



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**“Evaluación de la eficiencia de recubrimientos antimicrobianos adicionados
con bacteriocinas en la conservación de un producto cárnico”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

I.A. ROSALIA RUTH FERNÁNDEZ SOTO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

ASESORES:

DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

DRA. TERESITA DEL ROSARIO SAINZ ESPUÑES

México, D.F., Abril de 2015



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00192

Matrícula: 2113801195

EVALUACION DE LA EFICIENCIA DE RECUBRIMIENTOS ANTIMICROBIANOS ADICIONADOS CON BACTERIOCINAS EN LA CONSERVACION DE UN PRODUCTO CARNICO

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 10 del mes de abril del año 2015 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO
DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO
DRA. YENIZEY MERIT ALVAREZ CISNEROS
DRA. TERESITA DEL ROSARIO SAINZ ESPUÑES

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: ROSALIA RUTH FERNANDEZ SOTO



ROSALIA RUTH FERNANDEZ SOTO
ALUMNA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CÉSAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JOSE FERNANDEZ PERRINO

VOCAL

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO

VOCAL

DRA. YENIZEY MERIT ALVAREZ CISNEROS

SECRETARIA

DRA. TERESITA DEL ROSARIO SAINZ ESPUÑES

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

“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 el Fondo de Investigación Científica Básica SEP-CONACYT 2006, con número de solicitud 053658.

México D.F. a 10 de Abril de 2015.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis
“Evaluación de la eficiencia de recubrimientos antimicrobianos adicionados con bacteriocinas en la conservación de un producto cárnico”

que presentó

I.A. Rosalía Ruth Fernández Soto

Comité Tutorial:

Director: DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

Asesor: DR. FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

Asesor: DRA. TERESITA DEL ROSARIO SAINZ ESPUÑES

Jurado:

Presidente: Dr. Francisco José Fernández Perrino _____

Secretario: Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes _____

Vocal: Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano _____

Vocal: Dra. Yenizey Merit Álvarez Cisneros _____

Dedicatoria

A papito Dios por amarme tanto.

*A mi gran familia Fernández, los amo
mucho.*

*A mi pequeña familia Becerra, los quiero
mucho.*

Con todo mi amor:

A mi hijo Bruno y

A mi primer y último amor de mi vida.

Agradecimientos

A la Dra. Edith Ponce, por confiar en mí, por su paciencia y tolerancia, por sus consejos y sobre todo por brindarme un gran ejemplo de vida, muchísimas gracias.

A la Dra. Yenizey, por estar conmigo en todo momento, por tu gran apoyo moral y académico, por tu dedicación en mi formación profesional, por tu paciencia y por tu tiempo invertido en este proyecto, te lo agradezco infinitamente.

Al Dr. Paco, te agradezco mucho por las correcciones y sugerencias aportadas a este proyecto, por tu apoyo, por tus consejos, por tu gran disposición a ayudarme además de tu profesionalismo que te caracteriza.

A la Dra. Teresita, gracias por su gran disposición siempre que la visite, por brindarme confianza para poder preguntar, por la revisión y sugerencias brindadas en la escritura de la tesis.

A la Dra. Gabby, por revisar a detalle la tesis, por los comentarios, sugerencias y aporte en ideas para mejorar este proyecto, muchas gracias.

A Edson, por tu apoyo y disposición para enseñarme la técnica del DGGE y por salvarme siempre que lo necesite, gracias.

A Isadora gracias por estar conmigo en los momentos gratos y no tan gratos, por esperarme no una si no muchas veces, por hacerme olvidar el cansancio y poder reír, te extraño.

A Luis, por tu aporte y conocimientos en la elaboración de las películas, por hacerme la vida difícil y por los buenos momentos en el laboratorio, gracias.

A Isabel, por todos esos momentos vividos, gracias por tu aporte en la técnica de TBARS, por la curva patrón que tú sabes lo que me costó... Gracias.

A Mariel, por preocuparte por mí, por tu apoyo y disposición siempre por ayudarme te lo agradezco mucho.

Gracias a mi segunda familia: todos los integrantes del equipo del laboratorio S-132.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	3
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. PRODUCTOS CÁRNICOS	4
3.2. BACTERIAS COMÚNMENTE DETECTADAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS	4
3.3. LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	7
3.3.1. <i>Bacteriocinas</i>	8
3.3.2. <i>Enterocinas</i>	11
3.3.3. <i>Pediocinas</i>	12
3.3.4. <i>Modo de acción de las bacteriocinas de la clase IIa</i>	14
3.3.5. <i>Factores limitantes de las bacteriocinas</i>	16
3.4. TECNOLOGÍAS EN SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA	16
3.5. TECNOLOGÍAS DE BARRERA.....	16
3.5.1. <i>Empaques biodegradables</i>	17
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1. DIAGRAMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA	19
5.2. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	19
5.3. EXTRACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS.....	20
5.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS BACTERIOCINAS.....	20
5.4.1. VALORACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS BACTERIOCINAS POR TRATAMIENTO CON TRIPSINA	20
5.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA COMBINACIÓN ENTEROCINA-PEDIOCINA	21
5.6. MATERIALES EMPLEADOS PARA LA ELABORACIÓN DE RECUBRIMIENTOS BIODEGRADABLES	22
5.7. ELABORACIÓN DE LAS SOLUCIONES FORMADORAS DE RECUBRIMIENTOS.....	22
5.8. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL RECUBRIMIENTO.....	22
5.9. ELABORACIÓN DEL RECUBRIMIENTO ANTIMICROBIANO	23

5.10.	PREPARACIÓN DEL INÓCULO	23
5.11.	APLICACIÓN DEL RECUBRIMIENTO A UN PRODUCTO CÁRNICO.....	24
5.12.	MEDICIÓN DE PH	24
5.13.	DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS REACTIVAS AL ACIDO TIOBARBITÚRICO.....	24
5.14.	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	25
5.14.1.	<i>Técnica de cuenta en placa</i>	25
5.14.2.	<i>Técnica de DGGE</i>	25
5.14.2.1.	<i>Extracción de ADN</i>	25
5.14.2.2.	<i>Cuantificación de ADN</i>	26
5.14.2.3.	<i>PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)</i>	26
5.14.2.4.	<i>Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante</i>	27
5.14.2.4.1.1.	<i>Condiciones de DGGE</i>	28
5.14.2.4.1.2.	<i>Tinción del gel de DGGE</i>	28
5.14.2.4.1.3.	<i>Elución de ADN por el método de difusión en agua</i>	28
5.14.2.4.1.4.	<i>PCR</i>	28
5.14.2.4.1.5.	<i>Purificación</i>	28
5.14.2.5.	<i>Secuenciación</i>	28
5.15.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1.	CONFIRMACIÓN DE LA PUREZA DE LAS CEPAS.....	30
6.2.	ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS BACTERIOCINAS	32
6.2.1.	<i>Determinación de la actividad inhibitoria de la pediocina 133</i>	32
6.2.2.	<i>Determinación de la actividad inhibitoria de la enterocina 29</i>	34
6.2.3.	<i>Determinación de la estabilidad de las bacteriocinas por tratamiento con tripsina</i>	36
6.3.	EFFECTO DE LA COMBINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS COMBINACIONES DE PEDIOCINA-ENTEROCINA CONTRA MICROORGANISMOS SENSIBLES.....	37
6.3.1.	<i>Listeria innocua</i>	37
6.3.2.	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	41
6.3.3.	<i>Weissella viridescens</i>	45
6.3.4.	<i>Selección de las mejores combinaciones</i>	50
6.4.	SOLUCIONES FORMADORAS DE RECUBRIMIENTOS Y PELÍCULAS ANTIMICROBIANAS	50
6.4.1.	<i>Obtención de películas</i>	50
6.5.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS PELÍCULAS ADICIONADAS CON LAS COMBINACIONES ENTEROCINA 29/PEDIOCINA 133	51
6.6.	RECUBRIMIENTO ANTIMICROBIANO.....	58
6.7.	APLICACIÓN DEL RECUBRIMIENTO A SALCHICHAS TIPO VIENA.....	58

6.8.	EFFECTO DEL RECUBRIMIENTO EN SALCHICHAS INOCULADAS CON MICROORGANISMOS SENSIBLES.....	59
6.8.1.	Análisis Físicoquímicos:.....	59
6.8.1.1.	Variación de pH.....	59
6.8.2.	Análisis microbiológico	62
6.8.2.1.	Crecimiento de <i>Listeria innocua</i>	62
6.8.2.2.	Crecimiento de <i>Brochothrix thermosphacta</i>	64
6.8.2.3.	Crecimiento de <i>Weissella viridescens</i>	66
6.8.2.4.	Crecimiento de bacterias lácticas	67
6.8.3.	Análisis de la microbiota presente en la salchicha tratada con el recubrimiento antimicrobiano.....	68
6.8.3.1.	Extracción de ADN	69
6.8.3.2.	Cuantificación de ADN	70
6.8.3.3.	PCR.....	71
6.8.3.4.	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante	72
6.8.3.5.	Electroforesis de productos del PCR de reamplificación	74
6.8.3.6.	Secuencias de ADN.....	74
6.8.3.7.	Análisis y comparación de las secuencias	75
7.	CONCLUSIONES.....	77
8.	PERSPECTIVAS	79
9.	REFERENCIAS	80
10.	ANEXOS	91
	ANEXO A. MEDIOS DE CULTIVOS UTILIZADOS.....	91
	ANEXO B. ESTADÍSTICO DEL EFECTO <i>IN VITRO</i> DE LAS COMBINACIONES DE LAS BACTERIOCINAS	96
	ANEXO C.....	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de las bacteriocinas de acuerdo a su estructura primaria	9
Figura 2. Mecanismo de acción de las bacteriocinas (Tomado de Cotter, 2013).	10
Figura 3. Estructura primaria de Leucocina A, enterocina representativa de la clase II.....	12
Figura 4. Mecanismo de acción de las enterocinas de la clase IIa (tomado de Ennahar y col., 2000)	15
Figura 5. Estructura primaria de la pediocina PA-1.....	13
Figura 6. Diagrama general de la metodología.....	19
Figura 7. Arreglo de tablero de ajedrez de las combinaciones enterocina-pediocina	21
Figura 8. Características de la cepa <i>Enterococcus faecium</i> MXVK 29	30
Figura 9. Características de la cepa <i>Pediococcus acidilactici</i> MXVK 133.....	31
Figura 10. Características de la cepa <i>Listeria innocua</i> ATC33090	31
Figura 11. Determinación de estabilidad de la pediocina 133 producida por <i>Pediococcus acidilactici</i> MXVK 133.	32
Figura 12. Efecto inhibitorio de la pediocina 133	33
Figura 13. Efecto inhibitorio de la pediocina 133	34
Figura 14 Determinación de estabilidad de la enterocina 29 producida por <i>Enterococcus faecium</i> MXVK 2935	
Figura 15. Efecto inhibitorio de la enterocina 29..... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 16 Efecto inhibitorio de la enterocina 29.....	36
Figura 17. Estabilidad de bacteriocinas tratadas con tripsina	37
Figura 18. Comparación de medias de valores promedio de cultivos de <i>Listeria innocua</i> tratados in vitro con las combinaciones del arreglo de ajedrez enterocina 29-pediocina 133 in vitro.....	38
Figura 19. Efecto inhibitorio de las combinaciones enterocina 29-pediocina 133 (250-2000 UA/mL)/(2000 UA/mL); enterocina 29 (250-2000 UA/mL) y pediocina 133 (250-2000 UA/mL) sobre el crecimiento in vitro de <i>Listeria innocua</i> in vitro	41
Figura 20. Comparación de medias de valores promedio de cultivos in vitro de <i>Brochothrix thermosphacta</i> con las combinaciones del arreglo de ajedrez enterocina 29 – pediocina 133 in vitro	42
Figura 21. Efecto inhibitorio de las combinaciones enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (2000 UA/mL); enterocina 29 (250-2000 UA/mL) y pediocina 133 (250-2000 UA/mL) sobre el crecimiento in vitro de <i>Brochothrix thermosphacta</i>	45
Figura 22. Comparación de medias de valores promedio de cultivos in vitro de <i>Weisella viridescens</i> con las combinaciones del arreglo de ajedrez de enterocina 29 – pediocina 133.....	46
Figura 23. Efecto inhibitorio de las combinaciones enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (2000 UA/mL), enterocina 29 (250-2000 UA/mL) y pediocina 133 (250-2000 UA/mL) sobre el crecimiento in vitro de <i>Weisella viridescens</i>	49
Figura 24. Película antimicrobiana adicionada con las bacteriocinas enterocina 29 y pediocina 133.....	50

