactoglobulina, se puede cristalizar fácilmente y muestra complejos fenómenos de asociación-disociación dependientes del pH y cambios de conformación.

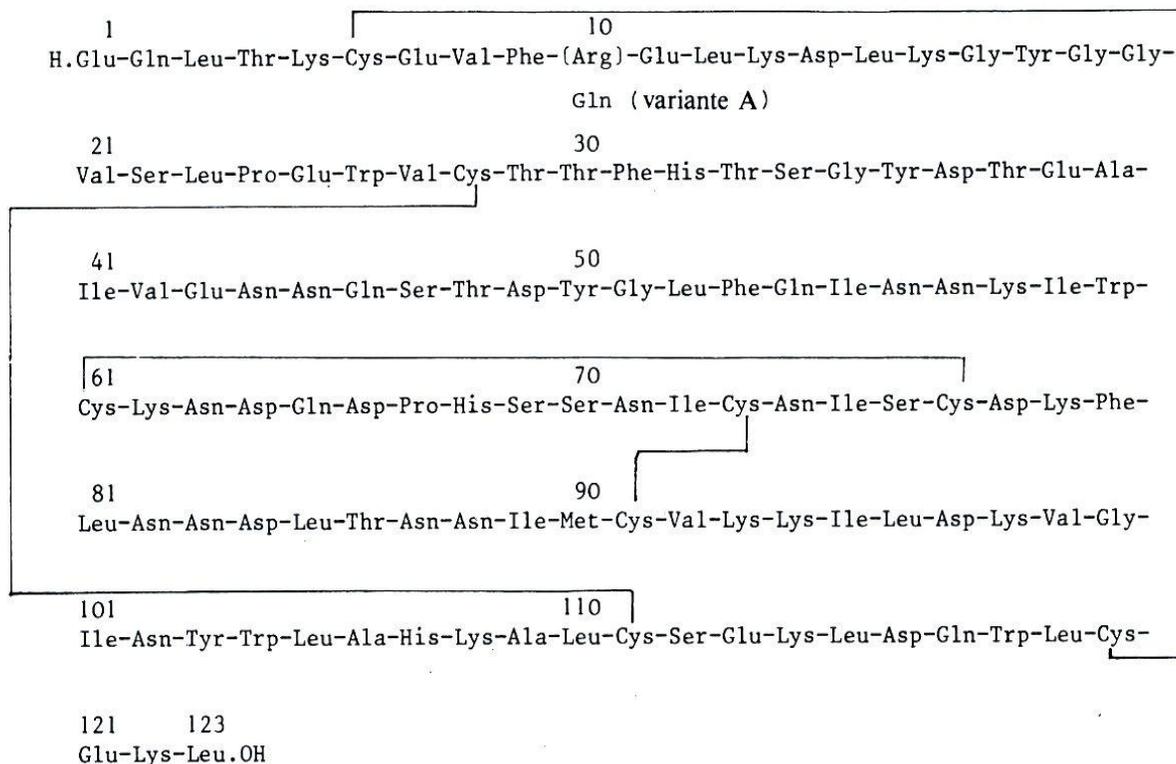


Figura 3.2 Estructura primaria de la α -Lactoalbúmina (Cheftel *et al.*, 1989).

Seroalbúmina

Proteína globular que contiene 582 aminoácidos y su masa molecular es de 66,000 Da representa el 7% de las proteínas del suero y contiene 17 enlaces disulfuro. Pueden unirse a otras moléculas como ácidos grasos libres que estabilizan a la molécula de seroalbúmina contra la desnaturalización por tratamientos térmicos (Cheftel *et al.*, 1989).

Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas suman el 10% de de todas las proteínas del lactosuero, constan de moléculas de glucoproteínas con alto contenido de grupos azufrados.

La concentración relativamente baja de inmunoglobulina hallada en la leche normal, actúa conjuntamente con la fase lipídica para el fenómeno de formación de nata. Parece que las inmunoglobulinas son monómeros o polímeros de una molécula de cuatro cadenas entrecruzadas, con puentes disulfuro. Las estructuras primarias de las inmunoglobulinas son específicas según su origen, por lo que estas proteínas sólo son heterogéneas cuando se consideran en el conjunto de las proteínas lácteas (Cheftel *et al.*, 1989).

3.4.1. Aplicaciones de las proteínas del suero de leche

La capacidad de interacción de las proteínas del suero con moléculas de la misma o de otra especie, carbohidratos y lípidos, las convierte en un material versátil para su aplicación en productos alimenticios y en la fabricación de películas y/o recubrimientos que brindan protección al alimento como una barrera inerte (Di Pierro *et al.* 2006).

Recientemente se han fabricado películas y recubrimientos comestibles a base de proteínas de aislado de suero de leche. La elaboración de las películas depende de las condiciones de tratamiento térmico y de los valores de pH empleados. La desnaturalización de las proteínas del aislado de suero de leche por tratamiento térmico induce a una modificación en su estructura secundaria y/o terciaria donde se exponen grupos de los residuos de aminoácidos que posteriormente forman interacciones intermoleculares, de tipo fuerzas de van der

Waals, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, enlaces disulfuro y puentes de hidrógeno (**figura 3.3**); y todas estas interacciones ayudan a la formación de películas. El tipo de interacción que se da entre las proteínas después de la desnaturalización para favorecer la formación de las películas pueden o no afectar sus propiedades mecánicas (Wooster *et al.*, 2006). A pesar de que los enlaces disulfuro juegan un papel más importante que las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno en la formación de las películas de APSL (Guckian *et al.*, (2005); Fairley *et al.*, (1996)) demostraron que en las matrices de las películas con una alta cantidad de puentes de hidrógeno afectan la permeabilidad al vapor de agua de las películas sin importar que dentro de la misma matriz existan pocos enlaces disulfuro.

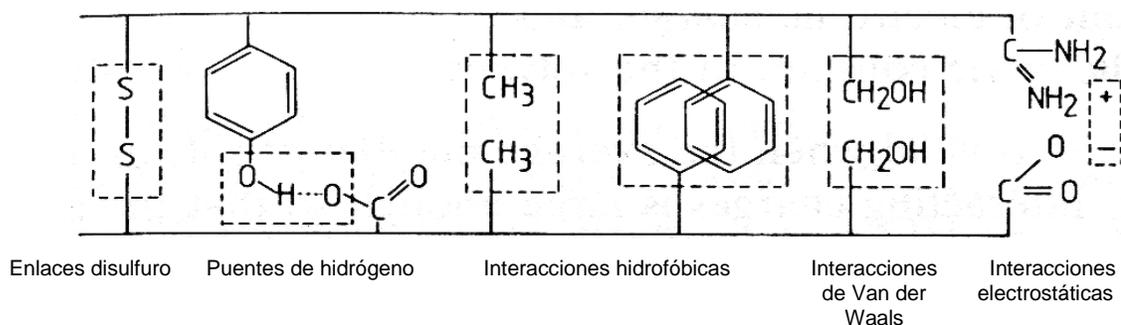


Figura 3.3. Fuerzas moleculares implicadas en las interacciones proteína-proteína (Howell, 1991).

El APSL adicionado con agentes plastificantes (glicerol, sorbitol, etc.) forma películas insolubles en agua, transparentes, de aroma y sabor suave, flexibles, blandas, biodegradables y con excelentes propiedades mecánicas (Mate y Krochta 1995; Miller *et al.*, 1998; Jiancai y Hongda, 2000).

Las películas y recubrimientos de APSL tienen un gran potencial de aplicación en la industria alimentaria para aumentar el periodo de conservación en productos como chocolates, dulces, helados y productos cárnicos.

3.5 Empaques Activos

Los empaques convencionales o tradicionales durante muchos años han sido utilizados para actuar como una barrera inerte entre el producto y su entorno. Las nuevas necesidades de los consumidores por adquirir alimentos con el menor procesamiento posible, frescos y con una apariencia agradable han traído como consecuencia el desarrollo de nuevos empaques. Entre las innovaciones más interesantes se encuentran los “envases activos”, donde el empaque además de tener las funciones de un envase convencional cambian activamente la condición del envase del alimento para extender la vida útil o para mejorar la seguridad y propiedades sensoriales, mientras mantiene la calidad del producto envasado.

El empaque activo puede ser diseñado como un dispositivo para llevar a cabo funciones específicas (Rooney, 2003). El tipo de dispositivo puede ser elaborado de distintos tipos de materiales que le brinden la propiedad de ser o no biodegradable. Recientemente se han realizado investigaciones sobre diversos tipos de compuestos activos incorporados dentro de éstos dispositivos con la finalidad de que desempeñen funciones determinadas como lo son: capturar gases, O₂, CO₂, regular la humedad, eliminar olores y sabores. En la **tabla 3.2** se puede observar algunos ejemplos de empaques activos, así como, las funciones que desempeñan cada uno de ellos.

Tabla 3.2. Ejemplos de aplicaciones de envasados activos en alimentos (Fernández, 2000)

Técnica	Dispositivo	Principio/reactivo	Aplicación
Absorbentes de humedad	Laminas	Sales de poliacrilato Amidas modificadas	Productos frescos
Reguladores de humedad	Sobres Etiquetas Películas	Gel de sílice Propilenglicol Ceras Chocolate	Carne y pescados frescos Verduras frescas Frutos secos Galletas y aperitivos
Tratamiento antivaho	Películas	Etoxilatos no iónicos Monoglicéridos	Verduras frescas
Absorbentes de O ₂	Sobres Etiquetas Bandejas Películas Tapones	Hierro en polvo Ácido ascórbico Enzimas (glucosa oxidasa)	Todo tipo de alimento
Absorbentes de CO ₂	Sobres	Hidróxido cálcico	Café tostado
Emisores de CO ₂	Sobres	Bicarbonato sódico	Verduras Frutos secos
Absorbentes de etileno	Sobres Películas	Reactivos (permanganato potásico) Materiales absorbentes (carbón activo, zeolita)	Verduras frescas
Envasado antimicrobiano	Sobres Películas	Etanol Ácidos orgánicos Plata Enzimas (glucosa oxidasa) Bacteriocinas	Productos de panadería Frutas
Eliminación de olores y sabores desagradables y otros componentes	Películas	Ácidos orgánicos Resinas Enzimas (naringinasa, β-galactosidasa, colesterol reductasa)	Pescado Productos grasos Zumos Leche
Incorporación de aditivos	Películas comestibles	Aromas BHT	Frutas Cereales
Procesamiento en el envase	Películas Envases especiales	Enzimas Cloruro de calcio + agua Cloruro amónico + agua Susceptores	Fermentaciones diversas Bebidas Microondas
Indicadores	Temperatura O ₂ /CO ₂ Crecimiento microbiano	Polimerización Fusión de compuestos Reacciones enzimáticas Indicadores redox Indicadores de pH Detección de metabolitos	Cadena de frío Tratamientos térmicos Uso culinario Envasado al vacío Envasado aséptico

Entre los distintos tipos de empaques activos se encuentran las películas comestibles que pueden utilizarse tanto para el control de la deshidratación de los alimentos frescos y congelados como para evitar la absorción de humedad en los alimentos deshidratados (Fernández, 2000). En la literatura se han reportado diversas investigaciones relacionadas con películas comestibles adicionadas con sustancias activas en donde enfocadas al uso de aislado de proteína del suero de leche como material formador de películas combinado con agentes plastificantes como glicerol, sorbitol, manitol, entre otros (Gounga *et al.*, 2007). Las últimas investigaciones han enfocado su atención en el desarrollo de empaques activos y biodegradables, incluyendo películas elaboradas a partir de proteínas como caseína, gelatina, proteínas de soya, proteínas aisladas del suero de leche y zeína. Los empaques activos han mostrado tener propiedades físicas adecuadas y son excelente barrera de protección para los alimentos. No obstante, son una barrera pobre frente a la humedad. Por ello que se ha propuesto la adición de lípidos, como el ácido esteárico, para disminuir la permeabilidad al vapor de agua (Perez-Gago y Krochta, 2000).

Los empaques activos elaborados a partir de polímeros naturales son sugeridos para la aplicación en alimentos por tener las propiedades señaladas en la **tabla 3.3** (Torres, 1994).

Tabla 3.3. Propiedades de películas y/o recubrimientos comestibles

Control de la migración/ pérdida de humedad
Control de intercambio de gases (O ₂ , CO ₂ , C ₂ H ₄ , entre otros)
Control de absorción/migración de aceites y grasas
Control de la migración de solutos
Control de migración, pérdida o intercambio de sabor
Control de migración, pérdida o intercambio de sabor color, antimicrobianos y otros aditivos de alimentos.
Prevención o control de fotodegradación-oxidación
Mejorar las propiedades mecánicas de envasado de los alimentos

3.5.1 Empaques activos con actividad antioxidante

La incorporación de ascorbilo, palmitato, α -tocoferol y aceites esenciales dentro de empaques activos llámese películas o recubrimientos, pueden evitar la oxidación de los ácidos grasos de los alimentos envasados dentro de ellos (Tovar *et al.*, 2005; Salmieri y Lacroix, 2006; Han y Krochta, 2007).

Las películas elaboradas a partir de las proteínas del aislado de suero de leche adicionadas con aceites de extractos naturales (orégano, salvia, romero, ajo y pimiento morrón) tienen efectos antimicrobianos y antioxidantes, que pueden ser útiles en la industria alimentaria ya que pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y de descomposición como *Salmonella* y *Pseudomonas*; además pueden ser aplicados en productos derivados como carnes rojas, aves y mariscos (Oussalah *et al.*, 2004).

3.5.2 Empaques activos con actividad quelante

Los empaques adicionados con agentes quelantes como citratos, lactatos, pirofosfatos y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), son empaques que evitan el deterioro de los alimentos causados por iones metálicos divalentes como Fe^{2+} , Ca^{2+} , y Cu^{2+} , éstos iones metálicos en algunos de los casos resultan necesarios para el crecimiento de microorganismos, por lo que los agentes quelantes pueden actuar también como agentes antimicrobianos

Las últimas investigaciones hechas sobre empaque con actividad quelante se han enfocado en el uso de EDTA. Los empaques adicionados con EDTA combinados con otros agentes antimicrobianos tienen la capacidad de ampliar el

espectro inhibitorio contra *Listeria innocua* y *Brochothrix thermosphacta* (Tu y Mustapha, 2002).

3.5.3 Empaques activos con actividad antimicrobiana

La función que tienen estas películas y/o recubrimientos adicionados con sustancias activas como agentes antimicrobianos es inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos o causantes de deterioro de los alimentos. Dentro de las películas comestibles con actividad antimicrobiana se han incorporado las bacteriocinas (nisina y pediocina) y algunas enzimas con actividad antimicrobiana como lactoferrina y lizosima (Delves-Broughton *et al.*, 1998; Han, 2000; Ko *et al.*, 2001; Min *et al.*, 2005b).

Recientemente, se ha reportado la incorporación de dos o más antimicrobianos naturales como LPOS, lactoferrina, extractos de plantas y bacteriocinas con el objetivo de ampliar el espectro inhibitorio y controlar el crecimiento de microorganismos deteriorantes y/o patógenos presentes en alimentos (Theivendran *et al.*, 2006). Estas investigaciones son muy importantes debido a que tienen como finalidad aumentar la vida de anaquel del producto envasado y/o reducir la aparición de cepas resistentes que son de alto riesgo para la salud.

En la **tabla 3.4** se reportan algunos estudios recientes relacionados con los diversos tipos de agentes antimicrobianos incorporados en matrices de películas comestibles.