Figura 25. Películas antimicrobianas formadas a partir de APSL adicionadas con una combinación de bacteriocinas en diferentes concentraciones	51
Figura 26. Actividad antimicrobiana contra <i>Listeria innocua</i> de películas elaboradas a partir de APSL adicionadas con combinaciones de enterocina 29/pediocina 133 a pH 7.....	53
Figura 27. Actividad antimicrobiana contra <i>Listeria innocua</i> de películas elaboradas a partir de APSL adicionadas con combinaciones de enterocina 29/pediocina 133 a pH 7.....	54
Figura 28. Actividad antimicrobiana contra <i>Listeria innocua</i> de películas elaboradas a partir de APSL adicionadas con combinaciones de enterocina 29/pediocina 133 a pH 6.....	55
Figura 29. Actividad antimicrobiana contra <i>Brochothrix thermosphacta</i> de películas elaboradas a partir de APSL adicionadas con combinaciones de enterocina 29/pediocina 133 a pH 6	56
Figura 30. Actividad antimicrobiana contra <i>Weissella viridescens</i> de películas elaboradas a partir de APSL adicionadas con combinaciones de enterocina 29/pediocina 133 a pH 6.....	57
Figura 31. Recubrimiento antimicrobiano.....	58
Figura 32. Aplicación del recubrimiento a salchichas tipo Viena inoculadas con los microorganismos sensibles.	59
Figura 33. Salchicha tipo Viena con el recubrimiento antimicrobiano empacada al vacío	59
Figura 34. Efecto de la interacción del recubrimiento antimicrobiano sobre las UFC de las muestras de salchicha inoculadas con <i>Listeria innocua</i> almacenadas durante 40 días a 4 y 10 °C.....	64
Figura 35. Efecto de la interacción del recubrimiento antimicrobiano sobre las UFC de las muestras de salchicha inoculadas con <i>Brochothrix thermosphacta</i> almacenadas durante 40 días a 4 y 10 °C.....	65
Figura 36. Efecto de la interacción del recubrimiento antimicrobiano sobre las UFC de las muestras de salchicha inoculadas con <i>Weissella viridescens</i> almacenadas durante 40 días a 4 y 10 °C.....	67
Figura 37. Efecto de la interacción del recubrimiento antimicrobiano sobre las UFC de BAL de las muestras de salchicha inoculadas con los tres microorganismos sensibles almacenadas durante 40 días a 4 y 10 °C	68
Figura 38. Gel de electroforesis de la extracción de ADN, Carril 1, marcador de peso molecular; Carril 2, recubrimiento con pediocina 133 (2000 UA/mL) día 19; Carril 3, recubrimiento con enterocina 29 (2000 UA/mL) día 19; Carril 4, Control día 1; Carril 5, recubrimiento con enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL) día 1; Carril 6, recubrimiento con pediocina 133 (2000 UA/mL) día 1; Carril 7, recubrimiento con enterocina 29 (2000 UA/mL) día 1.	70
Figura 39. Productos de PCR del fragmento de los genes que codifican el ARNr 16S, Carriles 1 y 9, marcador de peso molecular; Carriles 2-4 tratamientos del día 19 (pediocina 133 (2000), enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000) y el control); Carriles 5-8 tratamientos del día 40 (enterocina 29 (2000), pediocina 133 (2000), enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000) y el control); Carriles 10-13 tratamientos del día 1 (enterocina 29 (2000), pediocina 133 (2000), enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000) y el control).	72
Figura 40. Gel de DGGE del ADN amplificado, Carriles 1 y 14, marcadores de peso molecular; Carriles 2-5 tratamientos del día 40, control, enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000), pediocina 133 (2000) y (enterocina 29 (2000); Carriles 6-9 tratamientos del día 19, control, enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000), enterocina	

29 (2000) y pediocina 133 (2000); Carriles 10-13 tratamientos del día 1, control, enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000), pediocina 133 (2000) y (enterocina 29 (2000)). 73

Figura 41. Gel de electroforesis de los productos de PCR obtenidos del ADN eluido de las bandas del gel de DGGE, Carril 1, marcador de peso molecular; Carriles 2-6, Columna A, bandas 1-5; Carriles 7-10, Columna D, bandas 1-4; Carril 11, Columna F, banda 1; Carriles 12-14, Columna L, bandas 1-3; Carril 15, Columna F, banda 1..... 74

Figura 42. Gel de electroforesis de ADN purificado **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 43. Gel de DGGE del ADN amplificado Gel de DGGE del ADN amplificado, Carriles 1 y 14, marcadores de peso molecular; Carriles 2-5 tratamientos del día 40, control, enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000), pediocina 133 (2000) y (enterocina 29 (2000)); Carriles 6-9 tratamientos del día 19, control, enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000), enterocina 29 (2000) y pediocina 133 (2000); Carriles 10-13 tratamientos del día 1, control, enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000), pediocina 133 (2000) y (enterocina 29 (2000)). 76

Figura 44. Variación de pH de las muestras de salchicha inoculadas con los tres microorganismos sensibles almacenadas durante 40 días a 4 y 10 °C 60

Figura 45 Determinación de rancidez de las muestras de salchicha inoculadas con los tres microorganismos sensibles almacenadas durante 40 días a 4 y 10 °C 62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2. Condiciones de amplificación por PCR	26
Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar el gen que codifica el ARN ribosomal 16S para DGGE.....	27
Tabla 4 Determinación de la estabilidad de la pediocina 133 en las etapas de extracción.....	33
Tabla 5. Determinación de la estabilidad de la enterocina 29 en las etapas de extracción	35
Tabla 6. Parámetros de las curvas de crecimiento de <i>Listeria innocua</i> con enterocina 29 (250-2000 UA/mL) y pediocina 133 (250-2000 UA/mL).....	39
Tabla 7. Parámetros de las curvas de crecimiento de <i>Listeria innocua</i> con las combinaciones enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (250 UA/mL) y enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (500 UA/mL)	39
Tabla 8. Parámetros de las curvas de crecimiento de <i>Listeria innocua</i> con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (1000 UA/mL) y enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (2000 UA/mL)	40
Tabla 9. Parámetros de las curvas de crecimiento de <i>Brochothrix thermosphacta</i> tratadas con enterocina 29 (250-2000 UA/mL) y pediocina 133 (250-2000 UA/mL)	43
Tabla 10. Parámetros de las curvas de crecimiento de <i>Brochothrix thermosphacta</i> con las combinaciones enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (250 UA/mL) y enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (500 UA/mL)	43
Tabla 11. Parámetros de las curvas de crecimiento de <i>Brochothrix termosphacta</i> con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (1000 UA/mL) y enterocina 29 (250-2000)/pediocina 133 (2000 UA/mL)	44
Tabla 12. Parámetros de las curvas de crecimiento de <i>Weisella viridescens</i> tratadas con enterocina 29 (250-2000 UA/mL) y pediocina 133 (250-2000 UA/mL).....	47
Tabla 13. Parámetros de las curvas de crecimiento de <i>Weisella viridescens</i> con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (250 UA/mL) y enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (500 UA/mL)	48
Tabla 14. Parámetros de las curvas de crecimiento microbiano de <i>Weisella viridescens</i> con las combinaciones enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (1000 UA/mL) y enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (2000)	48
Tabla 15. Cuantificación de ADN obtenido de muestras de salchichas inoculadas con <i>Weisella viridescens</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i> y <i>Listeria innocua</i> , tratadas con el recubrimiento antimicrobiano y almacenada durante 40 días a 4 y 10 ° C.....	71
Tabla 16. Microorganismos con mayor porcentaje de similitud de las secuencias obtenidas.	75

RESUMEN

La tecnología del empaqueo de alimentos se encuentra en continuo desarrollo en respuesta a los cambios que existen en la sociedad moderna, estos cambios se enfocan al gusto del consumidor, el aumento de la vida útil del alimento, seguridad alimentaria y alimentos saludables, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de un recubrimiento antimicrobiano elaborado con proteína de suero de leche adicionado con bacteriocinas en la calidad de salchichas tipo viena durante su almacenamiento. En la primera etapa se realizó la extracción de las bacteriocinas y se le determinó la actividad inhibitoria de las mismas, en la segunda etapa se evaluó la combinación de las bacteriocinas “*in vitro*” con *Listeria innocua*, *Brochothrix thermosphacta* y *Weissella viridescens*, además se estandarizó la técnica para la elaboración del recubrimiento y las películas, para poder así, evaluar su efecto con los tres microorganismos en estudio. En la tercera etapa se aplicó el recubrimiento antimicrobiano a salchichas tipo viena inoculadas con una carga microbiana de 10^5 UFC/mL de los tres microorganismos sensibles, evaluando fisicoquímica y microbiológicamente por 40 días. Se determinó la actividad inhibitoria de la pediocina 133 siendo 1956 UA/mL la cual se evaluó con los microorganismos sensibles, obteniendo que *Listeria innocua* mostró más sensibilidad seguido de *Brochothrix thermosphacta* por ultimo *Weissella viridescens* fue el microorganismo que mostró más resistencia a la pediocina. La actividad inhibitoria de la enterocina 29 fue de 266 UA/mL 86% menor que la pediocina, en este caso *Weissella viridescens* mostró mayor sensibilidad a la enterocina en las actividades más altas, mientras que la inhibición de *Brochothrix thermosphacta* y *Listeria innocua*, fue muy similar. Al evaluar la combinación de diferentes concentraciones de pediocina 133 con la enterocina 29 *in vitro* hubo una reducción significativa del desarrollo de los tres microorganismos sensibles, mediante el análisis del área fraccional (*fa*), el tratamiento enterocina-pediocina (E/P) con combinaciones 500-2000 y 1000-2000 UA/mL tuvo un efecto sinérgico con una *fa* de 0.04 y 0.03, mientras que para *Brochothrix thermosphacta*, no se encontró efecto sinérgico al combinar ambas bacteriocinas, solo si se aplican individualmente, con *Weissella viridescens* no se encontró efecto sinérgico debido a que este microorganismo fue inhibido en todos los tratamientos. Al evaluar la actividad antimicrobiana de las películas elaboradas con una relación 80:20 de aislado de proteína de suero de leche APSL y mezcla de bacteriocinas a pH de 6, se encontraron mejores resultados

a concentraciones más altas, finalmente se hizo una selección de las mejores combinaciones para aplicar en la última etapa. Se llevó a cabo el almacenamiento de salchichas tratadas con el recubrimiento antimicrobiano, La determinación de pH presentó un descenso durante todo el almacenamiento, atribuido probablemente a la presencia de BAL. En la determinación de la oxidación lipídica, se obtuvo un máximo el día 5 tanto para el control con 1.45 mg MDA/kg de producto como para los 3 tratamientos con el valor más alto con la pediocina individual de 0.87 mg MDA/kg de producto mientras que para el recubrimiento con la combinación de bacteriocinas el valor fue de 0.7 mg MDA/kg de producto. En el análisis microbiológico *Listeria innocua* alcanzó una disminución de un ciclo logarítmico con respecto al control, notando un efecto sinérgico con el recubrimiento con la combinación de las dos bacteriocinas excepto en el día 40 donde el efecto fue aditivo. Con *Brochothrix thermosphacta* en los primeros 5 días no hubo efecto de tratamiento en todas las combinaciones, posteriormente se observó mayor sensibilidad de este microorganismo durante todo el almacenamiento, con respecto a *Listeria innocua*, en especial en el recubrimiento con la combinación de las dos bacteriocinas manteniéndose 1.5 ciclos logarítmicos menos que el control. Con lo que respecta a *Weissella viridescens* el recubrimiento antimicrobiano con la combinación de las dos bacteriocinas, mostró un efecto sinérgico los días 12 y 26 obteniendo valores de 1.5 ciclos logarítmicos menos que el control, mientras que para el día 40 hubo un efecto aditivo de los 3 tratamientos. En el análisis microbiológico de las bacterias ácido lácticas se observó que el tratamiento con el recubrimiento antimicrobiano con las dos bacteriocinas se mantuvo 0.5 ciclos logarítmicos menos que el control durante el almacenamiento excepto en el día 40 donde se mantuvo 1.5 ciclos logarítmicos menos que el control. Para estudiar la microbiota presente primero se extrajo el ADN de las muestras de salchichas tratadas con el recubrimiento los días 1, 19 y 40 y el control, después de cuantificar el ADN, se procedió a amplificar el mismo, a los productos de PCR, se les realizó una corrida electroforética, en gel con gradiente desnaturante DGGE, las bandas de interés fueron cortadas, se purificó el ADN y se reamplificó, se procedió a secuenciar, las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos BLAST encontrando los microorganismos con mayor % de similitud : *Lactobacillus sakei*; *Carnobacterium maltaromaticum* LMA 28 y *Lactobacillus curvatus*, de acuerdo con el gel de DGGE, *Lactobacillus sakei* se encuentra en todos los tratamientos durante todo el almacenamiento, *Lactobacillus curvatus* se encuentra en todos los tratamientos del día 1 y

Carnobacterium maltaromaticum se encontró en el día 1 en el tratamiento enterocina individual y en el día 40 en el tratamiento con pediocina-enterocina y en el control. Se concluye que las salchichas inoculadas con los microorganismos *Listeria innocua* y *Brochrothrix thermosphacta*, tratadas con el recubrimiento antimicrobiano adicionado con la combinación E/P 2000/2000 UA/mL, mantuvieron la calidad fisicoquímica y microbiológica por 26 días, asegurando la inhibición en especial de *Listeria innocua*.