Tabla 3.4. Agentes antimicrobianos incorporados en películas y/o recubrimientos elaborados con distintos biomateriales.

biomaterial	Agente Antimicrobiano	Microorganismo inhibido	Referencia
Aislados de proteína de soya o gluten de trigo	Nisina	<i>L. monocytogenes</i>	Ko <i>et al.</i> , (2001)
Proteína de soya	Nisina y/o extracto de semilla de uva o té verde.	<i>L. monocytogenes</i>	Theivendran <i>et al.</i> , (2006)
Aislado de proteína de suero de leche	Aceites esenciales de orégano o pimienta	<i>E. coli</i> <i>Pseudomonas</i>	Oussalah <i>et al.</i> , (2004)
	Lactoferrina, lactoferrina hidrolisada y sistema lactoperoxidasa.	<i>Penicillium commune</i>	Min y Krochta, (2005 ^a)
	Sistema lactoperoxidasa	<i>L. monocytogenes</i>	Min <i>et al.</i> , (2005 ^b)
	Lactoferrina, lizosima y sistema lactoperoxidasa.	<i>Salmonella entérica</i> <i>E. coli</i>	Min <i>et al.</i> , (2005 ^c)
	Ácido p- aminobenzoico o ácido ascórbico	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> <i>Salmonella Typhimurium</i>	Cagri <i>et al.</i> , (2001)
	Ácido p- aminobenzoico	<i>L. monocytogenes</i>	Cagri <i>et al.</i> , (2003)
Quitosano	Ácido esteárico	<i>L. monocytogenes</i>	Möller <i>et al.</i> , (2004)
	Nisina	<i>Aspergillus niger</i> <i>Kocuria rhizophila</i>	Sebti <i>et al.</i> , (2007)
	Aceite de ajo, sorbato de potasio o nisina.	<i>E. coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>Bacillus cereus</i>	Pranoto <i>et al.</i> , (2005)
Zeina	Lizosima o EDTA	<i>E. coli</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Güçbilmez <i>et al.</i> , (2006)
Puré de manzana	Aceites esenciales de orégano o canela	<i>E. coli</i>	Rojas-Graü <i>et al.</i> , (2006)
Alginato	Aceite de orégano o canela.	<i>Salmonella Typhimurium</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Oussalah <i>et al.</i> , (2007).

3.6 Bacteriocinas

Las bacterias acidolácticas (BAL) han recibido la atención de muchos investigadores en los últimos años. Algunos de estos microorganismos poseen la capacidad de producir péptidos antimicrobianos capaces de inhibir el crecimiento de bacterias taxonómicamente relacionadas. Estas sustancias se denominan bacteriocinas y resultan de gran interés por su aplicación en la conservación de alimentos. Las bacteriocinas son péptidos sintetizados ribosomalmente con actividad bactericida o bacteriostática, en general estos péptidos catiónicos bioactivos y antipáticos, tienen en su estructura grupos tioéteres, enlaces disulfuro o grupos tioles libres (Ray *et al.*, 2001).

La actividad bactericida la ejercen principalmente contra patógenos Gram-positivos desestabilizando la función de la membrana. Se caracterizan por tener una serie de propiedades comunes, tales como la sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas, tolerancia térmica, estabilidad a bajo pH y acción antibacteriana. Debido a su naturaleza proteica, las bacteriocinas son inactivadas por las proteasas durante su paso por el tracto digestivo al ser ingeridas, evitando así el problema de resistencia o inhibición de la flora intestinal. En los últimos años, han sido secuenciadas aproximadamente 20 bacteriocinas producidas por bacterias acidolácticas. La mayoría contienen menos de 60 aminoácidos. El punto isoeléctrico de éstas moléculas varía dentro de un intervalo de 8.6 a 10.4 (Ray *et al.*, 2001).

La clasificación de las bacteriocinas ha sido reportada según sus características genéticas y bioquímicas (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996; Nes *et al.*, 2007). Cotter *et al.*, (2005) propusieron una clasificación (**tabla 3.5**), en donde los lantibióticos quedan agrupados en la clase I y las bacteriocinas carentes de lantionina se agrupan en la clase II. Un tercer grupo de bacteriocinas

corresponde a aquellas que son termolábiles y de elevada masa molecular, con actividad hidrolítica, denominadas bacteriolisinas. Estos autores no incluyen a las bacteriocinas de la Clase IV porque no se ha demostrado fehacientemente su existencia. Heng y Tagg (2006) propusieron una nueva clasificación de bacteriocinas, en la respetan la agrupación de Cotter y col. (2005) con respecto a la clase I y II, pero a la clase III la dividen en dos tipos: IIIa bacteriolíticas y IIIb no líticas, y la clase IIc ahora en agrupada como la clase IV para péptidos cíclicos.

Tabla 3.5. Clasificación de las bacteriocinas según Cotter *et al.*, (2005)

Clasificación*	Comentario sobre la clasificación	Ejemplos
<i>Clase I</i>	Incluye de uno a dos péptidos lantibióticos.	Un único péptido: nisina, mersacidina, lacticina 481
Contiene lantionina Bacteriocinas/lantibióticos	11 subclases han sido propuestas.	Dos péptidos: lacticina 3147, citolisina.
<i>Clase II</i>	Clase heterogénea de péptidos pequeños IIa: tipo pediocina IIb: dos péptidos IIc: cíclicas, formalmente clase V IId: péptido lineal no tipo pediocina.	Clase IIa: pediocina PA, Leucocina A Clase IIb: lacticina F Clase IIc: enterocina AS48, reuterina 6 Clase IId: lactococina A, divergicina A
<i>Bacteriolisinas</i> Proteínas no bacteriolíticas**		Proteínas grandes, termolábiles, muchas veces hidrolasas.

*Bacteriocinas clase IV sin fracción proteica no son incluidas porque aún no han sido demostradas

**Sugiere que éstas no han logrado ser consideradas como bacteriocinas.

La nisina fue descubierta en 1933 pero no fue hasta 1971 donde se reveló su estructura molecular. En año de 1953 en Inglaterra se convierte en la primera bacteriocina comercializada y desde entonces ha sido aprobada en 48 países para ser utilizada en alimentos. Nisina fue aceptada en 1969 por la FAO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization (WHO) como un aditivo para alimentos. En 1988 fue aprobada por la FDA (por sus siglas en ingles, Food Drug

Agency). Hasta ahora la nisina es la única bacteriocina purificada disponible comercialmente.

La bacteriocina nisina es producida de modo natural por cepas de *Lactococcus lactis*. Está compuesta por 34 aminoácidos; su masa molecular es de aproximadamente 3.5 kDa, y su punto isoeléctrico es de 10.1. De acuerdo con la clasificación de Cotter *et al.*, (2005), la nisina es una bacteriocina de la clase I. Contiene cinco anillos dentro de su estructura los cuales le dan su característica antibiótica. Existen tres variantes de nisina, A, Z y Q, cuya actividad antimicrobiana es muy semejante, estructuralmente sólo varían en algunos aminoácidos (Twomey *et al.*, 2002; Zendo *et al.*, 2003).

El uso simultáneo de dos o más bacteriocinas no sólo puede disminuir la dosis de bacteriocina adicionada, sino también puede ampliar el espectro antimicrobiano siempre y cuando no sean de la misma clase (Gravesen *et al.*, 2002). La combinación de agentes antimicrobianos de carácter proteico como las enzimas lactoferrina y lactoperoxidasa con nisina tiene un efecto sinérgico contra bacterias Gram-positivas. Los componentes fenólicos, carvacrol, timol o eugenol, de los aceites esenciales combinados con nisina actúan sinérgicamente contra los microorganismos *B. cereus* y/o *L. monocytogenes*; mientras que la combinación de nisina con extracto de canela actúan como un bactericida contra *Salmonella thyphimurium* y *E. coli* O157:H7 en jugo de manzana (Gálvez *et al.*, 2007).

Las pediocinas también denominadas “*pediocin-like*” pertenecen a la clase IIa según la clasificación propuesta por Cotter *et al.*, (2005). La característica más importante de este grupo la constituye su gran efectividad contra *Listeria* (Bennik *et al.*, 1997). La pediocina PA-1 es producida por varias cepas de *P. acidilactici* provenientes de productos cárnicos (Bhunja *et al.*, 1988), y por cepas de *P. parvulus* provenientes de vegetales (Bennik *et al.*, 1997). A partir de la

caracterización de la PA-1 (A_{CH}) muchos estudios se han realizado sobre este tipo de bacteriocinas. La pediocina PA-1 está constituida por 44 aminoácidos, con una masa molecular estimada de 4,628 Da (Ray y Miller, 2000) y posee dos enlaces disulfuro, que sumados a una secuencia de 5 aminoácidos (Y-G-N-G-V, presente en todas las bacteriocinas de éste grupo), serían indispensables para su actividad bactericida. Presenta carácter hidrofóbico debido al contenido relativamente alto de aminoácidos no polares, característica por la cual tiende a formar agregados (Ray y Miller, 2000).

Las bacteriocinas se han convertido en una opción atractiva para ser usadas como aditivos en los alimentos debido a su origen natural y a su actividad antimicrobiana. La nisina es la única bacteriocina permitida para ser aplicada en alimentos, y se encuentra en el mercado con el nombre de Nisaplin bajo la marca de Danisco. El uso de pediocina PA-1 para la biopreservación ha sido comercializado por Quest con el nombre de ALTA 2431.

La aplicación de las bacteriocinas en alimentos tiene varias ventajas: primero, son sustancias “generalmente reconocidas como seguras” (GRAS), segundo, tienen un amplio espectro inhibitorio incluyendo a los microorganismos patógenos. Tercero, son moléculas termoestables; cuarto, no son de riesgo para la salud; quinto, su inclusión en productos podría brindarle varios efectos positivos como mejorar su seguridad, cualidades y sabor. De acuerdo a lo reportado por Cotter *et al.*, (2005) el mecanismo de acción de las bacteriocinas es el que se representa en la **figura 3.4**.

El espectro de inhibición de las bacteriocinas incorporadas a las películas o recubrimientos comestibles se encuentra limitado a microorganismos Gram positivos, tales como *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *S. aureus* y algunas otras bacterias lácticas.

A pesar de que los reportes referentes a empaques con bacteriocinas, la mayoría se enfocan únicamente en la incorporación de nisina, existen otro tipo de bacteriocinas que pueden ser útiles para ampliar el espectro inhibitorio antimicrobiano como la pediocina que puede ser una buena opción para ser adicionada a los empaques activos debido a que presenta un espectro de inhibición amplio contra bacterias Gram-positivas como lo son *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y muchas especies del genero *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Lactococcus*. Algunas bacterias Gram-Negativas también pueden ser inhibidas por la presencia de pediocina, por ejemplo *Salmonella*, *E. coli* y *Pseudomonas*. Siempre que tengan un daño a nivel membrana o pared celular.

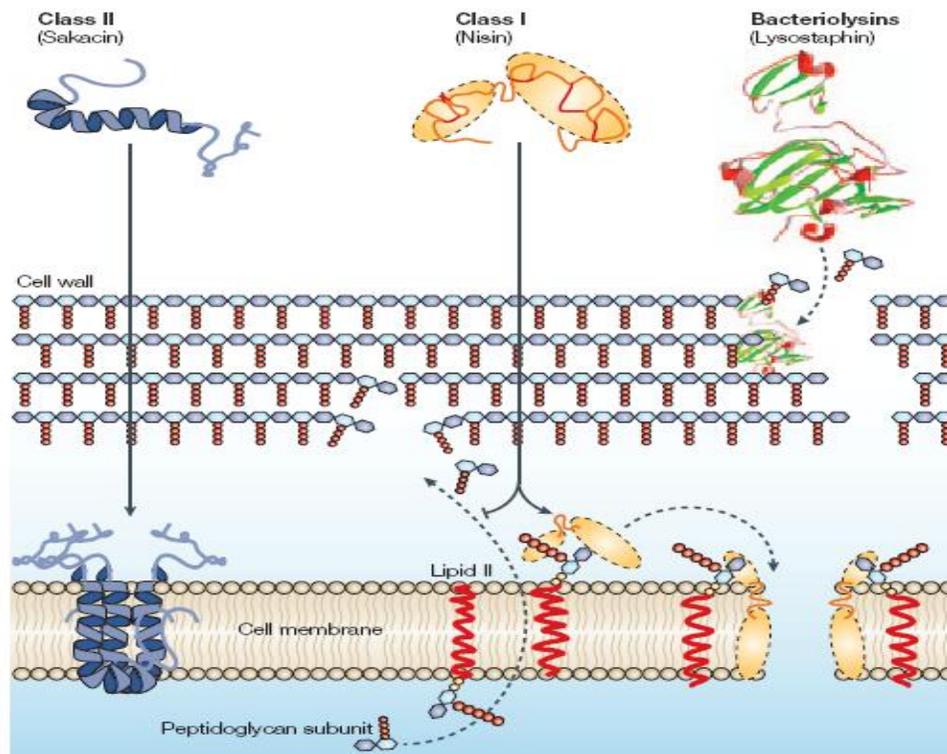


Figura 3.4. Mecanismo de acción de las bacteriocinas ácido láctico que consiste principalmente en la formación de poros en la membrana celular (Cotter *et al.*, 2005).

3.7 Lactoferrina, Sistema lactoperoxidasa y Glucosa oxidasa.

Recientes investigaciones han reportado la actividad antibacteriana de lactoferrina (LF) contra *Salmonella* y *E. coli* (Min y Krochta., 2005a; Min *et al.*, 2005c).

La lactoferrina es una glicoproteína que puede actuar como agente quelante del hierro y su mecanismo de acción como agente antimicrobiano natural consiste en inhibir a los microorganismos por el un déficit de hierro que en éste caso se convierte en un componente esencial no disponible para los microorganismos.

El sistema lactoperoxidasa (LPOS) es un sistema complejo que está integrado por: lactoperoxidasa (LPO), glucosa oxidasa (GO), α -D-glucosa (Glu), tiocianato de potasio (KSCN) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estudios realizados por Min y Krotchta, (2005b) señalan que éste sistema incorporado dentro de matrices de películas elaboradas a partir de APSL puede inhibir o eliminar el crecimiento algunos tipos de bacterias Gram negativas y/o Gram positivas.

El mecanismo de acción del LPOS (**Fig. 3.5**), es complejo que se basa en la oxidación del ion tiocianato (SCN^-) y la formación de compuestos como el hipotiocianato (OSCN) y otros derivados, los cuales promueven la oxidación de grupos sulfhidrilo de enzimas y otras proteínas microbianas. El daño ocasionado a nivel de membrana celular provoca la pérdida de potasio, aminoácidos y péptidos, que eventualmente producen la muerte celular de bacterias.

Los últimos estudios realizados sobre empaques con agentes antimicrobianos han reportado que los empaques con el LPOS tienen mayor

efecto inhibitorio que los empaques que contienen lactoferrina (Min y Krochta, 2005a; Min *et al.*, 2005c).

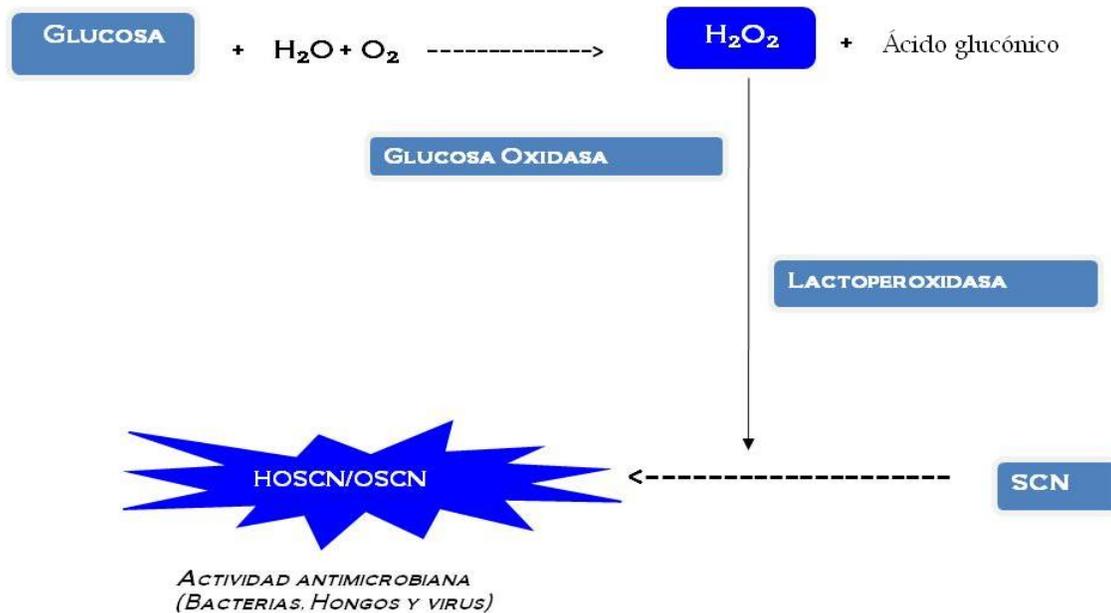


Figura 3.5. Mecanismo de acción del sistema lactoperoxidasa

La glucosa oxidasa, enzima oxido reductasa, es uno de los componentes del sistema lactoperoxidasa. La síntesis de glucosa oxidasa ocurre a partir de *Aspergillus niger*. Una función importante de la glucosa oxidasa cuando es incorporada en alimentos es eliminar la glucosa que se uno de los factores de oscurecimiento (Valdés, 2006). La glucosa oxidasa es una de las más importantes enzimas con función antimicrobiana en el procesado de alimentos que cataliza la formación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y ácido glucónico a partir de glucosa, agua y oxígeno (figura 3.6). La incorporación de glucosa oxidasa en películas sólo ha sido como componente del sistema lactoperoxidasa (Min y Krochta, 2005a; Min *et al.*, 2005c).



Figura 3.6. Reacción enzimática de glucosa oxidasa.

La actividad antimicrobiana del ácido glucónico al igual que los ácidos orgánicos se debe a las moléculas no disociadas del compuesto. Algunos ácidos no disociados son muy solubles en las membranas celulares. Únicamente los ácidos orgánicos, lipófilos muestran actividad antimicrobiana. Según una hipótesis, estos compuestos inhiben el crecimiento de los microorganismos, por interferir con la permeabilidad de la membrana celular al producir un desacoplamiento en el transporte de sustratos y en la fosforilación oxidativa del sistema transportador de electrones. Este fenómeno da lugar a la acidificación del contenido celular, que es probablemente la principal causa de la inhibición y muerte de los microorganismos. El pKa (pH en el cual el 50 % del ácido se halla no disociado) de los ácidos orgánicos empleados como conservadores se halla en el rango de pH de 3-5. Al bajar el pH de un alimento, aumenta la proporción de las moléculas no disociadas de un determinado ácido orgánico, aumentando de esta forma su efectividad como agente antimicrobiano. Estas consideraciones limitan la utilidad de los ácidos orgánicos a aquellos alimentos de pH inferior a 5.5. Los ácidos orgánicos se utilizan principalmente como agentes micostáticos. Sin embargo, a concentraciones elevadas, son muy eficaces frente a diversos microorganismos (incluidos los virus). La mayor parte de los ácidos orgánicos son muy poco eficaces como inhibidores del crecimiento microbiano a valores de pH de 5,5-5,8 en los que crecen la totalidad de las bacterias causantes de toxiinfecciones y la mayor parte de las causantes de alteración. Constituyen una excepción los ésteres

del ácido parahidroxibenzoico, con un $pK_a=8.5$, que muestran actividad antimicrobiana a valores de pH próximos a la neutralidad, y los ácidos propiónico y sórbico que también poseen cierta actividad a $pH = 6.0$ ó 6.5 (Doores, 2005).

Por otra parte, H_2O_2 es conocido como un desinfectante y conservador natural, está presente en la leche, en la miel, y en las membranas mucosas de la boca. Existen numerosas teorías sobre el mecanismo de acción del H_2O_2 en cuanto a la destrucción de las células microbianas. La teoría más prevalente es la teoría de la formación de radicales libres hidroxilo que son formados durante la reducción del H_2O_2 (**Figura 3.7**).



Figura 3.7. Reducción del H_2O_2 .

El hidróxido radical es altamente reactivo con los lípidos de la membrana microbiana, DNA y otros componentes de la membrana.

El H_2O_2 tiene una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias, levaduras, hongos y virus. Aunque también se ha observado que la actividad antimicrobiana del H_2O_2 es mayor en bacterias gran-negativas que en gran-positivas (Cords *et al.*, 2005).

4. Objetivos

Objetivo General

Estudiar el efecto de la adición de bacteriocinas (nisina o pediocina) con y sin la combinación del sistema lactoperoxidasa o glucosa oxidasa como agentes antimicrobianos en las películas comestibles de aislado de proteínas de suero de leche.

Objetivos particulares

1. Estudiar el efecto de la incorporación de bacteriocinas (nisina o pediocina) con y sin la combinación del sistema lactoperoxidasa o glucosa oxidasa en películas elaboradas a partir del aislado de proteína de suero de leche y evaluar su actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Brochothrix thermosphacta* (NCIB10018), *Escherichia coli* (JMP101) y *Enterococcus faecalis* (MXVK22).
2. Evaluar las propiedades fisicoquímicas (transparencia e hidrofobicidad) y mecánicas (espesor, resistencia al punto de punción y solubilidad en agua) de las películas.
3. Estudiar la microestructura de las películas elaboradas con aislado de proteína de suero de leche mediante espectroscopia infrarroja.

5. Hipótesis

Las bacteriocinas (nisina y pediocina) y el sistema lactoperoxidasa son agentes antimicrobianos de bajo y amplio espectro, respectivamente. Si se adicionarán ambos agentes a películas comestibles se ampliará el espectro inhibitorio sin alterar las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de dichas películas.

6. Metodología

6.1 Materiales empleados para la elaboración de películas con actividad antimicrobiana.

El material que se utilizó para la producción de películas fue el aislado de proteína de suero de leche (APSL) el cual fue donado por Bipro, Davisco Foods International, Le Sueur, MN., E.U.A; como agente plastificante se usó glicerol (J. T. Baker Chemical Co., NJ., E.U.A), y los agentes antimicrobianos seleccionados para ser incorporados en las películas fueron: Glucosa Oxidasa (GO) (151000 U/g), Nisina (N) (2.5%) ambos de Sigma-Aldrich (Alemania), y pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133.

6.2 Estudios preliminares para la selección de agentes antimicrobianos

Se realizaron pruebas de inhibición contra los microorganismos *Listeria innocua* (ATCC 33090) y *Enterococcus faecalis* (MXVK22) para seleccionar el agente antimicrobiano a incorporar dentro de las películas de APSL en donde se utilizaron la pediocina y el sistema lactoperoxidasa como agentes antimicrobianos.

Sin embargo, debido al costo y a la baja estabilidad que presentó el sistema lactoperoxidasa se decidió remplazar los agentes antimicrobianos por nisina y glucosa oxidasa.

6.2.1 Producción, aislamiento y purificación de la bacteriocina producida por

Pediococcus Parvulus MXVK 133

La producción, extracción y purificación de la pediocina se realizó mediante el método de adsorción-desorción sobre células productoras reportado por Yang *et al.*, (1992). Para ello, se utilizó un cultivo de *P. parvulus* en fase estacionaria temprana (12 h) crecido en medio caldo caseína glucosa (CGB) y posteriormente se le ajustó el pH a 5.5. Después se aplicó un tratamiento térmico de 70°C durante 30 minutos, con el fin de inactivar a las proteasas presentes, el cultivo se mantuvo con agitación constante por 4 horas a 4 °C para favorecer la absorción de la bacteriocina sobre las propias células de *P. parvulus*. Posteriormente, las células se colectaron por centrifugación a 15,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante para colectar las células con ayuda de una solución amortiguadora de fosfatos 5 mM a pH 6.5 y posteriormente éstas se resuspendieron en una solución de NaCl 100mM a pH 2 (ajustado con ácido fosfórico al 5%) agitando durante 10 h para permitir una máxima desorción de la bacteriocina, nuevamente las células se removieron por centrifugación y el extracto libre de células se esterilizó con una membrana de microfiltración PVDF (di-fluoruro de polivinilideno, Millipore, Irlanda) con poro de 22 µm. El filtrado obtenido se dializó contra agua destilada durante aproximadamente 48 h, y con varios recambios hasta eliminar completamente las sales, utilizando una membrana de diálisis con tamaño de corte de 1000 kDa (Sigma-Aldrich, San Luis, MO., E.U.A). Finalmente el extracto obtenido se deshidrató empleando una liofilizadora (Labconco Corporation., Kansas, MI., E.U.A).

6.2.2. Cuantificación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de la pediocina producida por *Pediococcus Parvulus* MXVK 133 se evaluó mediante el método de difusión en agar reportado por Bhunia *et al.*, (1988). Para ello, sobre una capa de agar caldo de soya y tripticaseína (TSB, 1.5 % de agar, adicionado con 0.5% de extracto de levadura; Bioxon, Becton Dickinson, Edo Méx., México) se colocó una capa de agar suave (0.8%) de 10 mL del mismo medio, previamente inoculado con un cultivo fresco de *L. innocua* ($10^5 - 10^6$ UFC/mL). Después de haber solidificado la capa de agar al 0.8% se hicieron pozos de 6 mm de diámetro, los cuales posteriormente se llenaron con 30 μ L de diluciones seriadas de dos en dos del extracto semipurificado de la bacteriocina. Posteriormente, las cajas se almacenaron durante 4 h a 4°C para permitir la difusión de la bacteriocina en el agar, posteriormente se incubaron a 37°C por 24 h. La actividad de la bacteriocina, expresada en Unidades Arbitrarias/mL, se calculó como el inverso de la más grande dilución que produjo un halo de inhibición de al menos 2 mm de diámetro, sobre la capa de agar que contenía el microorganismo sensible.

6.2.3. Preparación del sistema lactoperoxidasa

Para preparar el sistema lactoperoxidasa (LPOS) fue necesario tomar en cuenta que cada uno de sus componentes (Lactoperoxidasa (LPO), glucosa oxidasa (GO), α -D-glucosa (Glu), tiocianato de potasio (KSCN) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)) estuviera en las concentraciones y proporciones óptimas (**tabla 6.1**).

Algunas de consideraciones importantes para preparar el sistema lactoperoxidasa fueron las siguientes y son reportadas en la literatura por Y.

Adolphe *et al.*, (2006): (i) La presencia de suficiente tiocianato (SCN-) da una actividad óptima a LPO; (ii) una concentración insuficiente de SCN- puede dar una inactivación reversible de LPO; (iii) Un exceso de H₂O₂ produce una inactivación irreversible de LPO.

Tabla 6.1. Concentración y proporción de los componentes de LPOS.

Componente de LPOS	Concentración	Proporción en volumen
LPO	23800 IU/L	1
GO	17520 IU/L	0.05
Glu	38 mM	5
KSCN	50 mM	1
H ₂ O ₂	13 mM	1.5

Cada uno de los componentes de LPOS fue disuelto en buffer de fosfatos 5 mM a pH 6.5. La solución se incubó a 23°C ± 2 °C por 24 h con agitación de 160 rpm (Min y Krotchta, 2005a; Min *et al.*, 2005b). La solución LPOS no se utilizó con más de un día de almacenamiento.

6.2.4. Prueba de turbidez

La pediocina fue disuelta en agua, esta solución se esterilizó con una membrana de microfiltración PVDF (0.2 µm) posteriormente fue colocada en

tubos que contenían 10 mL con medio caldo caseína glucosa (CGB) y caldo de soya y tripticaseína (TSB) previamente inoculados con un mililitro de los microorganismos *Enterococcus faecalis* y *L. innocua*, respectivamente, a una densidad óptica de 0.3. El porcentaje de bacteriocina colocado fue de 0.075% (p/v) y 0.09% (p/v). Para LPOS se hizo lo mismo que en el caso de la pediocina, en este caso no fue necesario disolver en agua al LPOS, la concentración colocada en cada uno de los tubos fue de 0.12% y 0.15%. En otra prueba de turbidez ambos agentes antimicrobianos fueron colocados a los porcentajes de 0.062% (p/v) de LPOS + (0.037% de pediocina y 0.070% (p/v) de LPOS + 0.045% (p/v) de pediocina. Una vez inoculados los tubos con los microorganismos sensibles, estos se incubaron a 37°C durante 5 días. El crecimiento de *Enterococcus faecalis* y *L. innocua* fue determinado midiendo la DO (densidad óptica) del caldo inoculado a una longitud de onda de 600 nm (Espectrofotómetro Beckman, DU 650). Se usó agua destilada como blanco para la medición de la absorbencia. La determinación se realizó por triplicado.

6.3 Elaboración de las soluciones formadoras de películas (SFP)

Las soluciones formadoras de películas se prepararon a dos distintos valores de pH, para ello se disolvieron 8.7 g de APSL en 100 mL de agua destilada junto con 3.7 g de glicerol como agente plastificante, posteriormente la SFP se dividió en dos fracciones y a cada una se le ajustó a pH de 5.5 y a 8.5 (HCl, 1.0 M o NaOH, 2.0 M) y se degasificaron por un tiempo de 20 minutos. Para inducir la desnaturalización de las proteínas la mezcla fue sometida a un tratamiento térmico dentro de un baño de agua a 90°C para la SFP a pH 8.5 durante 30 minutos (Ko *et al.*, 2001), y para la SFP a pH 5.5 se utilizó un tratamiento térmico menor, 70°C, para evitar la gelificación del APSL. Finalmente, las SFP se enfriaron en un recipiente con hielo.

6.4 Elaboración de películas con actividad antimicrobiana adicionadas con glucosa oxidasa y/o nisina.

Los agentes antimicrobianos nisina y/o GO se agregaron a 10 mL de la SFP a diferentes concentraciones (N, 0, 0.3 y 1.2; GO, 0, 2.4×10^{-3} , 0.05) en porcentaje de p/v. Después las SFP adicionadas con los agentes antimicrobianos N y/o GO se vertieron en placas vidrio (12 x 14 cm) previamente cubiertas con un forro adhesivo, y bordeadas con cinta adhesiva de 2.5cm de ancho y 1.2 mm de espesor. A continuación, dichas placas con SFP adicionadas con N y/o GO se dejaron secar a temperatura ambiente por un tiempo de 24 a 36 h. Finalmente, las películas se cortaron en secciones circulares de 6mm de diámetro y se almacenaron en refrigeración hasta la fecha de su uso. Se preparó una muestra control sin la adición de agentes antimicrobianos.

6.5 Microorganismos y medios de cultivo

Para evaluar la actividad antimicrobiana se probaron como microorganismos reto a *Brochothrix thermosphacta* (NCIB10018), *Escherichia coli* (JMP101), *Listeria innocua* (ATCC33090) y *Enterococcus faecalis* (MXVK22), los cuales fueron crecidos en el medio caldo de soya y tripticaseína (TSB) (Bioxon, Becton Dickinson, Edo Méx., México), y para *Enterococcus faecalis* se utilizó el medio caldo caseína glucosa (CGB). En cada uno de los medios preparado se adicionó 0.6% de extracto de levadura (Bioxon, Becton Dickinson, Edo Méx., México).