ABSTRACT

The food packaging technology is constantly evolving in response to changes that exist in modern society, these changes focus to consumer tastes, increasing the life of food, food safety and healthy food, the objective of this study was to evaluate the effect of an antimicrobial coating based on whey protein isolated added with bacteriocins quality frankfurters during storage. In the first stage extraction bacteriocins was performed and it was analyzed for inhibitory activity thereof, in the second stage the combination of bacteriocins "in vitro" with *Listeria innocua*, *Brochothrix thermosphacta* and *Weissella viridescens* assessed also was standardized technique for the preparation of the coating, to thus evaluate its effect with three organisms under study. In the third stage the antimicrobial coating was applied to frankfurters inoculated with 10^5 CFU/mL of three sensitive microorganisms, it were evaluated physicochemical and microbiologically for 40 days. Inhibitory activity was determined pediocin 133 being 1956 AU/mL which was evaluated with the susceptible organisms, obtaining *Listeria innocua* showed greater sensitivity that *Brochothrix thermosphacta* finally the microorganism *Weissella viridescens* showed more resistance to pediocin. The inhibitory activity of enterocin 29 was 266 AU/mL 86% lower than pediocin, in this case *Weissella viridescens* showed greater sensitivity to enterocin, when it was at higher activities, while that *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* were showed the same inhibition. To evaluate the combination of different concentrations of pediocin 133 and enterocin 29 *in vitro* there was a significant reduction of the development of the three sensitive microorganisms, by analyzing the fractional area (*fa*), enterocin-pediocin treatment with combinations (E/P) 500-2000 y 1000-2000 AU/mL had a synergistic effect with a *fa* of 0.04 and 0.03 respectively, while for *Brochothrix thermosphacta*, no synergistic effect was found by combining the two bacteriocins, only if applied individually, *Weissella viridescens* was found no synergistic effect, because this microorganism was inhibited all treatments. To evaluate the antimicrobial activity of coating made with an 80:20 of protein isolate whey (WPI) and mixture bacteriocins at pH 6, best results were found higher concentrations, eventually became a selection of the best combinations to implement in the final stage. Was conducted storing frankfurters treated with the antimicrobial coating. The pH determination showed a decline throughout the storage, probably attributable to the presence of BAL. Lipidic oxidation was a maximum at

day 5 for control MDA 1.45 mg/ kg product and for 3 treatments with the highest value with individual pediocin MDA 0.87 mg/kg product, the treatment with combination of bacteriocins was a value MDA 0.7 mg/kg product. In the microbiological analysis *Listeria innocua* reached a one log cycle decrease relative to the control, a synergistic effect coating with the combination of the two bacteriocins except at day 40, where the effect was additive. With *Brochothrix thermosphacta* in the first 5 days no treatment effect on all combinations, then increased sensitivity of this microorganism was observed during the storage, relative to *Listeria innocua*, especially in coating with the combination of the two bacteriocins remaining 1.5 log cycle less than the control. With *Weissella viridescens*, the treatment with two bacteriocins, showed a synergistic effect on 12 and 26 day obtaining values of 1.5 log cycle less than the control, while for the day 40 there was an additive effect of 3 treatments. In the microbiological analysis of the lactic acid bacteria was observed that treatment with both bacteriocins 0.5 log cycles was maintained unless the control during storage except at day 40 where 1.5 log cycles unless the control. To study microbial diversity, first DNA extraction from samples frankfurters treated with the antimicrobial coating and control, on days 1, 19 and 40, after quantify DNA extracted, proceeded to amplify the same, PCR products were performed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), after cutting band, purification and subsequent amplification of DNA fragments proceeded to sequencing, the obtained sequences were searched in BLAST from GenBank were used to find the closest known relatives to the partial 16S rDNA sequences, microorganisms with higher identity: *Lactobacillus sakei*; *Carnobacterium maltaromaticum* and *Lactobacillus curvatus* 28 LMA according to the DGGE gel, *Lactobacillus sakei* is in all treatments throughout the storage, *Lactobacillus curvatus* is in all treatments at Day 1 and *Carnobacterium maltaromaticum* was found on day 1 in individual enterocin treatment and on day 40 in the pediocin- enterocin treatment and control. It is concluded that the frankfurters inoculated with *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta*, with antimicrobial coating with combination E/P 2000/2000 AU/mL, kept physicochemical and microbiological quality for 26 days, especially ensuring inhibition of *Listeria innocua*.

1. INTRODUCCIÓN

La carne y productos cárnicos se caracterizan por su elevado contenido en proteína y humedad además de poseer un pH cercano a la neutralidad, estas características permiten el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos, así como de otras reacciones físicas y químicas que en conjunto limitan la vida de anaquel de este alimento. Si bien, los métodos de refrigeración y congelación se emplean de forma rutinaria dentro la cadena de distribución de la carne y derivados, se está en la búsqueda de otros procesos tecnológicos que en combinación limiten las reacciones de deterioro mejorando así las posibilidades para su comercialización y distribución. Dentro de las nuevas tecnologías destacan el uso de altas presiones hidrostática, la irradiación, los pulsos eléctricos de alto voltaje, el empleo de microondas, así como el uso de empaques activos, la bioconservación y el empleo de antimicrobianos de origen natural, entre otros (Lee, 2010).

En particular la bioconservación comprende el uso de bacterias lácticas y/o sus metabolitos para inhibir la flora alterante. Algunas bacterias lácticas pueden producir bacteriocinas que son péptidos antimicrobianos, sintetizados ribosomalmente durante la fase de crecimiento exponencial de la célula bacteriana. La producción de bacteriocinas se origina a modo de defensa, contra los grupos bacterianos relacionados filogenéticamente (Guerra y Pastrana, 2002; Guerra y col., 2001), aunque destacan aquellas bacteriocinas que pueden inhibir a patógenos como *Listeria monocytogenes*. Si bien las bacteriocinas pueden incorporarse directamente al alimento, es recomendable introducirlas dentro de un sistema de barrera a fin de prolongar su acción inhibitoria, ya que la incorporación directa de antimicrobianos puede ser menos eficaz debido a la interacción con los componentes del alimento (Quintavalla y Vinci, 2002; Sangsuwan y col., 2009). En este sentido, las bacteriocinas pueden ser parte de un sistema de empaque activo, donde se asegura su liberación gradual desde la matriz polimérica de la película a la superficie del alimento, proporcionando y ejerciendo su acción inhibitoria.

Por otra parte, el estudio de la diversidad microbiana en comunidades complejas, como los productos cárnicos, se basa en el uso de métodos moleculares en los que no necesariamente se requiere el cultivo directo de microorganismos. Dos de los métodos más utilizados que se basan en la separación electroforética de los fragmentos de rDNA son la electroforesis

en geles con gradiente desnaturalizante (DGGE, por sus siglas en inglés) y la electroforesis en geles con gradiente de temperatura (TGGE, por sus siglas en inglés) que permiten separar fragmentos de la misma longitud pero con diferentes secuencias para analizar la presencia o ausencia de microorganismos en una comunidad microbiana (Díaz y Wachter, 2003).

El objetivo de la tesis es evaluar la eficiencia de un recubrimiento elaborado con proteína de suero de leche y almidón, adicionado con bacteriocinas, para mantener la calidad de un producto cárnico durante el almacenamiento en refrigeración y en condiciones de abuso de temperatura.

2. JUSTIFICACIÓN

La carne fresca y productos cárnicos son alimentos con alta incidencia en el desarrollo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) en la que *L. monocytogenes* se considera como uno de los principales microorganismos de control. Debido a la constante preocupación del consumidor por su salud y el cuidado del medio ambiente ha aumentado la demanda de alimentos que estén exentos de conservadores químicos, concentrándose en el uso de compuestos naturales, como la aplicación de bacteriocinas en los empaques, protegiendo así al producto, debido a que se presenta, una liberación gradual de las bacteriocinas, desde la matriz polimérica de la película, a la superficie al alimento, ya que la incorporación directa de las bacteriocinas puede ser menos eficaz, debido a la interacción que se pudiera dar con los componentes del alimento. Por lo que se propone la incorporación de bacteriocinas a recubrimientos biodegradables, dentro de un sistema de barreras, para aumentar la seguridad y vida de anaquel de un producto cárnico.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Productos cárnicos

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-194-SSA1-2004), se entiende por carne a “la estructura muscular estriada esquelética, acompañada o no de tejido conectivo, hueso y grasa, además de fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos; proveniente de los animales para abasto, que no ha sido sometida a ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas”; pudiendo ser refrigeradas o congeladas. En contraste, un producto cárnico procesado es “el que ha sido elaborado a partir de carne, vísceras, estructuras anatómicas, sangre o sus mezclas, provenientes de mamíferos o aves, que puede someterse a ahumado, cocción, curación, desecación, maduración, salado, entre otros” (NOM-213-SSA1-2002). La Norma Oficial Mexicana para salchicha (NMX-F-065-1984) define a este producto de la siguiente manera “es el producto alimenticio de pasta semifirme de color característico, elaborado con mezcla de carne (60% mínimo) de ternera o res o cerdo y grasas de las especies antes mencionadas, adicionado de condimentos, especias y aditivos alimentarios”. De manera general, se puede establecer que existen dos tipos de pasta (embutidos o salchichas): picadas y tipo emulsión. En ambos casos, existen productos ahumados, cocidos, refrigerados, congelados, secados y curados. Los productos picados presentan partículas de carne y grasa que pueden apreciarse a simple vista mientras que en las emulsiones esto no es posible (Blanno, 2005).

3.2. Bacterias comúnmente detectadas en productos cárnicos

La Flora microbiana presente en carne y productos cárnicos es diversa y puede clasificarse por su efecto en flora patógena y alterante. Las bacterias patógenas más importantes asociadas con la carne y sus productos son: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhi*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, ciertos serotipos de *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, los serotipos patogénicos de *Escherichia coli* (dentro los cuales *E. coli* O157:H7 es una de las más importantes) y *Aeromonas sp* que crecen a temperaturas de refrigeración. Los microorganismos de deterioro se pueden dividir en bacterias Gram negativas en forma de bacilo (*Pseudomonas sp*), bacterias Gram positivas formadoras de esporas (*Bacillus sp*), géneros de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus sp*, *Streptococcus sp*, *Leuconostoc sp*, *Pediococcus sp* y *Weissella viridescens*) y otras bacterias

Gram positivas (*Brochothrix thermosphacta*, *Micrococcus sp*), además de mohos y levaduras. El deterioro provocado por microorganismos es muy rápido en un alimento nutritivo, como la carne de res, cerdo, pescado, leche y productos lácteos: estos alimentos son altamente nutritivos, poseen un pH neutro o ligeramente ácido y un contenido de humedad alto, por lo que estas condiciones permiten el crecimiento de un amplio variedad de microorganismos (Huis in 't Veld, 1996).

La Organización Mundial de la Salud ha definido el envenenamiento alimentario como “cualquier enfermedad de naturaleza tóxica o infecciosa que ha sido causada por o a través del consumo de alimentos o agua”(Yassi y col., 2002). La definición incluye todas las enfermedades de origen alimentario o de agua sin considerar los síntomas que presente; esto es, incluye no sólo enfermedades graves caracterizadas por diarrea o vómitos, sino también enfermedades no relacionadas con el tracto gastrointestinal como la listeriosis y las causadas por sustancias químicas (intoxicaciones) de origen biológico como el caso del botulismo.

En una infección alimentaria la enfermedad es producida por la enterotoxina una vez que se encuentra en el organismo infectado, mientras que en la intoxicación alimentaria la toxina se produce en el alimento, como es el caso del botulismo provocado por la toxina de *Clostridium botulinum*.

Listeria sp

Características

Es un bacilo corto, de 0.5 a 2 micras de longitud, Gram-positivo, que se agrupa en empalizadas, móviles por un flagelo polar, catalasa-positivo, anaerobio facultativo, no formador de esporas y psicrotrópica (Walker y col., 1990), como se muestra en la tabla 1, en donde se resumen las características de crecimiento. Su supervivencia en alimentos de origen animal o vegetal y en plantas procesadoras de alimentos, durante largos periodos de tiempo ha hecho que este microorganismo represente el principal problema de la industria agroalimentaria (Rocourt y Cossart, 1997).

Listeria monocytogenes es causante de la enfermedad de listeriosis, estos casos suelen estar asociados con el consumo de productos alimentarios tratados térmicamente. Se ha encontrado principalmente en productos cárnicos, quesos blandos y otros productos lácteos.

En los productos tratados térmicamente el principal problema es la contaminación cruzada después del calentamiento y, en menor porcentaje, el procesado térmico insuficiente.

La listeriosis se manifiesta como una meningitis o una infección intra-uterina en mujeres embarazadas. Este último caso, puede presentar síntomas muy suaves inicialmente, pero usualmente termina con un aborto o un nacimiento prematuro que posteriormente supone, en un 20-40 % de los casos, la muerte del neonato.

Métodos para su control

La forma de reducir el riesgo de contaminación por *Listeria* en carne y sus productos consiste en un estricto seguimiento de Buenas Prácticas de Manufactura, especialmente en la prevención de contaminación por heces y exudados faríngeos, así como la higiene del personal. Para el caso de productos procesados para inactivar a *L. monocytogenes* se debe considerar un tratamiento a 70 °C de al menos dos minutos. Algunos conservadores como el nitrito, junto con una baja actividad de agua, pueden proporcionar un efecto inhibitorio del microorganismo.