6.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de películas.

La determinación de la actividad antimicrobiana de películas con y sin nisina y/o GO, se realizó mediante el método de difusión en agar, para ello se utilizaron secciones de películas de 6 mm de diámetro (sección 6.4) que fueron colocadas sobre una capa de agar suave previamente inoculada con el microorganismo sensible (*B. thermosphacta*, *E. coli*, *E. faecalis* o *L. innocua*). Después se incubaron a 37°C durante 24 h. Finalmente, se determinó el halo de inhibición producido por las películas.

6.7 Evaluación de propiedades fisicoquímicas y mecánicas de películas

elaboradas a partir de APSL.

Se determinaron las propiedades fisicoquímicas (transparencia, hidrofobicidad y solubilidad en agua) y mecánicas (espesor y resistencia al punto de punción) de las películas. Para cada una de las diferentes formulaciones de las películas la determinación de las propiedades antes mencionadas se realizó por triplicado reportando el promedio.

6.7.1 Espesor

La determinación del espesor de las películas con y sin N y/o GO, se utilizó un micrómetro digital (293-811/ MDC-1; Mitutoyo, Japón). Diferentes secciones de cada una de las películas fueron colocadas de manera aleatoria dentro de los sujetadores del micrómetro. Posteriormente, fueron ajustados dichos sujetadores

con el tambor del mismo micrómetro. Finalmente, se tomaron las medidas del espesor registrados en la pantalla del instrumento.

6.7.2 Transparencia

La determinación de la transparencia se realizaron con secciones de películas de 2.5 cm² que se mantuvieron a 22°C y 55 % HR durante 24 h, dichos cortes fueron colocados en un aditamento especial para películas donde se midió la absorbencia a 600nm en un espectrofotómetro (UV-VISIBLE-NIR, Cary 5E, de VARIAN, Australia). La transparencia se reportó a corde con el método utilizado por Heng *et al.*, (2003) donde la transparencia es igual a la absorbencia de las películas a 600 nm. Otro método empleado para la evaluación de la transparencia de las películas fue el reportado por Choi y Han, (2002) en donde la transparencia es calculada mediante la siguiente ecuación.

$$Transparencia = \frac{A_{600}}{Espesor} \quad (1)$$

Donde A_{600} es la absorbencia de la película a 600 nm, estos valores fueron los mismos que se emplearon en el primer método para la determinación de la transparencia. El espesor fue el mismo obtenido para cada una de las películas en la sección 6.7.1.

6.7.3 Resistencia a la punción

La resistencia a la punción fue determinada utilizando un texturómetro (TA-XT2i, NY, E.U), acoplado a un software (Texture Expert V12), donde se hizo pasar un punzón con una fuerza de 0.981 N y a una distancia de ruptura de 10 mm en medio de segmentos de película de aproximadamente 5 cm². Finalmente se tomaron las lecturas del punto máximo absoluto registradas en el “software” del equipo.

6.7.4 Determinación de la solubilidad en agua

El método empleado para la determinación de solubilidad en agua fue el reportado por Gontard *et al.*, (1992) y por Ustunol y Mert (2004), con ligeras modificaciones. Secciones de películas de 2.5 cm² fueron secadas dentro de una estufa a una temperatura de 100°C por un tiempo de 24 h. Después, para obtener el peso seco inicial (PSI), se pesaron muestras de 0.55 gramos con ayuda de una balanza analítica. A continuación, las muestras de las películas fueron colocadas en 25 mL de regulador de fosfatos (pH 7.0; 10 mM) y se mantuvieron en agitación a 75 rpm con una temperatura de 25°C durante 36 h. Posteriormente, las películas se retiraron de la solución acuosa y se colocaron en una estufa a 100°C por 24 h. Finalmente, se pesaron los segmentos de película para determinar el peso de la película no solubilizada (PSNS). El porcentaje de material soluble se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Solubilidad} = \left(\frac{PSI - PSN}{PSI} \right) \times 100 \quad (2)$$

Adicionalmente por el método del ácido bicincónico se determinó la cantidad de proteína soluble presente en cada una de las soluciones de reguladoras en donde se mantuvieron las películas, para ello se empleó el kit BCA de Pierce (Rockford, IL, E.U.A). Este método está basado en la reducción en medio alcalino de Cu(II) a Cu(I) en medio alcalino y la formación de un complejo ácido bicincónico:Cu(I), con un máximo de absorbancia a 562 nm que se midió en un Espectrofotómetro Beckman, DU 650 (California, E.U.A). La concentración de proteína es proporcional a la intensidad de absorción.

6.7.5 Hidrofobicidad

Se determinó el grado de hidrofobicidad de cada una de las diferentes formulaciones de las soluciones formadoras de películas de APSL, para ello cada solución fue diluida de 0.001 a 0.05% en regulador de fosfatos (pH 7.0, 0.01 M). Se tomaron volúmenes de 4 mL de cada una de las disoluciones de SFP antes mencionadas se agregó 15 μ L de una solución 8mM de 1-anilino-8 naftaleno sulfonato (ANS, Sigma-Aldrich, Alemania), acorde con lo reportado por Boatright y Hettiarachi (1995). Posteriormente, se midió la intensidad de fluorescencia de las disoluciones de SFP a una longitud de onda de 390 nm (excitación) y 484 nm (emisión) empleando un espectrofluorómetro (ISS, Champaign, IL). Finalmente, la hidrofobicidad se calculó por regresión lineal a partir de la pendiente (grado de hidrofobicidad de SFP) graficando la intensidad de fluorescencia contra la concentración de proteína de los diferentes porcentajes de las disoluciones de SFP (**ANEXO I**).

6.8 Estudio estructural por espectroscopia infrarroja (IR)

Los estudios de espectroscopía infrarroja se hicieron con la finalidad de obtener información sobre los grupos funcionales principales de la matriz de la película elaborada a partir de APSL y el efecto que tienen pH en ellas. Para ello, a cada película se le aplicó un tratamiento térmico de 70 °C por 72 h para reducir el contenido de agua de las películas y aumentar la definición de las bandas de los espectros en el intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} . Finalmente, se obtuvieron los espectros empleando un equipo de IR (Perkin Elmer, Spectrum Gx, E.U.A.) de películas elaboradas con APSL elaboradas a valores de pH 5.5 y 8.5.

6.9 Análisis estadístico

Para el análisis de resultados se hizo un análisis de varianza (ANOVA), con tres replicas y con un nivel de significancia del 5%. Se utilizó el método de Duncan para la comparación de medias entre tratamientos para ello se empleó el paquete estadístico SPSS para Windows (SPSS 8.0, Inc., Chicago IL, E.U.A.).

7. Resultados y discusión

7.1 Estudios preliminares

7.1.1. Obtención y purificación de la bacteriocina

La producción y purificación de la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133 que se llevó a cabo por el método de adsorción-desorción sobre células productoras fue fundamental para la realización del proyecto, con el método antes mencionado se logró obtener pediocina purificada y liofilizada. La actividad de la pediocina fue de 1.8×10^6 UA/mL.

7.1.2. Optimización del sistema lactoperoxidasa

De acuerdo a las pruebas de turbidez realizadas con los microorganismos sensibles las concentraciones utilizadas para la realización del sistema lactoperoxidasa fueron las apropiadas debido a que LPOS demostró tener una alta actividad antimicrobiana, es importante señalar que al preparar LPOS se observó que un exceso de GLU también puede causar una disminución del efecto antimicrobiano de LPOS.

7.1.3. Prueba de turbidez

Los cambios de absorbancia del medio CGB conteniendo diferentes concentraciones de LPOS y/o pediocina después de haber sido inoculado con *E. faecalis* se muestran en la **figura 7.1**.

En el caso de LPOS, el crecimiento de *E. faecalis* en CGB fue menor utilizando un porcentaje 0.15% (p/v) que en 0.12% (p/v). La pediocina logró inhibir el crecimiento, aunque se utilizaron dos diferentes porcentajes de pediocina no se logro observar en una gran diferencia en la inhibición microbiana. LPOS y Pediocina, la combinación de ambos agentes antimicrobianos no inhibió el crecimiento de *Enterococcus faecalis* por al contrario, se observo un crecimiento del microorganismo igual o mayo al de concentración inicial, es decir el efecto fue bacteriostático.

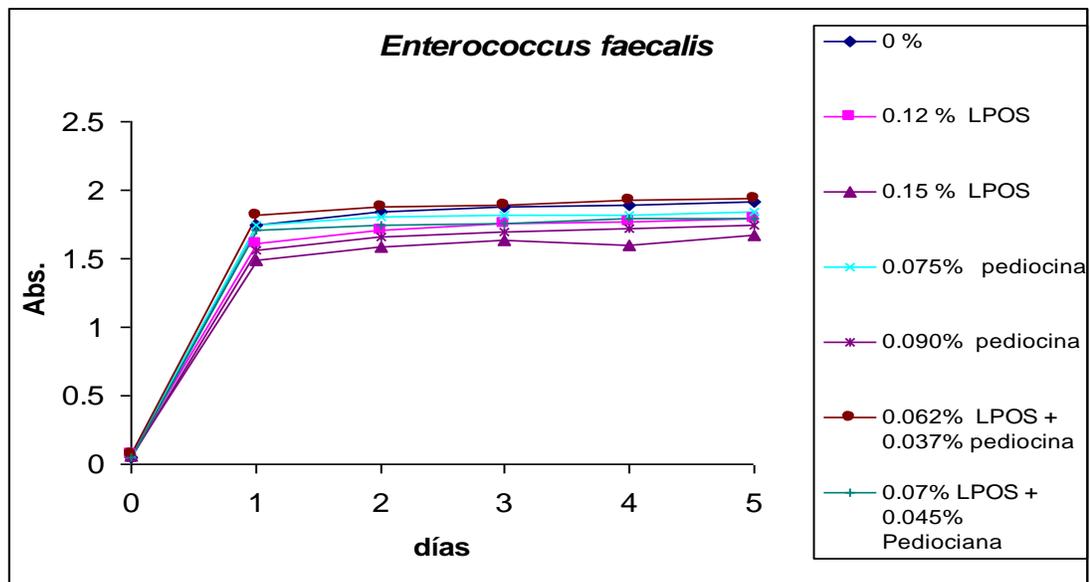


Figura 7.1. Cambios de absorbancia (a 600 nm) de medio CGB (10 mL) conteniendo diferentes porcentajes (p/v) de LPOS y/o pediocina e inoculado con un mililitro de *Enterococcus faecalis* con densidad óptica de 0.3.

El crecimiento de *L. innocua* en TSB fue monitoreado por 5 días, a este medio se le agregó diferentes porcentajes de LPOS y/o pediocina antes de ser inoculado con 1 mL de *Listeria innocua* con absorbancia de 0.3, los resultados obtenidos son ilustrados en la **figura 7.2**.

LPOS al 0.15% (p/V) logro inhibir del todo el crecimiento de *Listeria innocua*, durante los cinco días que fue monitoreada la muestra a diferencia de LPOS al 0.12% que tan sólo lo hizo por tres días, estos resultados coinciden con los reportados por Min y Krochta, (2005c) para *Salmonella enterica* donde LPOS controló su crecimiento por un tiempo de 6 días con concentraciones de LPOS que variaban de 0.5-3% en w/v.

La pediocina a los dos diferentes porcentajes mostró casi la misma inhibición el crecimiento de *Listeria innocua*. La combinación de LPOS y pediocina mostró una excelente inhibición microbiana pero tan solo por un día después se pudo observar que el crecimiento de *Listeria innocua* fue muy cercano al inicial.

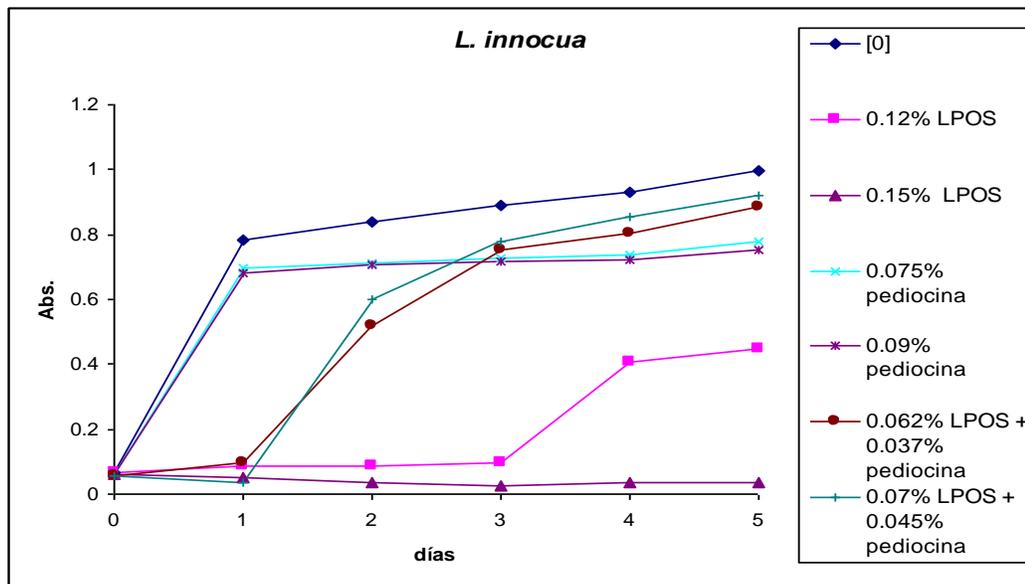


Figura 7.2. Cambios de absorbancia (a 600 nm) de medio TSB (10 mL) conteniendo diferentes porcentajes (p/v) de LPOS y/o pediocina e inoculado con un mililitro de *Listeria Innocua* con densidad óptica de 0.3.

Para poder conocer la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación (tabla 7.1 y 7.2) de cada uno de los microorganismos, se utilizó el programa Microfit (www.ifr.ac.uk/MicroFit/ - 19k), así se pudo corroborar que el agente antimicrobiano que tuvo mayor inhibición fue el LPOS al 0.15% (w/v) contra *L. innocua* y que la combinación de LPOS y pediocina los cuales no pudieron potencializar su efecto antimicrobiano, por el contrario, no mostraron efecto inhibitorio alguno contra *Enterococcus faecalis*.

Tabla 7.1. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de *E. faecalis*

% (w/v) Agente antimicrobiano	Velocidad de crecimiento (d^{-1})	Tiempo de duplicación (td)
0	6.65	0.10
0.12 LPOS	3.37	0.25
0.15 LPOS	3.12	0.22
0.075 Pediocina	7.75	0.09
0.09 Pediocina	6.17	0.11
0.062 LPOS + 0.037 Pediocina.	7.58	0.09
0.07 LPOS + 0.045 Pediocina	8.04	0.09

Tabla 7.2. Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de *L. innocua*.