Brochothrix thermosphacta

Características

Son bacterias Gram positivas, en forma de cocos, forman cadenas cortas, no forman cápsulas ni esporas, son aerobias y anaerobias facultativas, no pigmentadas, son heterofermentativas con producción de ácido láctico, acetoína, ácido acético y otros ácidos grasos. Es rojo de metilo positivo y Voges-Proskauer- positivo, que es una prueba bioquímica que nos sirve para diferenciar especies de bacillus y bacterias entéricas, ya que los productos de la fermentación de una bacteria fermentadora de glucosa, como los antes mencionados reaccionan con el indicador dando un color rojo (+) en ambos casos (MacFaddin, 2003). El crecimiento de este microorganismo genera malos olores en carne empacada al vacío, sus características se muestran en la tabla 1.

Métodos para su control

El crecimiento es inhibido a valores de pH menores de 5.0 y a temperaturas de incubación bajas, de manera conjunta se puede utilizar nitrito para la inhibición del microorganismo (Collins y Rodríguez, 1980). Se inactiva térmicamente a 63°C durante 5 min.

Weissella viridescens

Este es un género que incluye a un antiguo miembro del género *Leuconostoc* (*Leuconostoc paramesenteroides*). De igual manera, dentro de este género se incluyen miembros heterofermentativos del género *Lactobacillus* como *Lactobacillus viridescens*, renombrado como *Weissella viridescens* (Stiles y Holzapfel, 1997).

Características

Weissella viridescens es un bacilo corto Gram positivo, catalasa negativo, no formador de esporas, puede fermentar glucosa, fructuosa y manosa (Collins y col., 1993). Se ha detectado en carne y productos cárnicos (Milbourne, 1983; Santos y col., 2005; Koort y col., 2006) y en salchichas fermentadas (Collins y col., 1993). Las características de crecimiento se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características de crecimiento de los microorganismos en estudio

Microorganismo sensible	Aw mínima	pH mínimo	pH máximo	% sal máxima	Temp. óptima °C	Temp. máxima °C	Requerimientos de oxígeno
<i>L. monocytogenes</i>	0.92-0.95	4.5 a 4.8	9.5 a 9.6	8 a 12	0 a 10	45	Anaerobio facultativo
<i>B. thermosphacta</i>	0.92-0.95	5.0	9.0	8 a 12	20 a 25	30	Anaerobio facultativo
<i>W. viridescens</i>	0.97-0.98	1	5	6-8	15	45	Anaerobio facultativo

Fuente (Gardner y col., 1981; Farber y Peterkin, 1991; Comi y Iacumin, 2012)

3.3. Las bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son los principales microorganismos utilizados en la elaboración de productos lácteos fermentados. Entre estas bacterias se incluye un amplio número de géneros que se definen como bacterias Gram-positivas, generalmente catalasa-

negativas, microaerófilas o anaerobias facultativas, no formadoras de esporas y que producen principalmente ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares (Cleveland, 2001). Los géneros más importantes son: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* (Cogan, 1996).

Las BAL presentan efecto antimicrobiano, el cual se debe a la gran cantidad de metabolitos que producen (por ejemplo, ácido acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas); además son microorganismos reconocidos como GRAS por sus siglas en inglés (Generally Recognized As Safe).

3.3.1. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos de bajo peso molecular sintetizados ribosomalmente por el metabolismo celular durante la fase exponencial. Son termoestables y pH tolerantes, inocuas para el ser humano porque pueden ser inactivadas por proteasas gastrointestinales (Zacharof y Lovitt, 2012), con un amplio espectro de inhibición contra bacterias patógenas y de deterioro (Gálvez y col., 2007).

3.3.1.1. Clasificación

En la figura 1 se muestra la clasificación de las bacteriocinas de acuerdo a su estructura primaria, en dos clases: Clase I lantibióticos y Clase II bacteriocinas no modificadas (Sahl y col., 1995; Cotter y col., 2013).

Los lantibióticos (clase I) son péptidos que han sufrido modificaciones postraduccionales, son termoestables, con un tamaño de menos de 5 kDa, se caracterizan por tener en su estructura deshidroaminoácidos y tioéter aminoácidos, como deshidroalanina, deshidrobutirina, lantionina y β -metil-lantionina (Lozano y col., 1992; Nes y col., 1996; Dischinger y col., 2014).

La clase II son péptidos de menos de 10 kDa (no lantibióticos), termoestables, se dividen en cinco subclases. La subclase IIa son activos contra *Listeria*, su modo de acción es por permeabilización de la membrana celular y se les menciona como *pediocin-like* debido a su semejanza con la pediocina PA-1. Algunos géneros de bacterias productoras de bacteriocinas de esta subclase son: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*

y *Carnobacterium*. La subclase IIb la incluyen bacteriocinas que necesitan la presencia de dos péptidos para que se lleve a cabo su actividad antimicrobiana. La subclase IIc son bacteriocinas con péptidos circulares. La subclase IId son bacteriocinas con un solo péptido lineal, no *pediocin like* mayores de 30 kDa y termolábiles. La subclase IIe son péptidos que anteriormente se incluían en la subclase IIb, nombrados microcinas, como la microcina E 492- *like* (Henderson y col., 1992; Eijsink y col., 1998; Uteng y col., 2003).

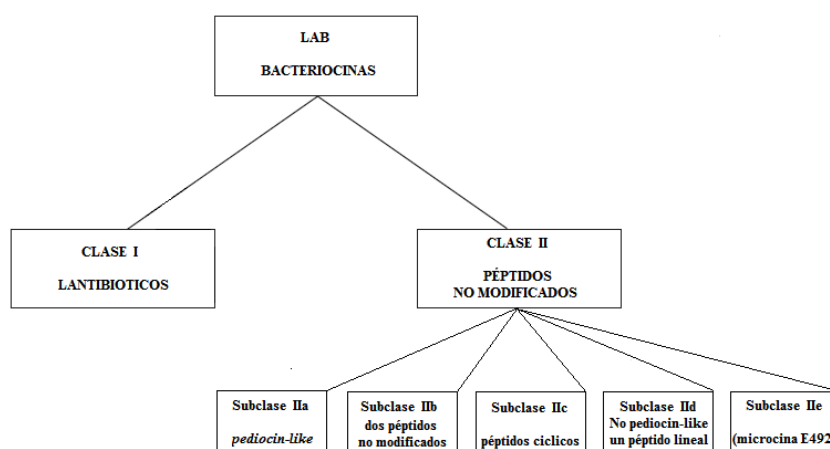


Figura 1. Clasificación de las bacteriocinas de acuerdo a su estructura primaria

Fuente (Cotter y col., 2013).

3.3.1.2. *Modo de acción*

Existen dos mecanismos de acción de importancia de acuerdo a la clasificación de las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas, cuando inhiben a bacterias gram positivas. En la figura 2 se muestra el primer mecanismo, llevado a cabo por algunas bacteriocinas de la clase I, como la nisina, la cual se une a la pared celular mediante atracciones electrostáticas, debido a la carga positiva de este péptido y las cargas negativas de los componentes de la membrana celular, enseguida se une al lípido II (principal transportador de las subunidades de peptidoglucano desde el citoplasma a la pared celular) inhibiendo así la síntesis de peptidoglucano, formado el poro en la membrana celular y la consecuente salida de aminoácidos y ATP principalmente, provocando la muerte celular (Cotter y col., 2005; Martin y Breukink., 2007; Bierbaum y Sahl., 2009). El segundo

mecanismo es utilizado por algunas bacteriocinas de la clase II, las cuales actúan predominantemente formando poros en la membrana celular, mediante un reconocimiento de la bacteriocina con el receptor de membrana, seguido de uniones electrostáticas que le permite insertarse dentro de la membrana, interfiriendo con su estructura y conduciendo a una despolarización y por tanto pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP) el cual juega un papel importante en la síntesis de ATP y en el transporte activo, inhibiendo así la síntesis de macromoléculas y la producción de energía, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular (Hu y col., 2006). En el 2013 Cotter y col., menciona un mecanismo llevado a cabo por algunas bacteriocinas de la clase IIa, mediante la asociación de a un receptor que está relacionado al sistema fosfotransferasa para azúcares PTS, el cual es un mecanismo para importar carbohidratos al interior de la célula), que a su vez conduce la formación del poro y la muerte celular (Diep y col., 2007).

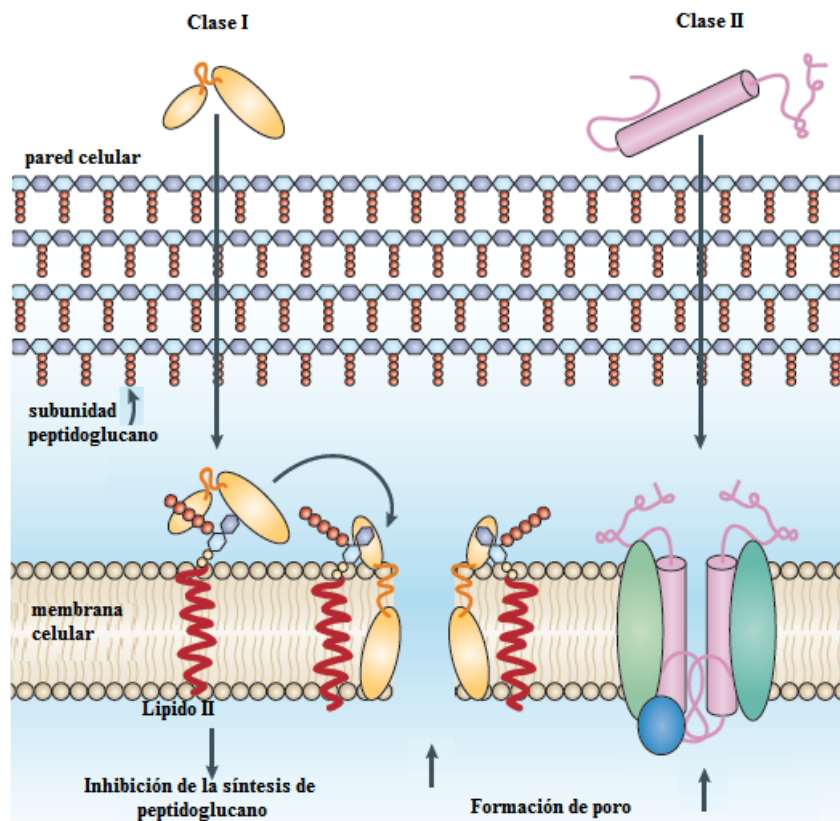


Figura 2. Mecanismo de acción de las bacteriocinas (Tomado de Cotter, 2013).

3.3.1.3. Aplicación de las bacteriocinas en productos cárnicos

Las bacterias que producen bacteriocinas son inmunes a sus propias bacteriocinas, sin embargo son activas contra grupos bacterianos relacionados filogenéticamente, tanto

bacterias Gram positivas como algunas Gram negativas. Sin embargo, hay bacteriocinas, entre ellas la nisina, que presentan un espectro de actividad amplio (Cintas y col., 2001; Cotter y col., 2005; Economou y col., 2009; Lindsay, 2010). Tanto la nisina como la pediocina, son las más estudiadas debido a que son consideradas como GRAS, la pediocina es una bacteriocina que ya está siendo aplicada en el sector alimentario como bioconservador (Cintas y col., 2001), teniendo una alta actividad anti-listeria, ya se comercializa y está incluida en patentes europeas y norteamericanas (Chen y Hoover., 2003). Los nitritos son comúnmente utilizados para prevenir el crecimiento de *Clostridium* en carne, sin embargo, existe una preocupación por parte del consumidor por la presencia de estos compuestos, por lo que se ha propuesto y encontrado una alternativa de combinación de nisina con bajos niveles de concentración de nitritos, inhibiendo el crecimiento de *Clostridium botulinum* (O' Sullivan y col., 2002).

3.3.2. Enterocinas

Las enterocinas son bacteriocinas producidas por algunas especies de enterococos, hasta la fecha se han descrito alrededor de 25 especies, pero las cepas productoras de enterocinas más importantes son *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* y *Enterococcus munditi* (Klein 2003). La aplicación de enterocinas puede formar parte una tecnología de barrera en la conservación de productos cárnicos como salchicha (Gálvez y col., 2007), y pueden ser consideradas como una alternativa al uso tradicional de conservadores químicos, previniendo el crecimiento de *Listeria monocytogenes* (Callewaert y col., 2000; Sabia y col., 2003; Hugas y col., 2003).

3.3.2.1. Estructura

La estructura de las enterocinas es una característica muy importante para poder diferenciarlas, ya que teniendo el conocimiento de la secuencia de aminoácidos, se puede determinar el tipo de interacciones electrostáticas que se producirán tanto en el péptido como con su entorno, para poder determinar su mecanismo de acción así como una posible clasificación. La enterocina producida por *Enterococcus faecium* se caracteriza por contar con una secuencia amino terminal –Tirosina-Glicina-Asparagina-Glicina-Valina-Xaa-Cisteina- (-Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-) donde Xaa indica cualquier residuo de aminoácido y contiene 1 o dos puentes disulfuro (Chen y Hoover., 2003), clasificándola en la clase II con actividad antilisteria, en la figura 3 se observa la estructura primaria de la

Leucocina A, enterocina representativa de este grupo, con una secuencia consenso de YGNGV en el extremo N-terminal y un puente disulfuro (Ennahar y col., 2000).

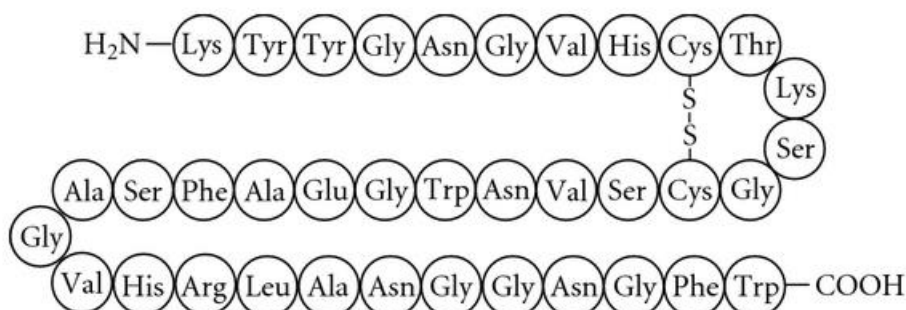


Figura 3. Estructura primaria de Leucocina A, enterocina representativa de la clase IIa (tomado de Lohans y Vederas, 2012).

3.3.2.2. Clasificación

En la actualidad se han caracterizado gran variedad de enterocinas producidas por el género enterococos, por lo que se ha propuesto una clasificación simplificada para las mismas, en la clase I se encuentran las enterocinas lantibióticas que sufren modificaciones post-traduccionales. En la clase II tenemos a las enterocinas formadas por péptidos lineales no modificados con un peso molecular de menos de 10 kDa, la clase III consiste en péptidos cíclicos y la clase IV abarca grandes proteínas lábiles al calor (Khan y col., 2010). Las enterocinas más estudiadas son la enterocina A y B pertenecientes a la clase II, se ha encontrado que tienen actividad contra bacterias Gram positivas y algunos géneros como: *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Listeria*, *Staphylococcus*. Las enterocinas han sido aplicadas como cultivos iniciadores en queso (Liu y col., 2008; Izquierdo y col., 2009) y en embutidos fermentados (Aymerich y col., 2000) además se han aplicado como conservadores en jamón (Garriga y col., 2002; Marcos y col., 2008). La enterocina AS-48 perteneciente a la clase III ha atraído gran interés por su potencial como conservador natural no solo contra especies relacionadas filogenéticamente sino también contra microorganismos de deterioro y patógenos como *Salmonella entérica*, *E. coli O157:H7* y *Shigella spp* (Cotter y col., 2005; Molinos y col., 2008).

3.3.3. Pediocinas

El género *Pediococcus* pertenece al grupo de bacterias ácido lácticas, sus células son esféricas, aparecen como tétradas y pares, pero nunca solas o en cadenas. Son Gram positivas, no móviles, no esporuladas, anaerobias facultativas, con fermentación

homoláctica, catalasa negativas y presentan un rango óptimo de crecimiento de 25 a 40 °C (Garvie, 1986), las cuales están asociadas con la fermentación de carnes y vegetales, donde juegan un papel importante en la producción de ácido, desarrollo de sabor y en la sucesión de microorganismos en ecosistemas fermentativos naturales. Además, tiene la ventaja de producir pediocinas efectivas contra otras bacterias lácticas y algunos patógenos Gram negativos (Klaenhammer, 1993). Las especies productoras de pediocina PA-1 son *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus parvulus* y *Lactobacillus plantarum* (Bernbom y col., 2009), la cual se ha comprobado su eficacia en la inhibición de *L. monocytogenes* en carne (Mattila y col., 2003; Uhart y col., 2004) y en salchichas (Cintas y col., 2000).

3.3.3.1. Estructura

En la figura 5 se observa la estructura primaria de la pediocina PA-1, la cual se encuentra formada por 44 aminoácidos, con una masa molecular de aproximadamente 4.5 kDa, termoestables, con un punto isoelectrico entre 8.6 y 10. Es estable en soluciones acuosas principalmente a pH 6 (Ennahar y col., 2000), tiene carga neta positiva, es una molécula anfipática, con altas regiones hidrofóbicas, en el extremo N-terminal contiene una secuencia consenso para todas las bacteriocinas de la clase IIa (YGNGVxC), donde presenta un enlace disulfuro Cys⁹–Cys¹⁴, el cual estabiliza la conformación β de éste extremo (Chen y Hoover., 2003), el extremo C-terminal presenta un enlace disulfuro Cys²²–Cys⁴⁴ que ayuda a que la estructura secundaria de éste extremo sea de α -hélice (Ennahar y col., 2000).

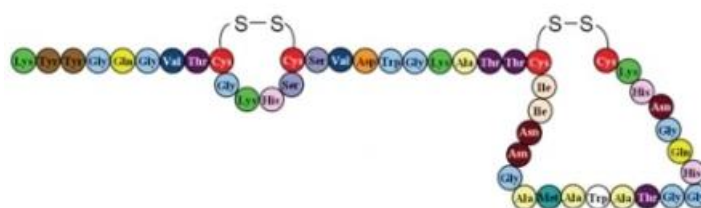


Figura 4. Estructura primaria de la pediocina PA-1 (tomado de Desriac y col., 2010).

3.3.3.2. Clasificación

Las pediocinas producidas por *Pediococcus* se encuentran dentro la clase II en la subclase IIa de las bacteriocinas, mostrando una fuerte actividad antilisteria (Nes y col., 1996).

3.3.4. Modo de acción de las bacteriocinas de la clase IIa

Las bacteriocinas de la clase IIa no modificadas de pequeño tamaño y termoestables, funcionan mediante un mecanismo de formación de poros (Ennahar y col., 2000), siguiendo el modelo de duela de barril o mecanismo de tapiz mostrado en la figura 4, donde el extremo N-terminal de la molécula adopta una conformación β laminar que es estabilizada por un puente disulfuro, que le permite interaccionar con la membrana mediante un receptor (1), posteriormente se establece una interacción electrostática (2), mientras en el extremo C-terminal adopta una conformación α hélice anfipática, donde la parte hidrofóbica de la hélice (parte oscura) interacciona con las cadenas de los ácidos grasos de los lípidos de la membrana (3), finalmente existe una reorientación e inserción de la bacteriocina, formándose el poro en la membrana (4) (Hu y col., 2006). La parte de la hélice más clara es hidrofílica, mientras la parte oscura es hidrofóbica, por la permeabilización de la membrana, la célula empieza a perder iones y metabolitos, produciéndose una posterior muerte celular (Cotter y col., 2005; Naidu y col., 2006).

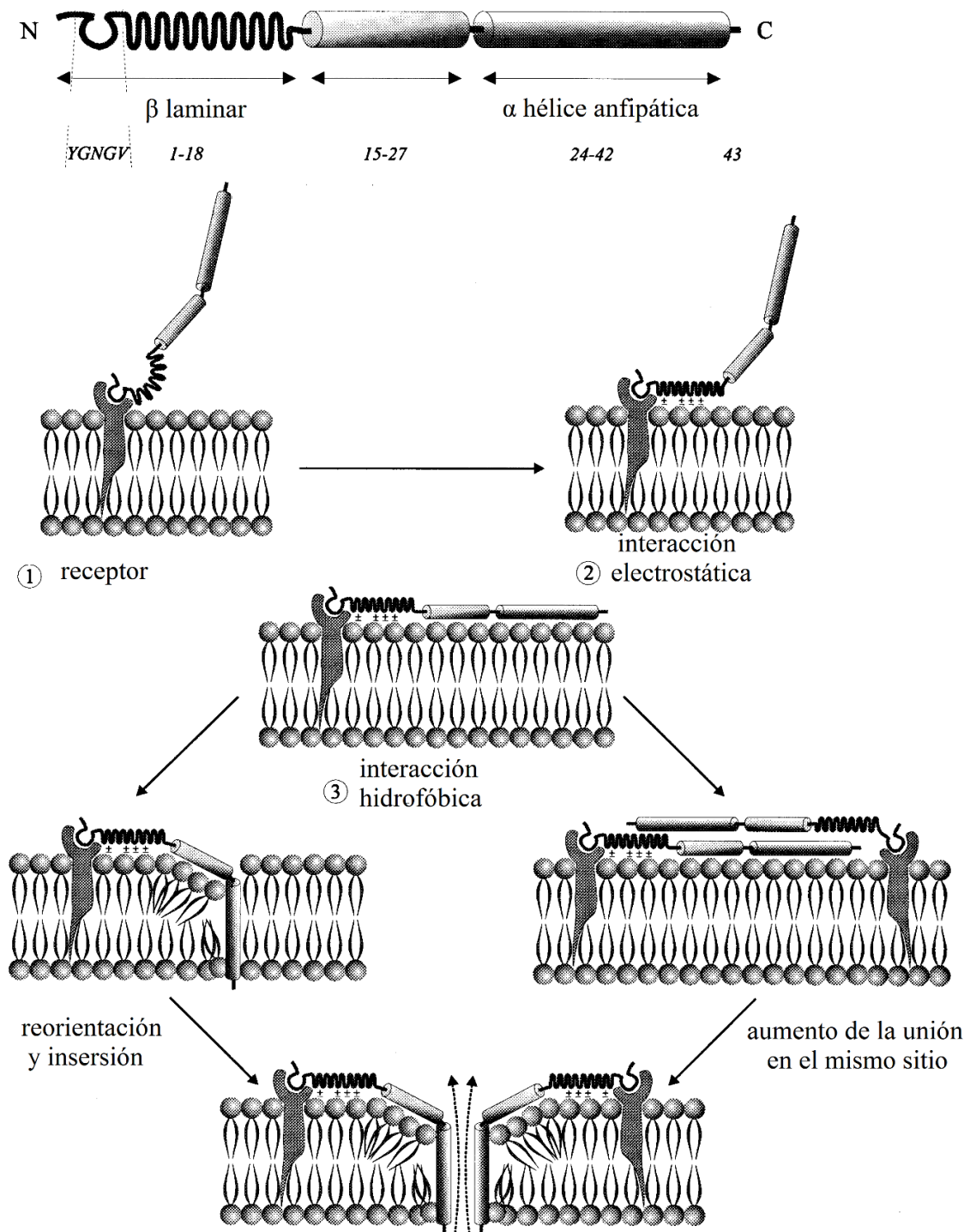


Figura 5. Mecanismo de acción de las enterocinas de la clase IIa (tomado de Ennahar y col., 2000)

3.3.5. Factores limitantes de las bacteriocinas

Los factores limitantes de la eficacia de las bacteriocinas en productos cárnicos son diversos el principal es su espectro de inhibición, que en muchos casos está restringido a cepas o especies muy relacionadas con la cepa productora, careciendo de efectividad frente a microorganismos patógenos o alterantes Gram-negativos. La composición química y las condiciones físicas del alimento influyen significativamente en la actividad de la bacteriocina, ya que su naturaleza proteica las hace susceptibles de interactuar con enzimas proteolíticas o con otras proteínas, los iones, solventes orgánicos; también pueden influir el calor, el pH, el tiempo y la temperatura de almacenamiento (González y Kunka, 1987; Bhunia y col., 1988; Degnan y col., 1993). Debido a su carácter generalmente hidrofóbico, las bacteriocinas pueden interactuar con la grasa de los productos cárnicos, lo que disminuye su eficacia. Se ha observado, por ejemplo, la reducción de la actividad de la nisina frente a *L. monocytogenes* a medida que aumenta la concentración de grasa (Jung y col., 1992).

3.4. Tecnologías en seguridad microbiológica

En el sistema moderno de la cadena alimentaria, es inconcebible una distribución de los alimentos sin empaque y embalaje. Tradicionalmente, el envasado de alimentos se ha limitado a la preservación y protección de los alimentos de factores ambientales, incluyendo factores químicos, físicos y biológicos, lo que retardaría el deterioro, extendería su vida útil y preservaría la calidad del alimento (Brody y col., 2008). Sin embargo, el empaquetado moderno debe servir no sólo como una herramienta eficaz para el mantenimiento de la calidad de los productos alimenticios, sino también para aumentar el valor del producto (Han, 2005), ya que para los consumidores los factores como precio, inocuidad, tamaño de los envases y reciclado son los más importantes (Duizer y col., 2009).

3.5. Tecnologías de barrera

La tecnología de barrera es la aplicación combinada de diferentes métodos de conservación para inhibir el crecimiento microbiano y conservar los alimentos. El principio básico de esta tecnología es el potencial de la barrera en los sistemas alimentarios, teniendo su sustento en estudios sobre la interacción que tienen los factores de crecimiento de los microorganismos en los alimentos (temperatura, pH, actividad de agua A_w , potencial redox Eh, microbiota competitiva y tiempo, entre otros). Estos factores influyen sobre la homeostasis, el

agotamiento metabólico y las reacciones de respuesta al estrés que sufren los microorganismos (Leistner, 2000). Dicha tecnología también está siendo aplicada para preservar productos cárnicos desde hace varios años.