% (p/v) Agente antimicrobiano	Velocidad de crecimiento (d^{-1})	Tiempo de duplicación (td)
0	0.65	1.07
0.12 LPOS	2.91	0.24
0.15 LPOS	0.00	99.9
0.075 Pediocina	3.22	0.22
0.09 Pediocina	3.87	0.18
0.062 LPOS + 0.037 Pediocina.	1.84	0.38
0.07 LPOS + 0.045 Pediocina	1.94	0.36

Las pruebas de turbidez realizadas fueron contundentes al demostrar que el uso LPOS y pediocina mezclados no inhibe el crecimiento de *Enterococcus faecalis* y *L. Innocua*. Suponemos que es debido a que el ion hipotiocianato (OSCN^-) pudo interactuar con la pediocina (polipéptido de carácter catiónico), ya que ambas poseen cargas totales opuestas en solución. Si bien la bacteriocina está cargada positivamente y el ion hipotiocianato, producido por LPOS, tiene carga negativa al ser mezclados pudieron haber neutralizado sus cargas provocando una disminución en su efecto antimicrobiano. Por lo antes mencionado, no es recomendable incorporar estos dos agentes antimicrobianos a las películas. Además cabe señalar que el sistema lactoperoxidasa es un sistema bastante complejo e inestable, además resulta ser un agente antimicrobiano de elevado costo.

7.2 Obtención de películas

Considerando lo resultado obtenidos en el trabajo preliminar, se decidió buscar otros agentes antimicrobianos, seleccionando para ello Nisina y Glucosa oxidasa, por lo que el resto del trabajo de investigación únicamente se referirá al uso de estos agentes antimicrobianos. Las propiedades fisicoquímicas, mecánicas y antimicrobianas, fueron evaluadas directamente sobre las películas producidas en este proyecto de investigación, con excepción de la hidrofobicidad en donde se emplearon las SFP.

Las películas que fueron elaboradas con APSL con y sin la adición de N y/o GO, visualmente resultaron ser distintas (**figura 7.3**). Las películas de APSL presentaron una mayor transparencia que aquellas películas a las cuales se les adicionaron N y/o GO. La incorporación de nisina a las películas de APSL le

produjo un tono opaco, debido posiblemente al cloruro de sodio (77.5 %) o a los restos de sólidos no grasos de leche (12% de proteína y 6% de carbohidratos) presentes como vehículo en la nisina comercial (Cotter *et al.*, 2005). La adición de GO brindó un tono amarillento a las películas. La mezcla de ambos agentes antimicrobianos a las películas de APSL generó un color amarillo por la adición de GO y opaco por la presencia de N. Todas las películas con y sin la adición de N y/o GO resultaron ser inodoras.

La flexibilidad de las películas no solo se vio afectada por la cantidad de glicerol agregada a la SFP sino que también por el pH al que fue preparada la SFP. En general las películas más flexibles fueron aquellas elaboradas a pH 8.5, mientras que las películas producidas a pH 5.5 resultaron ser poco flexibles y quebradizas. Otro factor que disminuyó la flexibilidad de las películas fue la adición de N y/o GO.

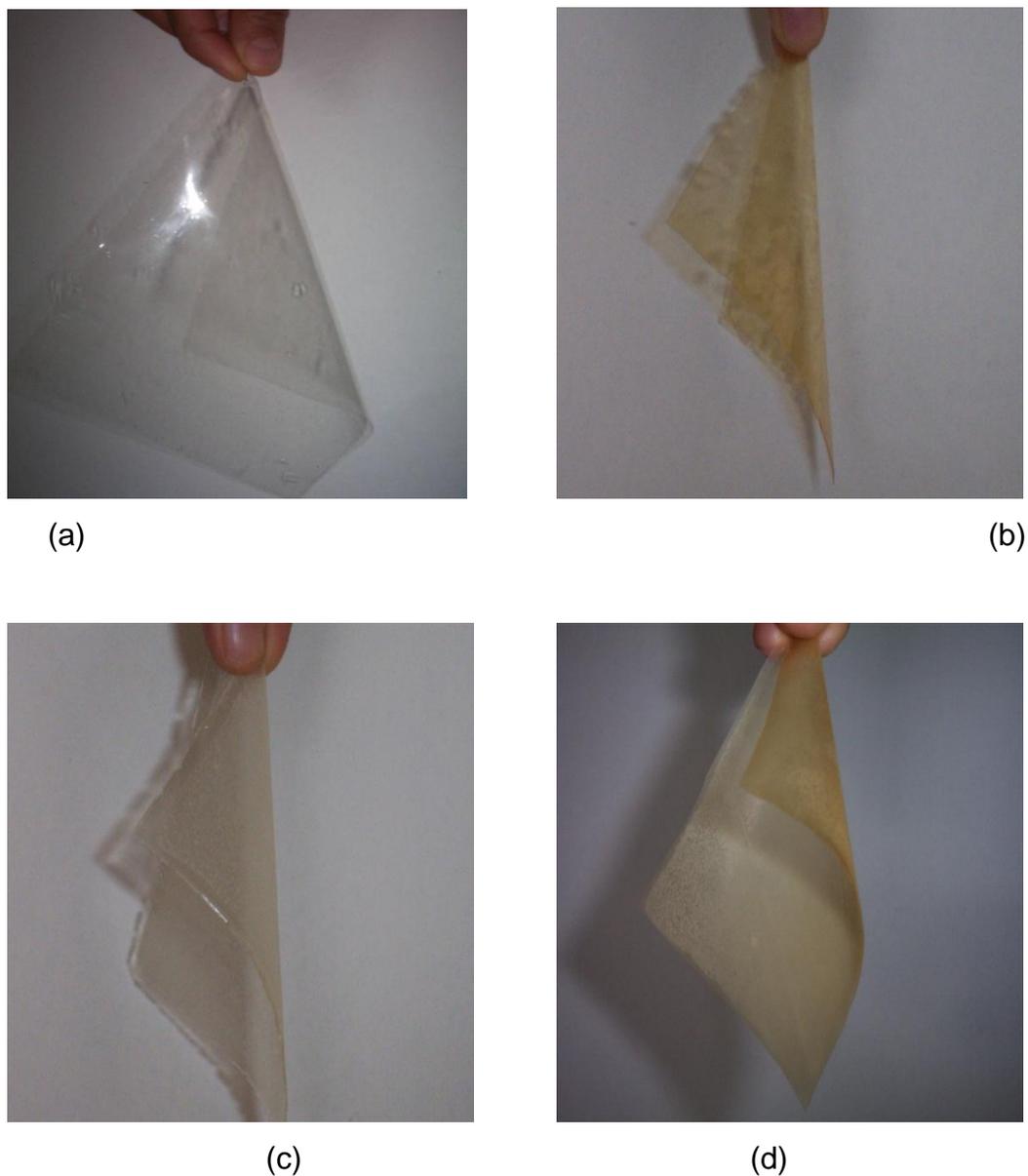


Figura 7.3. Película elaborada a partir de APSL sin N y/o GO (a), y película de APSL adicionadas con GO (b), N (c) y la mezcla de N y GO (d).

7.3 Actividad antimicrobiana de películas adicionadas con N y/o GO

Los halos de inhibición producidos por las películas con N y/o GO demuestran que podrían ser empleadas como empaques para el control del crecimiento de microorganismos deteriorantes o patógenos presentes en alimentos.

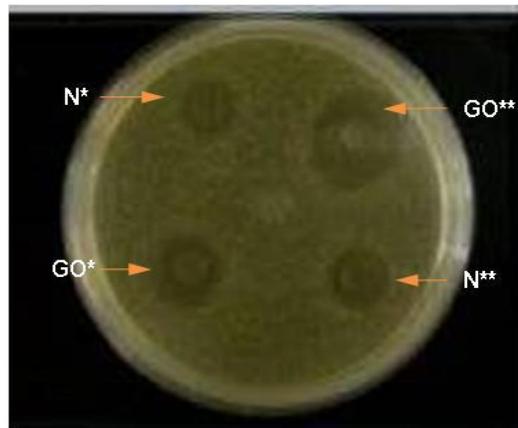


Figura 7.4. Actividad antimicrobiana de las película a pH 5.5 contra *E. faecalis*. En la figura se muestra halos de inhibición causado por la combinación de GO y N a diferentes concentraciones dentro de la película.

** Representa que la concentración del antimicrobiano en la película es alta, GO (0.02% p/v) y/o N (1.2% p/v).

* Representa que la concentración del antimicrobiano en la película es baja, GO (2.4 X 10⁻³% w/v) y/o N (0.3% p/v).

En la figura 7.4 se pueden observar que los halos de inhibición producidos por GO son directamente proporcionales a la concentración del antimicrobiano; en

el caso de N su inhibición contra *E. faecalis* fue la misma a las dos distintas concentraciones.

En la **tabla 7.3** se muestra la inhibición de los microorganismos sensibles causada por la incorporación de N y/o GO en las películas de APSL elaboradas a dos valores distintos de pH 8.5 y 5.5.

Tabla 7.3. Efecto antimicrobiano de las películas de APSL adicionadas con N y/o GO elaboradas a dos valores distintos de pH.

Microorganismo	Agente antimicrobiano															
	GO**		GO*		N**		N*		(GO-N)*		(GO-N)**		GO**N*		GO* N**	
	5.5	8.5	5.5	8.5	5.5	8.5	5.5	8.5	5.5	8.5	5.5	8.5	5.5	8.5	5.5	8.5
<i>B. thermosphacta</i>	++	++	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. Coli</i>	++	++	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	++	++	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>L. innocua</i>	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

** Representa que la concentración del antimicrobiano en la película es alta, GO (0.02% p/v) y/o N (1.2% p/v)

* Representa que la concentración del antimicrobiano en la película es baja, GO (2.4 X 10⁻³% p/v) y/o N (0.3% p/v)

+ muestra que hay inhibición

++ Que hay una mayor inhibición

- muestra que no hubo inhibición alguna.

En estudios recientes se ha demostrado que la incorporación de nisina dentro de matrices elaboradas a base de proteína presenta actividad antimicrobiana contra *B. thermosphacta* (Tu y Mustapha, 2002), en este experimento no se logró inhibir a *B. thermosphacta* con la incorporación de N dentro de las películas de APSL, esto pudo haber sido porque las concentraciones de nisina (0.3% y 1.2% p/v) adicionadas a las películas no

fueron las ideales para la inhibición de dicho microorganismo. La bacteria *E.coli*, gran-negativa, logró ser inhibida por las películas de APSL adicionadas con nisina, Kuwano *et al.*, (2005) señalan que este tipo de inhibición de nisina contra *E. coli* es debido a su combinación con NaCl que favorece la permeabilización de la membrana citoplasmática de dicho microorganismo.

Por otra parte, *B. thermosphacta*, *E. coli*, *E. faecalis* y *L. innocua*, fueron inhibidos con las películas de APSL adicionadas con GO, la actividad antimicrobiana fue independiente del pH al que fue elaborada la película y directamente proporcional a la concentración de GO, lo cual quiere decir que aún con poca cantidad de GO liberada de la película se puede inhibir el crecimiento de microorganismos Gram-positivos (*B. thermosphacta*, *E. faecalis* y *L. innocua*) y Gram-negativos (*E. coli*). El mecanismo de acción de GO se basa en la oxidación de la glucosa generando ácido glucónico (AG) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ambos compuestos con una elevada actividad antimicrobiana (Reed, 1975). El pKa del ácido glucónico es de 3.6 a pH 5.5 prácticamente no hay forma de actividad antimicrobiana por lo que la actividad antimicrobiana de las películas a pH 5.5 se le puede atribuir solamente al H_2O_2 generado por la enzima GO. En las películas elaboradas a pH 8.5 aún es imposible tener actividad por el ácido glucónico.

Las películas de APSL adicionadas con ambos agentes antimicrobianos mostraron actividad inhibitoria contra *B. thermosphacta*, *E. coli*, *E. faecalis* y *L. innocua*, en la mayoría de los casos se observó que las películas elaboradas a pH 8.5 y adicionadas con una mayor concentración de nisina tuvieron una menor actividad antimicrobiana, lo que pudo haber sido causado por que el pH favoreció una interacción entre ambos agentes antimicrobianos o la sal presente en las películas por la adición de la nisina generaron interacciones electrostáticas con la estructura de GO. Por lo anterior, no es recomendable la incorporación de ambos

agentes antimicrobianos, N y GO, a películas de APSL puesto que la incorporación sola de GO en dichas películas resultaron inhibir mejor a los cuatro microorganismos sensibles, sin importar el pH al que fue elaborada la película.

Resulta interesante que las películas adicionadas con N y/o GO hayan presentado actividad antimicrobiana contra microorganismos que se encuentran en productos alimentarios como *B. thermosphacta*, *E. coli* y *E. faecalis*, ya que podrían ser utilizadas en un futuro como un método de preservación. Esto es de gran interés para la industria de los alimentos debido al control de crecimiento de microorganismos deteriorantes como *B. thermosphacta* y *E. faecalis* que son bacterias que provocan efectos adversos en sabor, nutrientes y coloración de la carne fresca y productos cárnicos procesados y que producen grandes pérdidas a la industria alimentaria. También resulta trascendente el control de bacterias patógenas presentes en alimentos, como *L. monocytogenes* que causa enfermedades como listeriosis e infecciones intrauterinas en mujeres embarazadas que finalizan en aborto. Otro microorganismo patógeno es *E. coli* (O157:H7) que está asociado con diversos malestares gastroentericos como lo son: colitis hemorrágica y diarrea de los viajeros (Jay, 1994).

7.4 Propiedades fisicoquímicas y mecánicas

7.4.1 Espesor

Las propiedades fisicoquímicas de las películas elaboradas a partir de APSL dependen de su espesor. Para que las películas presenten las mismas

propiedades fisicoquímicas es importante que tengan un espesor homogéneo en toda su área.

El pH influyó significativamente en el espesor de las películas de APSL (**tabla 7.4**). Las películas elaboradas a pH ácido resultaron tener un menor espesor, esto pudo haber sido debido a pH 5.5 las proteínas del suero de leche están más cercanas a su punto isoeléctrico (5.2) y se vuelven insolubles en agua lo cual favoreció una mayor interacción proteína-proteína formando así una estructura más cerrada de la película que cuando el pH es mayor al punto isoeléctrico (Ju y Kilara, 1998; Anema *et al.*, 2004).

Tabla 7.4. Espesores de películas de APSL elaboradas a diferentes valores de pH y adicionadas con y sin N y/o GO.

Agente antimicrobiano	Espesor (μm)	
	pH =5.5	pH = 8.5
Control	126.3 ^{Ab} \pm 0.001	147.3 ^{Bb} \pm 0.003
GO**	105.0 ^{Ade} \pm 0.002	130.3 ^{Bde} \pm 0.003
GO*	110.3 ^{Ac} \pm 0.010	128.0 ^{Bc} \pm 0.011
N**	148.7 ^{Aa} \pm 0.002	153.0 ^{Ba} \pm 0.025
N*	106.3 ^{Ae} \pm 0.005	112.3 ^{Be} \pm 0.001
(GO-N)*	121.0 ^{Abc} \pm 0.001	132.7 ^{Bbc} \pm 0.001
(GO-N)**	113.7 ^{Abc} \pm 0.002	150.3 ^{Bbc} \pm 0.002
GO**N*	123.0 ^{Abc} \pm 0.001	127.0 ^{Bbc} \pm 0.001
GO*N**	110.3 ^{Abcd} \pm 0.002	137.7 ^{Bbcd} \pm 0.001

Letras mayúsculas A-B Indica que hay diferencia significativa entre pH;

Letras minúsculas a-d Indica que hay diferencia significativa entre la adición de agentes antimicrobiano
Medias seguidas de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$); $n = 3$ para todos los tratamientos.

** Representa que la concentración del antimicrobiano en la película es alta, GO (0.02% p/v) y/o N (1.2% p/v)

* Representa que la concentración del antimicrobiano en la película es baja, GO (2.4 X 10⁻³% p/v) y/o N (0.3% p/v).

Por otra parte, a pesar de que se ha reportado que la incorporación de sustancias activas dentro de matrices de películas no afectan el espesor (Ko *et al.*, 2000; Quintero *et al.*, 2006; Tapia *et al.*, 2007), en nuestro caso, encontramos que

la concentración de N y/o GO si influyó en el espesor de las películas de APSL en la mayoría de los casos.

7.4.2 Transparencia

Los resultados obtenidos de la evaluación de la transparencia de las películas de APSL empleando los métodos reportados por Choi y Han, (2002) y Heng *et al*, (2003) se muestran en **tabla 7.5**.

El método de Heng y Choi empleados en ésta sección para la evaluación de la transparencia de las películas elaboradas a partir de APSL con y sin la adición de N y/o GO, resultaron ser apropiadas ya que con ambas se llegaron a los mismos resultados. Hay diferencia en magnitud aunque no en el comportamiento.

Los principios de los métodos de Heng y Choi son muy parecidos ya que toman como transparencia la cantidad de luz absorbida dentro de la matriz de las películas. La única diferencia entre ambos métodos es que Choi considera el espesor de las películas para calcular la transparencia.

La transparencia de las películas de APSL está asociada con la concentración de N y GO dentro de su estructura y con el pH de elaboración. La transparencia de las películas de APSL se vio afectada significativamente por el pH al que fueron elaboradas ($P < 0.05$). El APSL resultó ser un material que produce películas con diferente transparencia a distintos valores de pH (5.5 y 8.5). Gontard *et al.*, (1992) observaron que la transparencia de las películas elaboradas a base de gluten de trigo aumentaba cuando a manera que el pH de elaboración aumentaba; lo mismo sucedió en este experimento con las películas de APSL, a pH ácido que presentaron menor transparencia que las elaboradas a pH 8.5, esto

podría indicar que en las películas a pH 8.5 hay una distribución más homogénea de las proteínas del aislado de suero de leche debido a que se encuentran más alejadas de su punto isoeléctrico.

Tabla 7.5. Transparencia de películas de APSL y adicionadas con N y/o GO a diferentes concentraciones y elaboradas a dos valores de pH 8.5 y 5.5.

Agente antimicrobiano	T ¹		T ²	
	pH 5.5	pH 8.5	pH 5.5	pH 8.5
Control	0.015 ^{Ac} ±0.001	0.012 ^{Bc} ±0.001	0.1172 ^{Ad} ±0.007	0.0801 ^{Bd} ±0.002
GO**	0.010 ^{Adc} ±0.001	0.018 ^{Bdc} ±0.001	0.0995 ^{Abc} ±0.015	0.1366 ^{Bbc} ±0.003
GO*	0.013 ^{Ae} ±0.001	0.008 ^{Be} ±0.001	0.1215 ^{Ad} ±0.002	0.0637 ^{Bd} ±0.006
N**	0.013 ^{Adc} ±0.001	0.012 ^{Bdc} ±0.001	0.0864 ^{Ae} ±0.007	0.0778 ^{Be} ±0.001
N*	0.011 ^{Ade} ±0.001	0.015 ^{Bde} ±0.001	0.1044 ^{Ac} ±0.003	0.1326 ^{Bc} ±0.001
(GO-N)*	0.010 ^{Af} ±0.001	0.009 ^{Bf} ±0.001	0.0798 ^{Af} ±0.006	0.0671 ^{Bf} ±0.001
(GO-N)**	0.017 ^{Aa} ±0.001	0.055 ^{Ba} ±0.001	0.1500 ^{Aa} ±0.009	0.3632 ^{Ba} ±0.010
(GO**N*)	0.018 ^{Ab} ±0.001	0.011 ^{Bb} ±0.001	0.1447 ^{Ac} ±0.001	0.0858 ^{Bc} ±0.008
(GO*N**)	0.012 ^{Ae} ±0.001	0.010 ^{Be} ±0.001	0.1069 ^{Ad} ±0.001	0.0755 ^{Bd} ±0.003

Letras mayúsculas A-B Indica que hay diferencia significativa entre pH

Letras minúsculas a-e Indica hay diferencia significativa entre la adición agentes antimicrobiano

Medias seguidas de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes (P < 0.05); n= 3 para todos los tratamientos.

** Representa que la concentración del antimicrobiano en la película es alta, GO (0.02% p/v) y/o N (1.2% p/v)

* Representa que la concentración del antimicrobiano en la película es baja GO (2.4 X 10⁻³% p/v) y/o N (0.3% p/v)

T1= Método reportado por Heng (2003)

T2= Método reportado por Choi y Han (2002).

Por su parte, la concentración de N y/o GO adicionada a las películas de APSL afectó de forma significativa la transparencia de las películas. Las películas

que fueron adicionadas con ambos agentes antimicrobianos (N y GO) en una alta concentración provocaron que las películas fueran menos transparentes como se comentó en la **sección 7.2**.

En la literatura hay pocos reportes sobre la transparencia de las películas elaboradas a base de proteínas. En relación con éste tema Choi y Han (2002) estudiaron como se ve afectada la transparencia de las películas de aislado de proteína de chícharo al ser sometidas a un tratamiento térmico durante cierto intervalo de tiempo (0-50 min.), en donde encontraron que la transparencia de dichas películas no cambia con el tiempo de calentamiento aplicado. Por otra parte, también señalan que las películas de aislado de proteína de chícharo son más transparentes que las películas convencionales elaboradas a base de polietileno de baja densidad

7.4.3 Resistencia a la punción

El pH tuvo un efecto significativo en la resistencia a la punción de las películas ($P < 0.05$). Las películas a pH 5.5 mostraron menor resistencia así como también un menor espesor comparados con el de las películas elaboradas a pH básicos. La influencia del pH ácido en el espesor y la resistencia a la punción de las películas elaboradas con APSL pudo haber sido debido a que a pH 5.5 las proteínas del suero están más cerca de su punto isoeléctrico y a demás porque que en éste valor de pH posiblemente las proteínas de aislado de suero de leche forman interacciones menos flexibles alterando las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que constituyen su estructura molecular, provocando cambios en residuos con carga o en las interacciones electrostáticas que influyen en su conformación, tales como: fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno (Kester y Richardson, 1984; Ennis y Mulvihill, 2000), así como también los grupos SH

provenientes de los residuos de cisteínas. En contexto con lo antes dicho, las cadenas laterales expuestas durante el proceso de desnaturalización del APSL forman enlaces intramoleculares más fácilmente a pH 5.5 como es el caso de los enlaces disulfuro e interacciones hidrofóbicas que están asociados con la formación, la rigidez y compactación de las películas (Fukushima y Van Buren, 1970; Gontard *et al.*, 1992 Fairley *et al.*, 1996; Alting *et al.*, 2000; Perez-Gago y Krochta, 2000).

Las películas a pH 8.5 demostraron tener una mayor resistencia al punto de punción y también un mayor espesor. En relación a lo antes mencionado se puede decir que el arreglo estructural de la matriz de las películas de APSL influyen de manera directa a su resistencia a la punción, a mayor espesor de la película mayor es su resistencia al punto de punción y viceversa.

La función del glicerol como agente plastificante se vio afectada por el pH de elaboración de las películas, a pesar de que la cantidad agregada en las películas a pH 5.5 y 8.5 fue la misma, las primeras resultaron ser poco flexibles y con menor resistencia al punto de punción.

La influencia del pH y el espesor sobre resistencia al punto de punción de las películas elaboradas a partir de proteínas no son los únicos factores que puede afectar dicha propiedad; Gontard *et al.*, (1992) señalan que la resistencia al punto de punción de las películas no sólo dependen del pH al que fueron elaboradas sino que también de la concentración de proteína contenida en la misma. Anker *et al.*, (2001) han reportado que las películas de APSL con glicerol pierden humedad más fácilmente que las plastificadas con sorbitol.

En la **tabla 7.6** se puede observar la resistencia al punto de punción de las películas de APSL y elaboradas a dos valores distintos de pH adicionadas con N y/o GO.

Tabla 7.6. Resistencia al punto de punción de las películas elaboradas a dos valores distintos de pH y a diferentes concentraciones de antimicrobianos

Agente antimicrobiano	RPP(g _F)	
	pH 5.5	pH 8.5
Control	3.1813 ^{Aa} ±0.011	7.7267 ^{Ba} ±0.473
GO**	2.9560 ^{Aab} ±0.822	6.1690 ^{Bab} ±0.220
GO*	3.3350 ^{Aab} ±0.453	5.9957 ^{Bab} ±0.446
N**	2.3977 ^{Abc} ±0.022	6.3540 ^{Bbc} ±0.375
N*	2.5360 ^{Aab} ±0.125	7.4553 ^{Bab} ±0.470
(GO-N)*	2.1100 ^{Acđ} ±0.091	6.0573 ^{Bcđ} ±0.310
(GO-N)**	1.4423 ^{Acđ} ±0.235	6.3080 ^{Bcđ} ±0.189
GO**N*	2.3897 ^{Abcđ} ±0.104	6.0653 ^{Bbcđ} ±0.214
GO*N**	1.4873 ^{Ad} ±0.130	5.7807 ^{Bđ} ±0.115

Letras mayúsculas A-B Indica que hay diferencia significativa entre pH

Letras minúsculas a-d Indica hay diferencia significativa entre agentes antimicrobiano

Medias seguidas de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes (P < 0.05); n= 3 para todos los tratamientos.

RPP = resistencia al punto de punción

La concentración de N y/o GO incorporada dentro de las películas elaboradas a partir de APSL influyó de manera significativa en su resistencia al punto de punción (p<0.05). En la mayoría de los casos la incorporación de altas concentraciones de nisina sola o en combinación con GO dentro de las matrices de las películas elaboradas a pH 5.5 disminuyó notablemente su resistencia al punto de punción; lo mismo con las películas a pH 8.5 en donde el efecto de la concentración de nisina fue menor. Estas mismas observaciones han sido reportadas por Ko *et al.*, (2001).

7.4.4 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad de las películas de APSL esta relacionada con el contenido de residuos hidrofóbicos de las proteínas del suero expuestos en la

superficie de la película. En soluciones acuosas los grupos hidrofóbicos de los residuos tienden a estar en la parte interna de la proteína. La desnaturalización de la proteína sucede cuando pierde su estructura secundaria y/o terciaria, lo cual puede conducir en muchos casos, a la exposición de grupos hidrofóbicos hacia la fase acuosa. El resultado final es un incremento de la hidrofobicidad en superficie de la proteína. La desnaturalización de la proteína también conduce a reacciones químicas específicas para el rompimiento de enlaces disulfuro. Lo anterior aumenta el grado de hidrofobicidad en las superficies de las proteínas (Magdassi y Toledano, 1996).

El grado de hidrofobicidad de las películas de APSL que fue determinado mediante fluorescencia por la adición de ANS en las diferentes soluciones formadoras de películas (SFP) está reportado en la **tabla 7.7**.

Tabla 7.7. Grado de hidrofobicidad de películas elaboradas a dos valores de pH y adicionadas con N y/o GO.

Agente antimicrobiano	Grado de Hidrofobicidad	
	pH 5.5	pH 8.5
Control	2024.7 ^{Acd}	970.92 ^{Bcd}
GO**	888.77 ^{Ae}	674.40 ^{Be}
GO*	855.63 ^{Ae}	1130.70 ^{Be}
N**	1684.2 ^{Ad}	532.07 ^{Bd}
N*	1038.4 ^{Ae}	740.42 ^{Be}
(GO-N)*	2280.5 ^{Abc}	834.26 ^{Bbc}
(GO-N)**	3634.2 ^{Aa}	1101.1 ^{Ba}
GO**N*	1997.3 ^{Acd}	678.02 ^{Bcd}
GO*N**	3110.5 ^{Ab}	764.8 ^{Bb}

Letras minúsculas a-e Indica hay diferencia significativa entre agentes antimicrobiano

Medias seguidas de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$); $n = 3$ para todos los tratamientos.

** Representa que la concentración del antimicrobiano en la película es alta, GO (0.02% p/v) y/o N (1.2% p/v)

* Representa que la concentración del antimicrobiano en la película es baja, GO (2.4 X 10⁻³% p/v) y/o N (0.3% p/v).

En las películas elaboradas a partir de APSL se observó que el del pH tuvo un efecto significativo sobre la hidrofobicidad de las películas. Las películas elaboradas a pH 8.5 mostraron menor grado de hidrofobicidad que las películas elaboradas a pH 5.5, esto posiblemente se debió a que en las SFP preparadas a pH 5.5 las proteínas se encontraban más desnaturalizadas que en las SFP a pH 8.5. La desnaturalización de las proteínas del suero en SFP a pH 5.5 pudo haber sido debida a que hubo una mayor apertura de la cadena polipeptídica rompimiento de enlaces intramoleculares de las proteínas, entre ellos los enlaces disulfuro las proteínas β -lactoglobulina y la α -lactoalbumina que contienen en su estructura dos y cuatro enlaces disulfuro, respectivamente, y una mayor exposición de grupos hidrofóbicos (Magdassi y Toledano, 1996). Cuando las SFP a pH 5.5 fueron vertidas en placa las proteínas pudieron haberse visto favorecidas para interactuar entre ellas mismas para formar películas con superficies hidrofóbicas esto posiblemente pudo haber sido por del grado de desnaturalización del APSL provocado por ambiente ácido y al tratamiento térmico al cual fueron sometidas las SFP.

Las películas de APSL son películas que presentan un grado considerable de hidrofobicidad debido a que las proteínas que lo componen están constituidas en un 46% y 33% de residuos hidrofóbicos para la β -lactoglobulina y la α -lactoalbumina, respectivamente (**Fig 3.1 y Fig. 3.2**), que quedan expuestos probablemente con el rompimiento de los enlaces disulfuros durante la desnaturalización (Magdassi y Toledano, 1996).

Por otra parte, la incorporación de N y/o GO a las películas de APSL en la mayoría de los casos disminuyó de manera significativa la hidrofobicidad de las películas comparadas con la película control.

En la literatura existen relativamente pocos reportes sobre el grado de hidrofobicidad de las películas elaboradas con proteínas. Ko *et al*, (2001), observaron que las películas elaboradas a partir de gluten de trigo, albumina de huevo y aislado de proteína de soya presentan menores grados de hidrofobicidad que las de películas fabricadas con APSL; en el caso de las películas elaboradas de gluten de trigo la presencia de un bajo grado de hidrofobicidad lo relacionan a que las estructuras de sus proteínas contienen una menor cantidad de residuos de cisteínas y como consecuencia tienen una menor capacidad de formar enlaces covalentes disulfuro intramoleculares.

Las hidrofobicidad en las películas de APSL podrían brindarle propiedades fisicoquímicas a productos envasados dentro de ellas debido a que presentarían mayor barrera contra la humedad y el vapor de agua ya que al modificar el pH se podrían mejorar las propiedades de barrera. Sin embargo es posible incrementar esta propiedad al adicionar compuestos hidrofóbicos como cera o ácidos grasos.

7.4.5 Determinación de la solubilidad en agua

En general, el pH al que fueron elaboradas las películas de APSL tuvo un efecto significativo en la solubilidad de las películas como se puede observar en la **tabla 7.8**. La solubilidad de las películas de APSL disminuyó a menor pH de elaboración, autores como Gontard *et al.*, (1992) han hecho ésta misma observación en las películas elaboradas a partir de gluten de trigo. Como se mencionó en la sección anterior, en las películas a pH 8.5 posiblemente hay un menor entrelazamiento entre las APSL y también tienen superficies menos hidrofóbicas que las películas elaboradas a pH 5.5, esto pudo haber favorecido a

que las matrices de las películas a pH 8.5 interactuaran más fácilmente con el agua facilitando así su disolución.