3.5.1. Empaques biodegradables

Un recubrimiento biodegradable se puede definir como una matriz continua delgada que se estructura alrededor del alimento, generalmente mediante la inmersión del mismo en una solución formadora de recubrimiento (SFR) (Ramos y col., 2010). Dichas soluciones formadoras de recubrimiento pueden estar formadas por un polisacárido, proteínas, lípidos o una mezcla de los mismos (Gómez y col., 2010; Ramos y col., 2012). Un recubrimiento tiene la capacidad de trabajar sinérgicamente con otros materiales de embalaje, así como con antimicrobianos utilizados comúnmente en la industria cárnica.

La diferencia entre un recubrimiento y una película se encuentra en la forma de aplicación: en el recubrimiento el producto se sumerge en la SFR y la película es preformada formando una capa delgada, la cual se utiliza para envolver el producto cárnico (Falguera., 2011).

3.5.1.1. Aplicación de recubrimientos biodegradables

En la aplicación de recubrimientos a productos alimentarios altamente perecederos, como es el caso de los productos cárnicos, se han tomado en cuenta algunas características como costo, disponibilidad, atributos funcionales, propiedades mecánicas, propiedades ópticas (brillo y opacidad), su efecto barrera frente al flujo de gases, resistencia estructural al agua, a microorganismos y sus atributos sensoriales. Estas características son influenciadas por parámetros como el material empleado en la matriz estructural y las condiciones en las cuales se elabora el mismo (pH, concentración de componentes, temperatura, tipo y concentración de aditivos como antioxidantes, emulsificantes o antimicrobianos) (Oussalah y col., 2004; Zivanovic y col., 2005).

Las enterocinas A y B han permitido controlar eficazmente el crecimiento de *L. monocytogenes* en jamón cocido durante 8 días, una vez que fueron incorporadas en recubrimientos biodegradables (alginato, zeína y alcohol de polivinilo) en una concentración de 2000 AU/cm², con atmosfera modificada. Con el envasado al vacío se incrementó aún más la eficacia del recubrimiento, no mostrando ningún aumento de los niveles inoculados de *L. monocytogenes* durante 15 días a temperatura de refrigeración (Marcos y col., 2007)

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La aplicación de un recubrimiento antimicrobiano adicionado con bacteriocinas inhibirá la microbiota presente en productos cárnicos, asegurando la inocuidad del producto durante el almacenaje.

Objetivo general

Evaluar el efecto de un recubrimiento elaborado con proteína de suero de leche adicionado con bacteriocinas sobre la calidad de un producto cárnico durante su almacenaje

Objetivos particulares

- Obtener un extracto de las bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium* MXVK 29 y *Pediococcus acidilactici* MXVK 133.
- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de mezclas de diferentes concentraciones de bacteriocinas 29 y 133 incorporadas en recubrimientos elaborados con proteína de suero de leche.
- Evaluar la aplicación del recubrimiento a un producto cárnico previamente inoculado con microorganismos sensibles.
- Evaluar los cambios fisicoquímicos y microbiológicos durante el almacenaje.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Diagrama general de la metodología

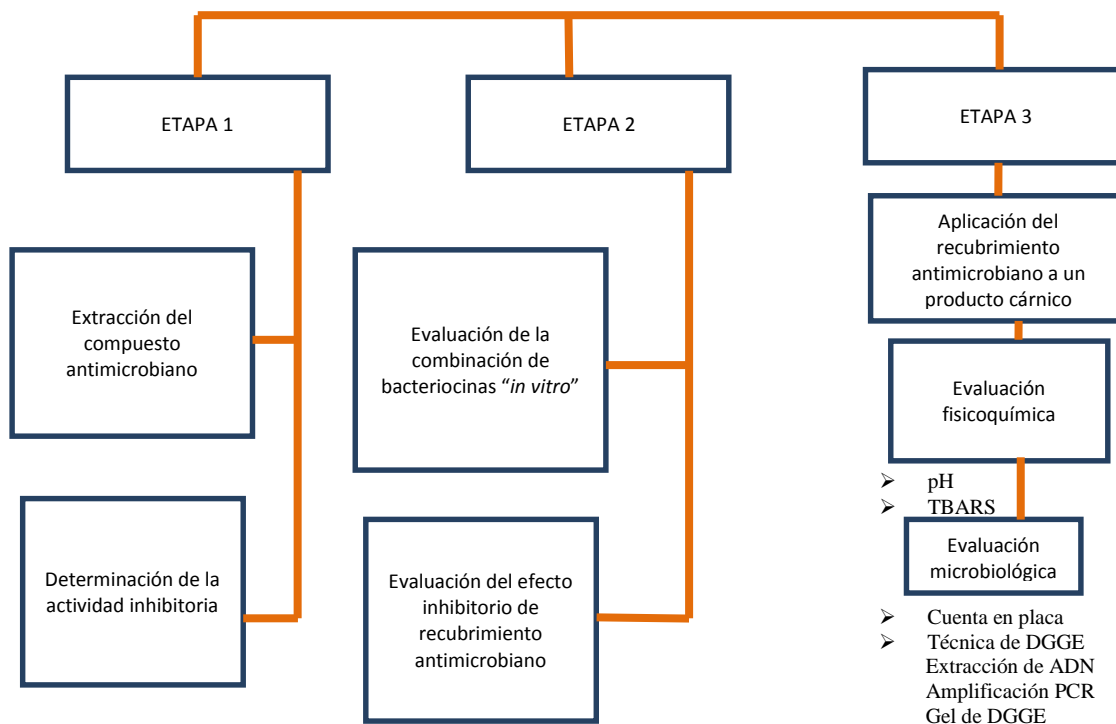


Figura 6. Diagrama general de la metodología

ETAPA 1

5.2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en el ensayo fueron *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Pediococcus acidilactici* MXVK133, aisladas de chorizo mexicano por el grupo de trabajo del Dr. M. Collins de la Queen's University of Belfast. Para el cultivo de ambas cepas se utilizó caldo glucosa caseína (CGB). Los microorganismos sensibles utilizados fueron *Weissella viridescens*, *Brochothrix thermosphacta* y *Listeria innocua*, los cuales fueron activados en caldo soya tripticaseína (TSB) durante 18 h a 37 °C. Posterior a esta etapa, el medio para el recuento de *Brochothrix thermosphacta* fue agar STAA, para *Weissella viridescens* fue agar APT y para *L. innocua* se utilizó agar selectivo para *Listeria* "PALCAM" (en el anexo 1 se muestran los detalles de los medios antes mencionados).

5.3. Extracción de las bacteriocinas

Para la obtención del extracto crudo de ambas cepas, se partió de un cultivo de 16 horas de *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Pediococcus acidilactici* MXVK133; posteriormente se sometió a un tratamiento térmico a 70 °C durante 30 minutos, para la inactivación de las proteasas que pudieran estar presentes en el medio (Katla y col., 2003). A continuación se realizó una centrifugación a $3100 \times g$ durante 20 minutos a 4 °C, el sobrenadante se ajustó a pH 6.5 y posteriormente se realizó una concentración en un rotavapor a una temperatura de 80 °C hasta obtener un 20% del volumen original, procediéndose a liofilizar. El liofilizado se almacenó a -80 °C hasta su uso.

5.4. Determinación de la actividad de las bacteriocinas

La actividad inhibitoria se evaluó por el método de difusión en placas de agar (Schillinger y Lücke, 1989), con modificaciones, utilizando *Listeria innocua* ATC33090 como cepa sensible. Para ello, se depositaron 30 µL de cada una de las diluciones seriadas base dos de bacteriocinas, en pozos hechos con una pipeta Pasteur estéril, en un medio TSB semisólido (con 0.8% de agar bacteriológico), previamente inoculado con 70 µL de un cultivo en fase logarítmica (10^6 - 10^7 UFC/mL, D.O 600nm = 0.3) de los microorganismos sensibles. Esta cobertera se dispuso sobre una capa de medio TSB sólido (con 1.5% de agar bacteriológico). Se incubó la placa a 37 °C durante 24 h. La actividad de las bacteriocinas se evaluó observando el halo de inhibición formado por la inhibición del desarrollo de la cepa sensible. La actividad inhibitoria se reportó en unidades arbitrarias por mililitro (UA/mL), la cual se define como el inverso de la máxima dilución (en base 2) en la cual se obtiene un halo de inhibición de 2 mm de diámetro dividido por el volumen de bacteriocina que se coloca en cada pozo, todo ello multiplicado por el factor de conversión $\left\{ \frac{UA}{mL} = \frac{I}{30\mu L} * \left(1000 \frac{\mu L}{1mL}\right) \right\}$ donde I es el inverso de la dilución (Bhunja y col., 1991; Chikindas y col., 2004).

5.4.1. Valoración de la estabilidad de las bacteriocinas por tratamiento con tripsina

La estabilidad de las bacteriocinas fue evaluada después del tratamiento con tripsina, de acuerdo a lo descrito por Cocolin y col. (2007). A 1 mL de bacteriocina (concentración de 1 g/mL), se le adicionó 1 mL de tripsina (concentración de 2.5 mg/mL), incubándose a 37 °C durante una hora. Posteriormente se realizó una prueba de actividad inhibitoria por el método de difusión en agar descrito en el inciso 5.4., tanto con las bacteriocinas tratadas con

tripsina como con las bacteriocinas sin tratamiento, con *L. innocua* ATC33090 como microorganismo sensible. Las pruebas se realizaron por duplicado.

ETAPA 2

5.5. Evaluación del efecto de la combinación enterocina-pediocina

Para evaluar el efecto de la combinación de bacteriocinas se utilizó un ensayo de tablero de ajedrez, como lo muestra la figura 7. Se ensayaron diferentes concentraciones de las bacteriocinas, tomando en cuenta la actividad inhibitoria que se obtuvo de la pediocina 133 y la enterocina 29, en el inciso 5.4. La combinación se realizó de la siguiente forma: se utilizaron 25 μ L de la enterocina 29 en TSB más 25 μ L de la pediocina 133 en TSB y 50 μ L de inóculo en TSB con una carga inicial de 10^5 UFC/mL de los microorganismos sensibles (*Listeria innocua*, *Brochothrix thermosphacta* y *Weissella viridescens*). La cinética se llevó a cabo en un lector de placas Synergy HT Biotek Instruments durante veinte horas a 35 °C, con mediciones cada hora a una longitud de onda de 600 nm.

P E D I O C I N A (μ L)	2000	2000	0	2000	250	2000	500	2000	1000	2000	2000
	1000	1000	0	1000	250	1000	500	1000	1000	1000	2000
	500	500	0	500	250	500	500	500	1000	500	2000
	250	250	0	250	250	250	500	250	1000	250	2000
	0	0	0	0	250	0	500	0	1000	0	2000
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0		250		500		1000		2000	
		ENTEROCINA (UA/mL)									

Figura 7. Arreglo de tablero de ajedrez de las combinaciones enterocina-pediocina

Los valores en absorbencias obtenidos para los 3 microorganismos en estudio (*Listeria innocua*, *Brochothrix thermosphacta* y *Weissella viridescens* y el cultivo control se representaron en gráfica con el software Microfit v 1.0, obteniéndose una curva para cada tratamiento (datos no mostrados) y los parámetros de crecimiento microbiano correspondientes: velocidad específica de crecimiento (μ_{max}), población inicial (N_0),

población máxima (N-max), tiempo de adaptación o fase lag (t-lag) y tiempo de duplicación (td). A estos valores se les realizó un análisis de varianza ANOVA, obteniéndose una diferencia significativa ($p < 0.001$) por efecto de tratamiento con respecto al control (Anexo B).

5.6. Materiales empleados para la elaboración de recubrimientos biodegradables

Para la producción de recubrimientos biodegradables se empleó un 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 utilizó glicerol (J. T. Baker Chemical Co., NJ., E.U.A).

5.7. Elaboración de las soluciones formadoras de recubrimientos

La elaboración de las soluciones formadoras de recubrimiento (SFR) se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Murillo (2008) y Ramos y col. (2012) con modificaciones. Se disolvieron 8.7 g de APSL en 100 mL de agua destilada junto con 3.7 g de glicerol como agente plastificante. La solución se mantuvo en agitación durante 20 minutos y posteriormente se ajustó el pH a 8.5 con (HCl 1.0 M o NaOH 2.0 M). Manteniendo la agitación, se continuó con un tratamiento térmico a 90 °C durante 30 minutos (Ko y col., 2001; Khwaldia y col., 2004; Cagri y col., 2001) para la desnaturalización de las proteínas e inducir la formación de la matriz. La SFR se enfrió en un recipiente con hielo y cuando alcanzó una temperatura de 40 °C se ajustó a pH 6.0. Se mantuvo en agitación hasta su uso.

5.8. Evaluación de la actividad antimicrobiana del recubrimiento

A las soluciones formadoras de recubrimiento (SFR) preparadas a partir de aislado de proteína de suero de leche (APSL) se les adicionaron en agitación las diferentes concentraciones de enterocina-pediocina (0, 250/2000, 500/2000, 1000/2000, 2000/2000 UA/mL) previamente disueltas en 500 µL de una solución de caldo TSB a pH 7.0 y se colocaron de manera homogénea 5 mL de SFR antimicrobiana sobre placas niveladas de vidrio, para formar películas de 10 x 3 cm, por duplicado. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente (23 °C) durante 12 horas para permitir el secado y la formación de las películas. La película control se preparó sin la adición de bacteriocinas, además se contempló un control adicional con nisina a una concentración de 2.5 mg/mL.

La determinación de la actividad antimicrobiana de las películas se realizó mediante el método de difusión en agar con algunas modificaciones. Para ello se colocaron secciones circulares de las películas de 6 mm de diámetro, obtenidas anteriormente con las diferentes combinaciones (previamente esterilizadas con rayos ultravioleta durante 30 minutos) en un medio TSB semisólido (con 0.8% de agar bacteriológico), el cual fue previamente inoculado con 70 μL de un cultivo en fase logarítmica 10^6 - 10^7 UFC/mL de la cepa sensible (D.O 600nm = 0.3). Esa cobertera se dispuso sobre una capa de agar TSB (1.5% de agar bacteriológico). La actividad antimicrobiana se evaluó observando el halo de inhibición formado para el desarrollo de la cepa sensible, una vez incubada la placa a 37 °C durante 24 h (Bhunias y col., 1991; Chikindas y col., 2004).

ETAPA 3

5.9. Elaboración del recubrimiento antimicrobiano

Los recubrimientos antimicrobianos fueron elaborados conforme al inciso 5.7, con adición de una solución cuya concentración es de 2000/2000 UA/mL enterocina-pediocina en una proporción 80:20 de APSL y mezcla de bacteriocinas, respectivamente etiquetándose como (E/P). Además se prepararon dos controles positivos, el primero con enterocina a una concentración de 2000 UA/mL se etiquetó como E, y el segundo se elaboró con una concentración de pediocina de 2000 UA/mL etiquetándose como P y por último se elaboró un recubrimiento control negativo sin bacteriocinas.

5.10. Preparación del inóculo

Los microorganismos sensibles *Weissella viridescens*, *Brochothrix thermosphacta* y *Listeria innocua* se activaron en caldo soya tripticaseína (TSB) durante 18 h a 37°C. Se sembraron por estría en agar selectivo (dependiendo del microorganismo sensible, anexo A. Las cajas se incubaron a 35°C durante 24 h; posteriormente se tomó y se sembró en caldo TSB a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica para *Weissella viridescens* $O.D.=0.65$, *Brochothrix thermosphacta* $O.D.=0.69$ y *Listeria innocua* $O.D.=0.66$ equivalente a una carga microbiana de 10^5 células (conforme a una curva patrón que se realizó con anterioridad para cada microorganismo sensible).

5.11. Aplicación del recubrimiento a un producto cárnico

Las muestras de salchichas tipo Viena de marca comercial, de aproximadamente 50 g, se inocularon por inmersión durante 5 minutos en una suspensión con una carga microbiana de 10^5 UFC/mL de los tres microorganismos sensibles. Una vez inoculadas las muestras de salchichas se mantuvieron secándose en una campana de flujo laminar durante 15 minutos. A continuación se les aplicó el recubrimiento antimicrobiano por inmersión y se mantuvieron en la campana de flujo laminar durante 60 minutos para asegurar el secado de los diferentes recubrimientos sobre la superficie de las salchichas. Se procedió a empacar al vacío y finalmente se almacenó a 4°C y después de 12 días, se elevó la temperatura a 10°C, para simular condiciones extremas de abuso de temperatura, y se tomaron muestras los días 1, 5, 12, 19, 26 y 40 (Marcos y col., 2013).

5.12. Medición de pH

La medición de pH se llevó a cabo en 10 g de la muestra de salchicha, con 100 mL de agua destilada. Posteriormente se homogenizó durante un minuto en licuadora y a continuación se filtró la suspensión de la carne a través de un embudo con una gasa. Después de estandarizar el potenciómetro Beckman modelo pH I Meter (U.S.A) se tomó la lectura por duplicado.

5.13. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

La rancidez se evaluó mediante el método de la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). En primer lugar se realizó la obtención del extracto de la muestra de salchicha, pesando 5 g de salchicha y homogenizándolos con 20 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5 % en un homogenizador IKA T18 basic OCTZA-TURRX ® ULTRA (Stufen, Alemania). Posteriormente se centrifugó a $3100 \times g$ durante 20 minutos a 4°C en una centrífuga 2810R Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania). El sobrenadante se filtró a través de papel Whatman del número cuatro, finalmente se aforó el volumen a 25 mL con TCA. El extracto se almacenó a -20 C hasta su uso. Se tomó una alícuota de un mL del extracto al cual se le adicionó un mL de ácido tiobarbitúrico (80 mM). Se preparó un blanco con TBA más TCA. Todos los tubos se colocaron en baño maría a 90 °C durante treinta minutos y después se enfriaron en un baño de hielo, para después medir la absorbencia a 530

nm en un lector de placas Synergy HT (Biotek Instruments). El resultado se reportó como mg de malonaldehído por kilogramo de producto.

5.14. Análisis microbiológico

5.14.1. Técnica de cuenta en placa

El análisis microbiológico se llevó a cabo por el método de cuenta en placa, de acuerdo a las Normas (NOM-092-SSA1-1994 Bienes y Servicios. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa y NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico). A 10 g de la muestra de salchicha se adicionaron a 90 mL de solución salina y se homogenizó en licuadora por un minuto, se hicieron diluciones sucesivas de 1:10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), las cuales se sembraron en placas de agar selectivo de acuerdo a cada microorganismo sensible. Las placas inoculadas se incubaron a 35°C durante 24, 48 y hasta 72 horas, dependiendo del microorganismo.

5.14.2. Técnica de DGGE

5.14.2.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN de las muestras de salchichas se realizó de acuerdo a lo descrito por Hu y col. (2009) y Lu y col. (2010) con modificaciones, 10 g de la muestra de salchicha con 25 mL de agua peptonada, se mantuvieron en agitación suave durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a $4,000 \times g$ a 4°C durante 10 minutos, del sobrenadante se tomó 1 mL, se centrifugó a $14,000 \times g$ durante 2 minutos, se realizó el mismo proceso cinco veces, hasta formar un pellet, que fue utilizado para llevar a cabo la extracción del ADN conforme el protocolo del Kit “Wizard Genomic DNA Purification Kit” para bacterias Gram positivas (ver anexo C), con las siguientes fases:

- a) Rotura – homogenización. Obtención de un lisado celular
- b) Purificación.

Separación del ADN

Precipitación proteica

- c) Concentración. Precipitación del ADN y rehidratación

Una vez que se completó la extracción, se mantuvo en refrigeración. Para poder verificar la presencia de ADN en las muestras y cuantificar el mismo, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (las moléculas de ADN, que tienen carga negativa, se separan de acuerdo con el tamaño cuando se someten a un campo eléctrico, migrando hacia el polo positivo (ver anexo C).

5.14.2.2. Cuantificación de ADN

Para realizar la cuantificación de ADN, primero se formó un blanco, con 100 μ L de agua purificada estéril, el cual se colocó en un Biofotometro Eppendorf® 6131, después se procedió a colocar la muestra la cual se preparó con 99 μ L de agua purificada estéril más 1 μ L de la muestra de ADN, se realizó lo mismo para todos los tratamientos y el control de los días 1, 19 y 40, se midió a 230, 260, 280 y 340 nm.

5.14.2.3. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), es una técnica que permite amplificar en ciclos consecutivos un fragmento de ADN cuya longitud está definida por la ubicación de los cebadores utilizados. En el presente proyecto se utilizaron cebadores que hibridan con el gen que codifica para el ARN 16S bacteriano. Cada ciclo consiste en tres etapas:

- a) Desnaturalización del ADN
- b) Hibridación de los cebadores
- c) Polimerización

La tabla 2 detalla las condiciones del termociclador que se utilizaron.

Tabla 2. Condiciones de amplificación por PCR

# de ciclos	Fase	Temperatura °C	tiempo
1	Desnaturalización	94	5 min
	Desnaturalización	94	1 min
30	Hibridación	53	1 min
	Polimerización	72	1 min
1	Polimerización	72	5 min

El objetivo del PCR es multiplicar el número de moléculas de ADN disponibles para eliminarlas secuencias que no interesan para el análisis. En la tabla 3 se muestran los cebadores utilizados.

Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificar el gen que codifica el ARN ribosomal 16S para DGGE

Primer	Secuencia
Forward ClampBAC-968-F	5'- <u>CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGAACG</u> CGAAGAACCTTAC-3'
Reverse BAC-1401-R	5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'

5.14.2.4. Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante

Por sus siglas en inglés, la DGGE es un método electroforético diseñado por Myers y col. (1987) y utilizado para identificar diferencias en la secuencia del ADN de doble cadena mediante la utilización de un gel con concentraciones crecientes de agentes desnaturizantes, las cuales tienen como componente desnaturizante la urea y la formamida que son compuestos polares que compiten en la formación de enlaces de hidrogeno con los grupos amino y carbonilo que se encuentran en las bases nitrogenadas, provocando la ruptura de los apareamientos y la parcial separación de las hebras (anexo C) Los fragmentos de ADN con igual longitud pero diferente secuencia tendrán diferente movilidad en dicho gel, debido a una desnaturización parcial de la doble cadena (de forma característica para secuencias diferentes). Esto da lugar a un patrón de bandas informativo de la diversidad genética presente en la comunidad microbiana. El número de bandas refleja el número de microorganismos predominantes en cada muestra; con una adecuada secuenciación y análisis filogenético se puede tener una perspectiva sobre la composición de dicha comunidad microbiana.

Antes de elaborar el gel se prepararon todas las soluciones (se almacenaron en oscuridad), El gradiente se formó con la ayuda de una bomba peristáltica a partir de las soluciones desnaturizantes, (40-60%) en condiciones estériles. La formación del gel se hizo a una velocidad de 4 mL/min, finalmente se colocó el peine y se dejó polimerizar durante 1 hora. Al mismo tiempo, se puso a calentar el buffer TAE 1 X a 65°C en el equipo, una vez polimerizado el gel, se colocó en el contenedor equipo, se inyectaron los productos de PCR en el gel.

5.14.2.4.1.1. Condiciones de DGGE

La corrida electroforética se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida formado por acrilamida-bisacrilamida al 40% en una relación [37.5:1], con un gradiente de desnaturalización de 40-60% formado por dos soluciones desnaturalizantes de 100% y 0 %. Dichas soluciones tienen como componentes desnaturalizantes urea y formamida. Inicialmente se llevó a cabo una pre-corrida a 200 V durante 10 minutos, seguida de una corrida a 85 V durante toda la noche o 16 horas (ver anexo C).

5.14.2.4.1.2. Tinción del gel de DGGE

El gel obtenido se tiñó con plata de acuerdo al método descrito por Sanguinetti y col. (1994) (ver anexo C), y se seleccionaron las bandas que se encontraban más aisladas y definidas en cada muestra, para su corte.

5.14.2.4.1.3. Elución de ADN por el método de difusión en agua

Se colocó cada banda con su respectiva etiqueta en un vial con 50 μ L de agua Milli Q estéril y se almacenó a 4°C durante 24 horas para permitir la elución del ADN al agua (Fontana y col., 2005; Hu, 2009)

5.14.2.4.1.4. PCR

Se procedió a la amplificación del ADN eluido de las bandas seleccionadas, con los mismos cebadores o primers que codifican el ADN ribosomal 16S, y en las mismas condiciones que en el inciso 5.12.2.2. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1%, a 80 V durante 60 minutos, para corroborar la amplificación y el peso molecular.

5.14.2.4.1.5. Purificación

La purificación de las bandas se llevó a cabo según el el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega), de acuerdo a las especificaciones del manual. El volumen purificado de ADN de cada banda fue de 50 μ L, 3 μ L de cada muestra se usaron para correr un nuevo gel de agarosa al 0.8 %, a 80 V durante 60 minutos, con el objeto de corroborar el peso molecular y la pureza del ADN.

5.14.2.5. Secuenciación

Las muestras se secuenciaron en el Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, con un secuenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer de 16 capilares.

5.15. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por duplicado, además se realizó una réplica de cada experimento. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza ANOVA. Se utilizó un diseño factorial de 2 x 7, siendo los factores muestra (con los diferentes tratamientos) y días de almacenamiento (1, 5, 12, 19, 26 y 40). A las variables que presentaron diferencias estadísticamente significativas se analizaron con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-b; el nivel de significancia establecida fue de $p < 0.05$. Se empleó el programa estadístico SPSS para Windows (SPSS 18 Inc., Chicago, Illinois, E.U.A.)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Confirmación de la pureza de las cepas

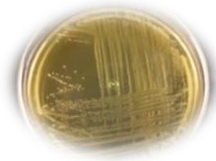
La cepa *Enterococcus faecium* MXVK 29 se sembró por estría en agar selectivo KF, las colonias presentan un color rojo oscuro, como se muestra en la figura 8. Adicionalmente, la cepa se sembró en agar nutritivo, para verificar que no estuviera contaminada. En este medio, la cepa presentó una morfología de colonias redondas, y pequeñas, color crema y con crecimiento uniforme. Al observar al microscopio se observan cocos Gram positivos que se agrupan en parejas o cadenas cortas (Difco, 1998)



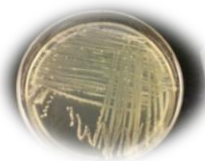
Figura 8. Características de la cepa *Enterococcus faecium* MXVK 29

Se sembró la cepa *Pediococcus acidilactici* MXVK133 en un medio formado por 50% de MRS y 50% de agar Mueller Hinton para el desarrollo y crecimiento de *Pediococcus* (Difco, 1998), microorganismo que depende de la presencia de un carbohidrato fermentable. Si bien la glucosa y la mayoría de los monosacáridos son fermentables, la capacidad de utilizar las pentosas se limita a *Pediococcus* (London y Chace, 1976). También se sembró en agar nutritivo, presentando una morfología uniforme. El género *Pediococcus* está formado por cocos Gram-positivos (la figura 9), son bacterias esféricas que forman tétradas, es rara la existencia de células aisladas y no forman cadenas ni esporas.