Tabla 7.8. Porcentaje de solubilidad de las películas la concentración de proteína en la solución empleada para disolver la película.

Agente antimicrobiano	% de Solubilidad		[Proteína](µg/ml)	
	pH 5.5	pH 8.5	pH 5.5	pH 8.5
Control	4.9697 ^{Ad} _{+2.82}	10.3030 ^{Bd} _{+2.96}	657.21 ^{Ab} _{+39.05}	456.73 ^{Bab} _{+18.28}
GO**	12.2424 ^{Acd} _{+2.68}	22.3636 ^{Bcd} _{+10.55}	912.10 ^{Aa} _{+15.98}	333.33 ^{Ba} _{+130.1}
GO*	13.1515 ^{Abcd} _{+6.68}	19.5758 ^{Bbcd} _{+2.17}	221.41 ^{Ad} _{+42.04}	795.78 ^{Bd} _{+279.13}
N**	17.5758 ^{Aabc} _{+2.48}	20.4848 ^{Babc} _{+1.36}	557.31 ^{Ab} _{+175.60}	515.90 ^{Bab} _{+38.45}
N*	21.0909 ^{Aa} _{+2.23}	21.0303 ^{Ba} _{+2.07}	188.90 ^{Ad} _{+23.15}	522.68 ^{Bd} _{+36.54}
(GO-N)*	18.3636 ^{Aab} _{+1.55}	18.6667 ^{Bab} _{+0.92}	379.38 ^{Ab} _{+73.70}	884.23 ^{Bab} _{+183.47}
(GO-N)**	20.9091 ^{Aa} _{+1.42}	28.1818 ^{Ba} _{+0.48}	488.66 ^{Ab} _{+26.94}	700.13 ^{Bab} _{+54.47}
GO**N*	13.0303 ^{Acd} _{+5.50}	18.7879 ^{Bcd} _{+1.00}	316.74 ^{Acd} _{+65.60}	481.69 ^{Bcd} _{+16.97}
GO*N**	22.1818 ^{Aa} _{+0.79}	25.3333 ^{Ba} _{+1.55}	441.12 ^{Abc} _{+14.84}	633.40 ^{Bbc} _{+53.55}

Letras mayúsculas A-B Indica que hay diferencia significativa entre pH

Letras minúsculas a-d Indica hay diferencia significativa entre agentes antimicrobiano

Medias seguidas de letras distintas en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$); $n=3$ para todos los tratamientos

** Representa que la concentración del antimicrobiano en la película es alta, GO (0.02% w/v) y/o N (1.2% w/v)

* Representa que la concentración del antimicrobiano en la película es alta, GO (2.4 E-3% w/v) y/o N (0.3% w/v).

Con respecto a la concentración de N y/o GO incorporada en las películas influyó de manera significativa en el % de solubilidad de las películas. Del mismo modo también se encontró diferencia en cuanto a la concentración de proteína dentro de las soluciones solubilizantes de películas.

7.5 Espectros IR

En las **figuras 7.5 - 7.6** se presentan los espectros en la región del infrarrojo de las películas elaboradas a partir de APSL a pH 5.5 y 8.5 y secadas por un período de 72 h a 70°C. En ellos se observa que su forma es muy similar en los cuatro casos, y es característica de materiales amorfos destacando tres regiones; una gran banda que va de los 3700 cm^{-1} a aproximadamente 2300 cm^{-1} donde es común observar las bandas característica de grupos OH de alcoholes y ácidos carboxílicos, de grupos amino y amido superpuestas a las señales carbono hidrógeno de las cadenas de carbono. Además se observa una gran señal que va de los 1750 cm^{-1} a aproximadamente 1000 cm^{-1} en donde se debería observar las señales principales C-C, C=C, CO, C=O, CN y C=N. Sin embargo, por la complejidad y tamaño de las proteínas existen muchos posibles modos normales y combinaciones de vibración, lo que explica la forma e intensidad de las señales del espectro. Comparando los espectros observamos que los cambios más apreciables ocurren en el intervalo de los 1700 a 2500 cm^{-1} donde se espera observar las pequeñas bandas de compuestos aromáticos sustituidos y la banda del grupo tiol. En el espectro de la muestra a pH 5.5 si es posible distinguir las bandas a 1700 cm^{-1} , característico del grupo carbonilo, una banda a 1100 cm^{-1} , característica de vibraciones C-O, y por debajo de 1000 cm^{-1} se observan las bandas de flexión de las moléculas. Además, debe mencionarse que el espectro de la muestra a pH 5.5 se vuelve más nítido después del secado por 72 h a 70°C. Esto nos indica, por una parte que la estructura del polímero resiste el proceso de secado y que solamente se ha eliminado agua, la cual se pierde más fácilmente en esta muestra como lo refleja la intensidad de transmitancia de la muestra (aprox. 83 %), ya que se puede apreciar el espectros de la muestras a pH 8.5 (figura 4.3) bandas más anchas y no cambian dramáticamente después del tratamiento térmico. Con base a lo anterior, se puede suponer que la mayor liberación de agua en la muestra a pH 5.5 se debe a que el agua está menos

adsorbida dentro de la película y que aparentemente hay un menor número de poros o espacios en la red proteica. Lo anterior puede deberse a que el pH utilizado afecta a la proteína y la desnaturaliza, además de que se favorece la ionización de grupos amino, carboxilo y de agua. Es importante mencionar que las películas con o sin agentes antimicrobianos no mostraron diferencia alguna en las bandas de los espectros.

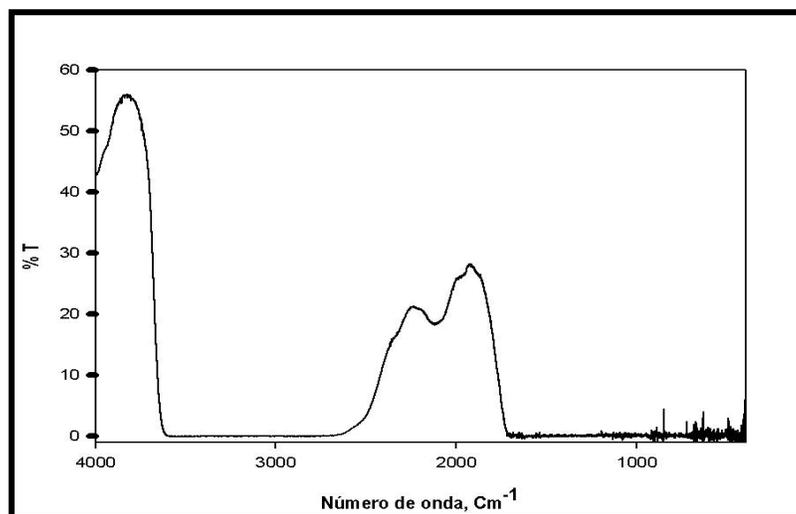


Figura 7.5. Espectro IR de películas de APSL a pH 5.5 y sometidas a un tratamiento térmico de 70°C por 72 h.

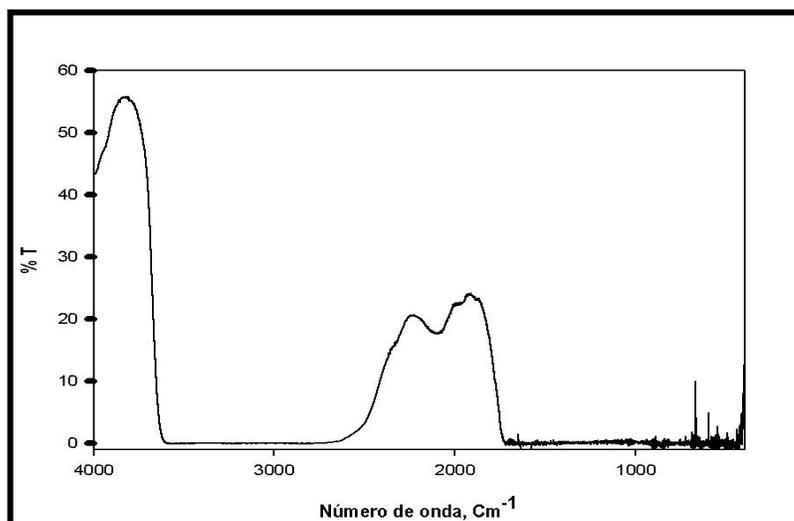


Figura 7.6. Espectro IR de películas de APSL a pH 8.5 y sometidas a un tratamiento térmico de 70°C por 72 h.

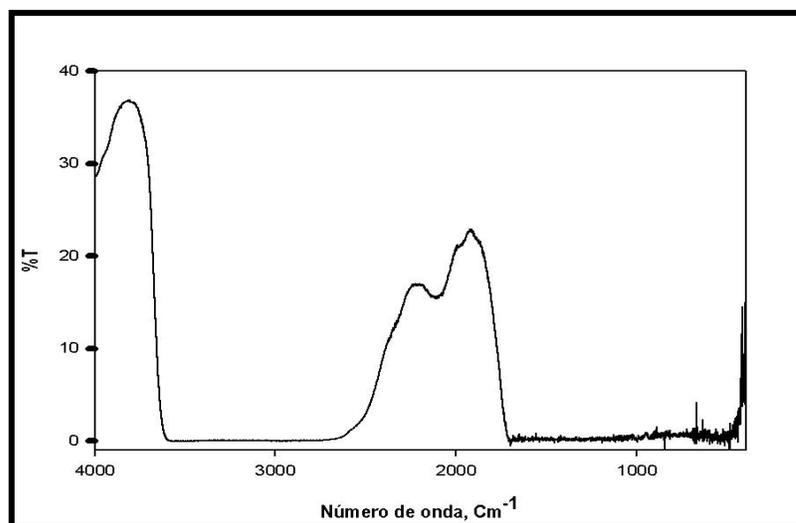


Figura 7.7. Espectro IR de películas de APSL a pH 5.5, adicionadas con N y GO a altas concentraciones y sometida a un tratamiento térmico de 70°C por 72 h.

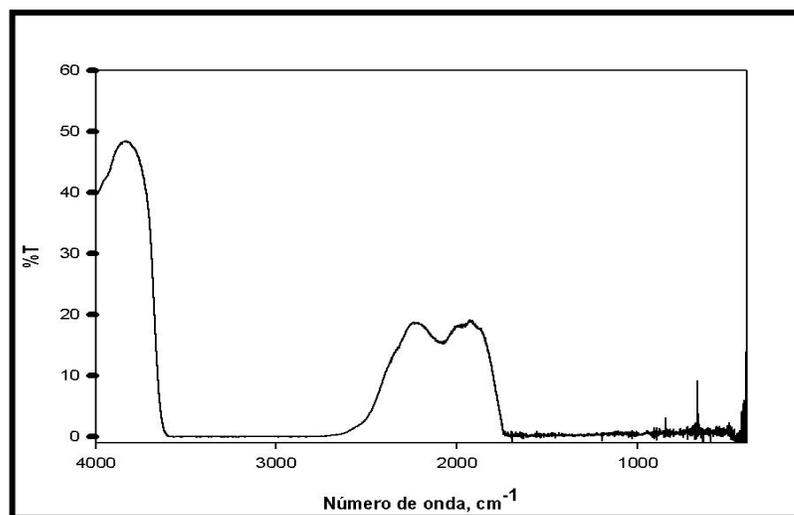


Figura 7.8. Espectro IR de películas de APSL a pH 8.5, adicionadas con N y GO a altas concentraciones y sometida a un tratamiento térmico de 70°C por 72 h.

8. Conclusiones

- ❖ Las concentraciones de cada uno de los componentes de LOPS fueron las adecuadas debido a que su efecto de inhibición fue amplio contra los microorganismos de interés. Lo cual indica que éste sistema podría ser incorporado en películas comestibles para controlar el crecimiento microbiano.
- ❖ *L. innocua* mostró una mayor inhibición frente a los agentes antimicrobianos en comparación con *E. faecalis* en todas las concentraciones probadas.
- ❖ El sistema LPOS posee mayor actividad antimicrobiana que la pediocina; sin embargo, la combinación de éstos dos agentes reduce su efecto inhibitorio debido a la interacción que hay entre ellos.
- ❖ La incorporación de N y GO en combinación no amplió el espectro antimicrobiano como se esperaba. Sin embargo, todos los microorganismos de interés fueron inhibidos con las películas adicionadas únicamente con GO bajo las condiciones estudiadas. Las películas adicionadas con N mostraron un menor efecto inhibitorio que fue dependiente del pH.
- ❖ Las propiedades mecánicas como espesor y resistencia al punto de punción de las películas con y sin GO y/o nisina dependen del pH, a pH 5.5 la matriz retiene menor cantidad de agua generando películas

más delgadas, poco flexibles y de bajo peso, a diferencia de las películas a pH 8.5.

- ❖ El contenido de agua presente en la microestructuras de las películas varía con el pH, a valores bajos de pH las películas retienen muy poca agua dentro de su matriz debido a que tienen superficies más hidrofóbicas que las películas elaboradas a pH básico.
- ❖ El análisis por espectroscopia FTIR hace evidente la complejidad de las películas de APSL con y sin GO y/o nisina y el efecto del pH sobre la estructura del sistema. Aunque las bandas esperadas no son claras, es posible intuir de ellos la importancia de la acidez o basicidad sobre las propiedades finales de las películas.

9. Perspectivas

1. Incorporación de nuevos agentes antimicrobianos en películas elaboradas a partir de APSL de amplio espectro para extender la vida de útil del producto envasado y la seguridad de consumo.

2. **IR**

Realizar un estudio de IR con películas elaboradas a diferentes valores de pH y almacenadas dentro de un desecador, con la finalidad de observar el efecto que tiene el agua y otros componentes de la película en cuanto a las propiedades fisicoquímicas, así como también observar que tanto pueden interferir algunos grupos funcionales que queden expuestos dentro de la matriz de la película al momento de ser liberado el agente antimicrobiano.

3. **Análisis termogravimétrico**

Hacer un análisis termogravimétrico para saber la cantidad de agua y otros componentes que se encuentran presentes en la película elaborada de APSL.

10. Referencias

1. Adolphe Y., Jacquot M., Linder M., Revol-Junelles A. M., Millièrre J. B. 2006. Optimization of the components concentrations of the lactoperoxidase system by RSM. *J. Appl. Microbiol.*, 100:1034-1042.
 2. Alting A. C, Hamer R. J, de Kruif C. G, Visschers R. W. 2000. Formation of disulfide bonds in acid-induced gels of preheated whey protein isolate. *J. Agric. Food Chem.*, 48:5001-5007.
 3. Anema S. G, Lowe E. K, Li Y. M. 2004. Effect of pH on the viscosity of heated reconstituted skim milk. *J. Dairy J.*, 14:541-548.
 4. Anker M., Standns M., Hermansson A. M. 2001. Aging of whey protein films and the effect on mechanical and barrier properties. *J. Agric. Food Chem.* 47:1878-1886.
 5. Bennik M. H. J., Smid E. J., Gorris L. G. M. 1997. Vegetable-associated *Pediococcus parvulus* produced pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2074-2076.
 6. Bhunia A. K, Johnson M. C, Ray B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.*, 70:25-30.
 7. Boatright W. L, Hettiarachchy N. S. 1995. Soy protein isolate solubility and surface hydrophobicity as affected by antioxidants. *J. Food Sci.*, 60:798-800.
 8. Cagri A., Ustunol Z., Ryser E. T. 2001. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *J. Food Sci.*, 66:865-870.
 9. Cagri A., Ustunol Z., Osburn W., Ryser E. T. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on Hot Dogs Using Antimicrobial Whey Protein-based Edible Casings. *J. Food Sci.* 68:291-299.
 10. Cheftel J. C., Cuq J. L., Lorient D. 1989. Proteínas alimentarias. Acribia, S.A., Zaragoza, España. pp. 179-199.
-
-

11. Cho S. Y., Park J. W, Rhee C. 2002. Properties of laminated films from whey power and sodium caseinate mixtures and zein layers. *Lebens.-Wiss. U.- Technol.*, 35:135-139
12. Choi W. S y Han J. H. 2002. Film-forming mechanism and heat denaturation effect on the physical and chemical properties of pea-protein-isolate edible films. *J. Food Sci.*, 67:1399-1406.
13. Cords B., Burnett S. L., Hilgren J., Finley M. y Magnuson J. 2005. Sanitizers: halogens, surface-active agents, and peroxides. En: Davidson PM., Sofos JN. y Branen AL. Antimicrobials in food. CRC Press, Boca Raton, FL., pp 538-542.
14. Cotter D. P, Hill C., Ross P. R. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews*, 3:777-788
15. Cudjoe K. S., Kapperud G. 1991. The effect of lactic acid sprays on *Campylobacter jejuni* inoculed onto poultry carcasses. *Acta Vet. Scand.*, 32: 491-498.
16. Cutter C. N., Sumner S. S. 2002. Application of edible coatings. Edited by Gennadios A. Ed. CRC Press, Boca Raton Florida, U.S.A., pp 467-484.
17. Delves-Broughton J. 1990. Nisin and its uses as food preservative. *Food Technol.*, 11:100-117.
18. Di Pierro P., Chico B., Villalonga R., Mariniello L., Damiao A. E, Masi P., Porta R. 2006. Chitosan-whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: analysis of their mechanical and barrier properties. *Biomacromolecules*, 7:744-749.
19. Doores S. 2005. Organic acids. En: Davidson PM., Sofos JN. y Branen AL. Antimicrobials in food. CRC Press, Boca Raton, FL., pp 91-95.
20. Ebner K. E., Brodbeck U. 1968. Biological Role of α -Lactalbumin: a review. *J. Dairy Sci.*, 51:317-322.
21. Ennis M. P., Mulvihill D. M. 2000. Milk proteins. En: Phillips GO. y Williams (Eds.). Handbook of hydrocolloids, CRC Press, Boca Raton, FL., pp 189-217.

22. Fairley P., Monahan F. J., German J. B., Krochta J. M. 1996. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey protein isolate and N-ethylmaleimide or cysteine. *J. Agric. Food Chem.*, 44:3789-3792.
23. Fernández A. M. 2000. Active food packaging: a review. *Food Sci. and Technol. I.* 6:97-108.
24. Fu D., Weller C. L., Wehling R. L. 1999. Zein: proteins, preparations, and applications. *Food Sci. Biotechnol.*, 8:1-10
25. Fukushima D., Van Buren J. 1970. Mechanisms of protein insolubilization during the drying of soy milk. Role of disulfide and hydrophobic bonds. *Cereal Chem.*, 47:687-696.
26. Gálvez A., Abriouel H., Lucas L. R., Omar N. B. 2007. Bacteriocins-based strategies for food biopreservation. *I. J. Food Microbiol.*, 120:51-70.
27. Gálvez M. A., Flores A. I., Farrés-Gonzales S. A. 2006. Proteínas. En: Badui DS. Química de los alimentos, cuarta edición. Editor. Pearson educación, México DF., pp. 161-164.
28. Gennadios A., Hanna M. A. y Kurth L. B. 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 30:337-350.
29. Gontard N., Guilbert S., Cuq J-L. 1992. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.*, 57:190-199.
30. Gounga E. M. Xu Shi-Ying y Wang Z. 2007. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *J. Food Eng.*, 83:521-530.
31. Gravesen A., Jydegaard Axelsen A. M., Mendez da Silva J., Hansen T. B., Knøchel S. 2002. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness cost in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:756-764.

-
32. Güçbilmez C. M., Yemencioğlu A., y Arslanoğlu A. 2006. Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *J. Food Res. I.*, 40: 80-91.
 33. Guckian S., Dwyer C., O'Sullivan M. 2005. Properties of and mechanisms of protein interactions in films formed from different proportions of heated and unheated whey protein solutions. *Food Hydrocolloids*, 223:91-95.
 34. Guilbert S., Gontard N. y Gorris L. G. M. 1996. Prolongation of shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensm.-Wiss. U.- Technol.*, 29:10-17.
 35. Han J. H. 2000. Antimicrobial food packaging. *Food Technol.* 54: 56-65.
 36. Han J. H. y Krochta J. M. 2007. Physical properties of whey protein coating solution and films containin antioxidants. *J. Food Sci.*, 72:E308-E314.
 37. Heng P. W. S., Chan L. W., Ong K. T. 2003. Influence of storage conditions and type of plastizer on ethylcellulose and acrylate films formed from aqueous dispersions. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 6:334-344.
 38. Heng, N. C. K. y Tagg, J. R. 2006. Class distinction for bacteriocins. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4:1-2
 39. Jay J. M. 1994. Microbiología moderna de los alimentos. Editorial acribia, Zaragoza, España. pp: 609-623.
 40. Jiancai L., Hongda C. 2000. Biodegradation of whey protein-based edible films. *J. Polymers Environment*, 8:135-143.
 41. Ju Z. Y. y Kilara A. 1998. Gelation of pH-aggregated whey protein isolate by heat, protease, calcium salt, and acidulant. *J. Agric. Food Chem.*, 46:1830-1835.
 42. Kester J. J., Fennema O. R. 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technol.*, 40:47-59.
 43. Kester J. J., Richarson. 1984. Modification of whey proteins to improve functionality. *J. Dairy Sci.*, 67:2755-2774.
 44. Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiology Reviews*, 12:39-86.
-

-
45. Ko S., Janes M. E., Hettiarachchy N. S., Johnson M. G. 2001. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Sci.*, 66:1006-1011.
 46. Kontopidis G., Holt C., Sawyer L. 2004. Invited review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, structure, and function. *J Dairy Sci.*, 87:785-796.
 47. Krochta J. M., De Mulder-Johnson C. 1997. Edible and biodegradable polymer films. *Food Technol.*, 51:61-74.
 48. Kuwano K., Tanaka N., Shimizu T., Nagatoshi K., Nou S., Sonomoto K. 2005. Dual antibacterial mechanism of nisin Z against gram-positive and gram-negative bacteria. *I. J. Antimicrobial Agents*, 26:396-402.
 49. Magdassi S. y Toledano O. 1996. Enhanced hydrophobicity. En: Magdassi S. (Ed.). Surface activity of proteins: chemical and physicochemical modifications. MerceL Dekker, N.Y. pp 39-60.
 50. Mate J. I., y Krochta J. M. 1996. Comparison of oxygen and water vapor permeabilities of whey protein isolate and lactoglobulin edible films. *J. Agric. Food Chem.* 44:3001-3004
 51. Miller K. S., Upadhyaya S. K., Krochta J. M. 1998. Permeability of *d*-limonene in whey protein films. *J. Food Sci.* 63:244-247.
 52. Min S. y Krochta J. M. 2005a. Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporatin lactoferrin, lacto-ferrin hydrolysate, and lactoperoxidase system. *J. Food Sci.*, 70:M87-94.
 53. Min S., Harris L. J., Krochta J. M. 2005b. *Listeria monocytogenes* inhibition by whey protein films and coatings incorporating the lactoperoxidase system. *J. Food Sci.*, 70:M317-M324.
 54. Min S., Harris L. J., Krochta J. M. 2005c. Antimicrobial effect of lactoferrin, lysozyme, and lactoperoxidase system and edible whey protein films incorporating the lactoperoxidase system against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 :H7. *J. Food Sci.*, 70:M332-M338.
 55. Möller H., Grelier S., Pardon P., Coma V. 2004. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HPMC-based films. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 6585 -6591.
-

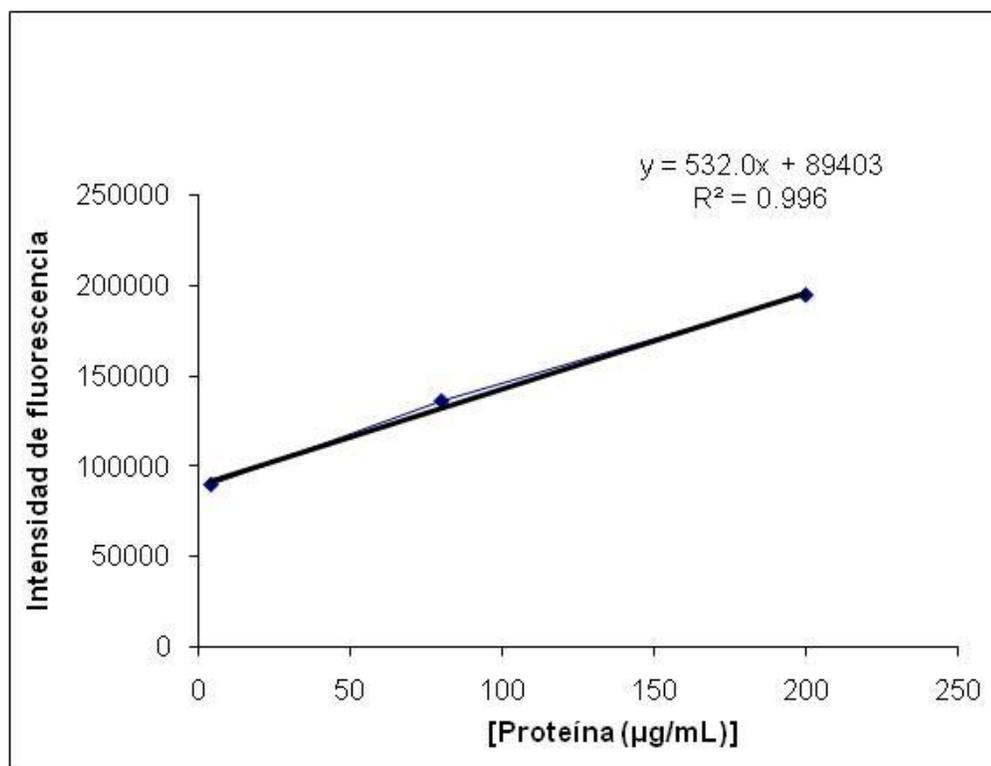
-
56. Nes I. F., Diep D. B., Havarstein L. S. y Brurberg M. B. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70:113-128.
 57. Nes I. F., Diep D. B., Holo H. 2007. Bacteriocins diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.*, 189:1189-1198.
 58. Onwulata C. I., Isobe S., Tomasula P. M., Cooke P. H. 2005. Properties of whey protein isolates extruded under acidic and alkaline conditions. *J. Dairy Sci.*, 89:71-81.
 59. Oussalah M., Caillet S., Salmiéri L.S., Lacroix M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J. Agric. Food Chem.*, 52:5598-5604.
 60. Oussalah M., Caillet S., Salmiéri S., Saucier L., Lacroix M. 2007. Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* present in bologna and ham. *J. Food Prot.*, 70:901-908.
 61. Perez- Gago M. B., Krochta J. M. 2000. Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. *J. Agric. Food Chem.*, 48:2687-2692.
 62. Pranoto Y., Rakshit S. K., y Salokhe V. M. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Food Sci. Tech.*, 38:859-865.
 63. Quintero S. B., Vernon-Carter E. J., Guerrero-Legarreta I., Ponce-Alquicira E. 2006. Incorporation of antilisterial bacteriocin-like inhibitory substance from *Pediococcus parvulus* VKMX133 into film-forming protein matrices with different hydrofobicity. *J. Food Sci.*, 70:M398-M403
 64. Ray B. y Miller K. W. 2000." Pediocin. En: Naidu AS, Editor. Natural food antimicrobial systems. New York: CRC Press. Boca Raton, pp. 525-566.
 65. Ray B., Miller K. W., Jain M. K. 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria: current perspectives. *I. J. Microbiol.*, 41:01-21.
-

-
66. Reed S. D. 1975. Enzymes in food processing. Ed. Academic press, N Y, E.U., pp: 219-229.
67. Rojas Gante C. 2005. Envases antimicrobianos para productos cárnicos. *Carne Tec.*, 12:41-44
68. Rojas-Graü M. A., Avena –Bustillos J., Friedman M., Henika P. R., Martín-Belloso O., McHugh T. H. 2006. Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 54:9262-9667.
69. Rooney L. M. 2003. Food safety and innovative food packaging. En: Schmidt HR. y Rodrick EG. (Ed.). Food safety handbook. John Wiley & Sons. NJ. EUA., pp. 411-423.
70. Salmieri S. y Lacroix M. 2006. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 54:10205-10214.
71. Sebti I., Chollet E., Degraeve P., Noel C., Peyrol E. 2007. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 693 -699.
72. Smith D. M. 1994. Protein interactions in gels: protein-protein interaction. En: Hettiarachchy NS. y Ziegler GR (Edts.). Protein functionality in food systems. Institute of food technologists. Chicago, Illinois, E.U., pp. 209-224.
73. Stiles M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 70:331-345.
74. Tapia M. S., Rojas-Graü M. A., Rodríguez F. J., Ramírez J., Carmona A., Martín-Belloso O. 2007. Alginate and gellan based edible films for probiotic coating on fresh-cut fruits. *J. Food Sci.*, 72: E190-E196.
75. Theivendran S., Hettiarachchy S., Johnson G. 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin combined with grape seed extract or green tea extract in soy protein film coated on turkey frankfurters. *J. Food Sci.*, 71:M39-M44.
-

76. Torres J. A. 1994. Edible films and coatings from proteins. En: Hettiarachchy N. S. y Ziegler G. R. Protein functionality in food systems. Editor. Institute of food technologists. Chicago, Illinois, E.U., pp. 485-487.
77. Tovar L., Salafranca J., Sánchez C., Nerín C. 2005. Migration studies to assess the safety in use of a new antioxidant active packaging. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 5270 -5275.
78. Townend R., y Gyuricsek D. M. 1973. Heat denaturation of whey and model protein systems. *J. Dairy Sci.*, 57: 1152-1158.
79. Tu L. y Mustapha A. 2002. Reduction of *Brochothrix thermosphacta* and *Salmonella* serotype *typhimurium* on vacuum packaged fresh beef treated with nisin and nisin combined with EDTA. *J. Food Sci.* 67:302-306.
80. Twomey D. R., Roos R. P., Ryan M., Meaney B., Hill C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function, and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82: 165-185.
81. Ustunol Z. y Mert. 2004. Water solubility, mechanical, barrier, and thermal properties of cross-linked whey protein isolated-based films. *J. Food Sci.*, 69:E129-E133.
82. Valdés M. S. E. 2006. Hidratos de carbono. En: Badui DS. Química de los alimentos. Editor. Pearson education, Edo. Mex. México, pp. 70.
83. Wooster T. J., y Augustina M. A. 2006. Rheologies of whey protein-dextran conjugate films at the air/water interface. *J. Food Eng.*, 4:521-530.
84. Yang R., Johnson M. C., Ray B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:1335-1359.
85. Zendo T., Fukao M., Ueda K., Higuchi T., Nakayama J., Sonomoto K. 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67:1616-1619.

11. Anexo I

Ejemplo de la evaluación de hidrofobicidad.



Resultados obtenidos para la evaluación del grado de hidrofobicidad de las películas elaboradas a pH 8.5 y adicionada con N a alta concentración.