MRS y Muller Hilton



Agar Nutritivo



Gram positivo

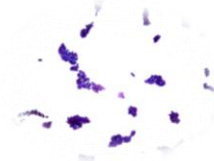


Figura 9. Características de la cepa *Pediococcus acidilactici* MXVK 133

La cepa *Listeria innocua* ATC33090 se sembró en agar selectivo PALCAM en el cual se logra selectividad en el medio mediante el suplemento de cloruro de litio, sulfato de polimixina B, acriflavina-HCl y ceftazidima, que suprime el crecimiento de la mayoría de los organismos diferentes de las especies de *Listeria* presentes en alimentos. La diferenciación en el medio PALCAM se basa en la hidrólisis de esculina y la fermentación del manitol. Todas las especies de *Listeria* hidrolizan la esculina. El producto de la hidrólisis, la esculetina (6,7-dihidroxicumarina), reacciona con iones férricos hasta producir un complejo de marrón a negro, como se muestra la figura 10. El manitol, el indicador de pH, y el rojo fenol, se han añadido para diferenciar las cepas fermentadoras de manitol de las especies de *Listeria*. La fermentación de manitol se muestra por un cambio de color del medio de rojo a amarillo debido a la producción de ácidos (Difco, 1998). En agar nutritivo aparecieron colonias muy pequeñas de color blanco, lisas y con crecimiento uniforme. Se observaron al microscopio bacilos Gram positivos.

Agar PALCAM



Agar nutritivo



Gram positivos



Figura 10. Características de la cepa *Listeria innocua* ATC33090

6.2. Actividad inhibitoria de las bacteriocinas

6.2.1. Determinación de la actividad inhibitoria de la pediocina 133

En la figura 11 se muestran los halos de inhibición obtenidos en las diferentes etapas de la concentración del extracto crudo de la pediocina 133. El primer paso corresponde al ajuste de pH a 6.5 del sobrenadante, observándose una actividad de 311 UA/mL. La segunda etapa corresponde a la concentración en rotavapor, obteniéndose el 20 % del volumen original y observándose una actividad de 800 UA/mL. Posteriormente, se liofilizó el concentrado y se realizó una solución del extracto liofilizado (concentración 1 g/mL), presentando una actividad inhibitoria de 1956 UA/mL.

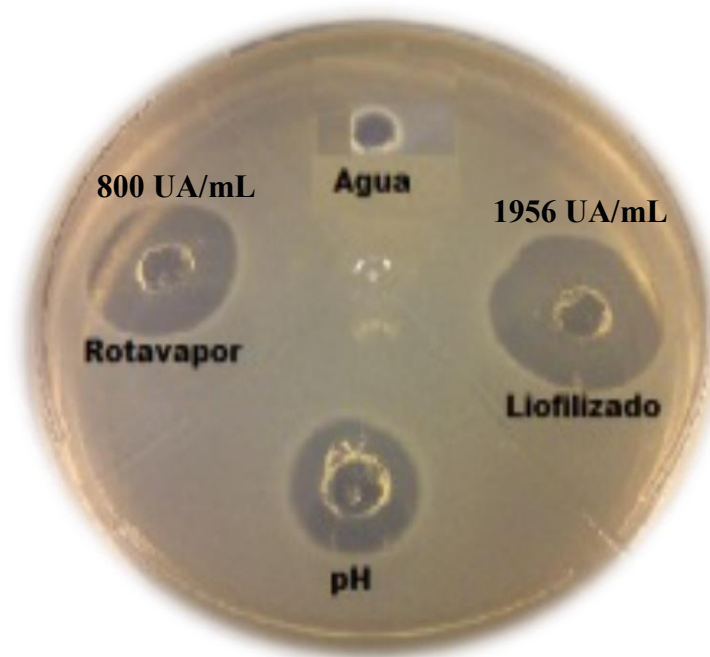


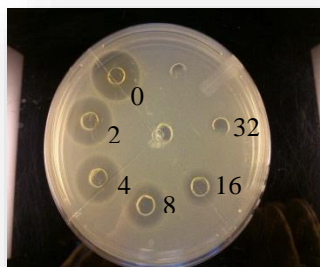
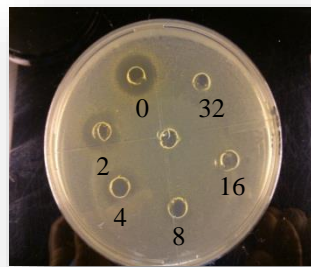
Figura 11. Determinación de la actividad inhibitoria de la pediocina 133 producida por *Pediococcus acidilactici* MXVK 133.

La tabla 4 muestra la determinación de la actividad de la pediocina 133 en las diferentes etapas de concentración, con su respectivo porcentaje de concentración. La actividad aumentó proporcionalmente durante el proceso de concentración y secado.

Tabla 4 Determinación de la actividad de la pediocina 133 en las etapas de concentración

Etapas de concentración	Actividad inhibitoria UA/mL	Porcentaje de concentración (%)
Después de ajustar pH	311 ± 148	100
Concentración por rotavapor	800 ± 266	257
Liofilizado	1956 ± 0	629

Se procedió a probar la actividad inhibitoria de la pediocina 133 del extracto liofilizado frente a los microorganismos sensibles; *Brochothrix thermosphacta* y *Weissella viridescens*. Dichas pruebas se hicieron por triplicado, haciendo un duplicado en cada determinación. En la figura 12 se aprecian los halos obtenidos para cada microorganismo, a los cuales se les midió el diámetro en mm y se determinó la actividad (UA/mL).

Brochothrix thermosphacta*Weissella viridescens***Figura 12. Efecto inhibitorio de la pediocina 133**

En la figura 13 se observa el efecto inhibitorio de la pediocina 133 contra los microorganismos sensibles *Listeria innocua*, *B. thermosphacta* y *W. viridescens*. En el eje de las (x) se representó la actividad de la pediocina 133 en UA/mL, en el eje de las (y) se dispusieron los diámetros de los halos de inhibición (en mm) obtenidos en cada prueba de actividad y para cada microorganismo sensible. Se observa que la pediocina 133 mostró mayor efecto inhibitorio frente a *Listeria innocua*, mientras que en el caso de *B.*

thermosphacta fue menor. *W. viridescens* fue el microorganismo que mostró más resistencia a la pediocina.

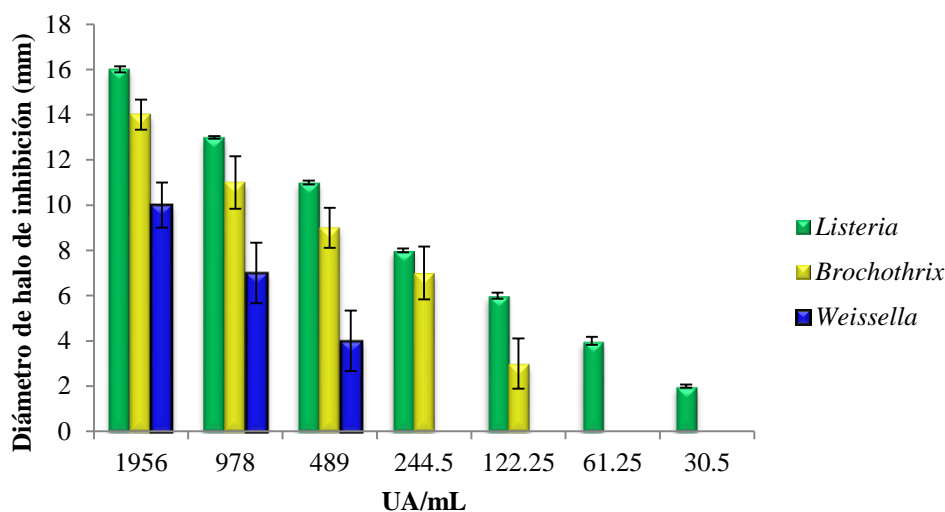


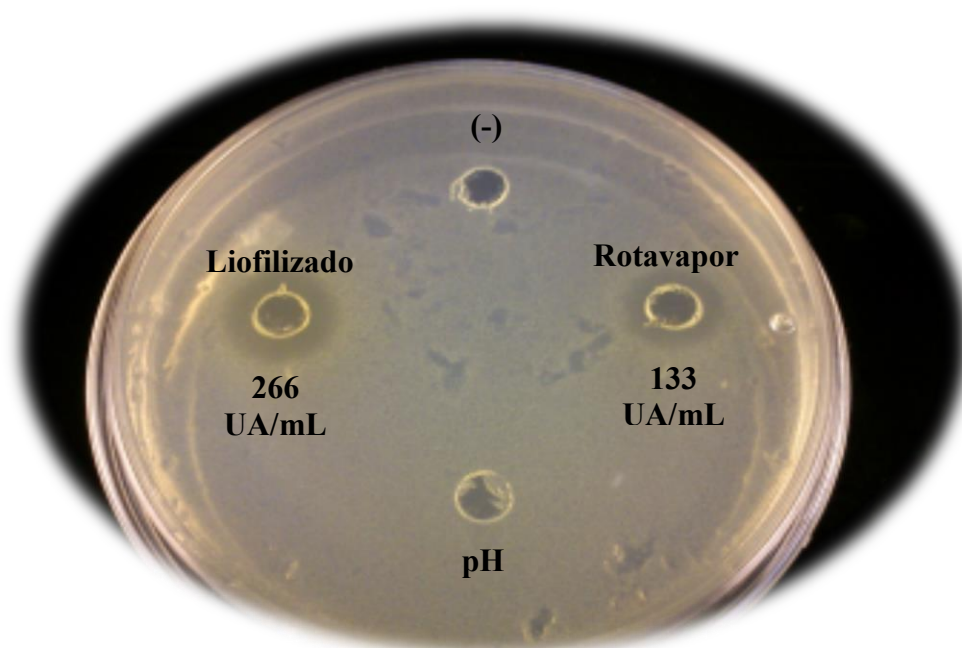
Figura 13. Efecto inhibitorio de la pediocina 133

6.2.2. Determinación de la actividad inhibitoria de la enterocina 29

La tabla 5 muestra la determinación de la actividad inhibitoria de la enterocina 29 en las diferentes etapas de concentración, con su respectivo porcentaje de concentración. Se puede apreciar que la actividad aumentó proporcionalmente durante el proceso de concentración y secado. En este caso, aunque se llevaron a cabo pruebas de actividad correspondientes a la primera fase de extracción, “después de ajustar el pH a 6.5”, no se logró observar halos de inhibición en esa etapa. Tras concentrar en el rotavapor hasta obtener el 20 % del volumen original sí se encontraron halos de inhibición, con una actividad inhibitoria estimada de 133 UA/mL (figura 14). A continuación se liofilizó el extracto crudo concentrado, el polvo obtenido se pesó y se realizó una solución a una concentración de 1.5 g/mL, muestra que presentó una actividad inhibitoria de 266 UA/mL. En la figura 14 se observan los halos de inhibición en cada etapa de extracción con su respectiva actividad inhibitoria, además de un control negativo. La enterocina 29 mostró tener menor actividad inhibitoria contra el microorganismo sensible *Listeria innocua* ATCC 33090 que la pediocina 133.

Tabla 5. Determinación de la estabilidad de la enterocina 29 en las etapas de extracción

Etapas de extracción	Actividad inhibitoria	Porcentaje de concentración
	UA/mL	(%)
Concentración por rotavapor	133 ±0	100
Liofilizado	266 ±0	200

Figura 14 Determinación de actividad de la enterocina 29 producida por *Enterococcus faecium* MXVK 29

Así como se evaluó la actividad de la pediocina 133, con los demás microorganismos sensibles *W. viridescens* y *B. thermosphacta*, se procedió de la misma forma para la enterocina 29 (las pruebas se hicieron por triplicado y cada una tuvo un duplicado). Los resultados se muestran en la figura 15, pudiéndose apreciar en las imágenes que *B. thermosphacta* mostró una sensibilidad similar a la obtenida por *L. innocua*. No pasó lo mismo con *W. viridescens*, ya que mostró mayor sensibilidad en comparación con los otros dos microorganismos sensibles.

Brochothrix thermosphacta *Weissella viridescens*



Figura 15 Efecto inhibitorio de la enteriocina 29

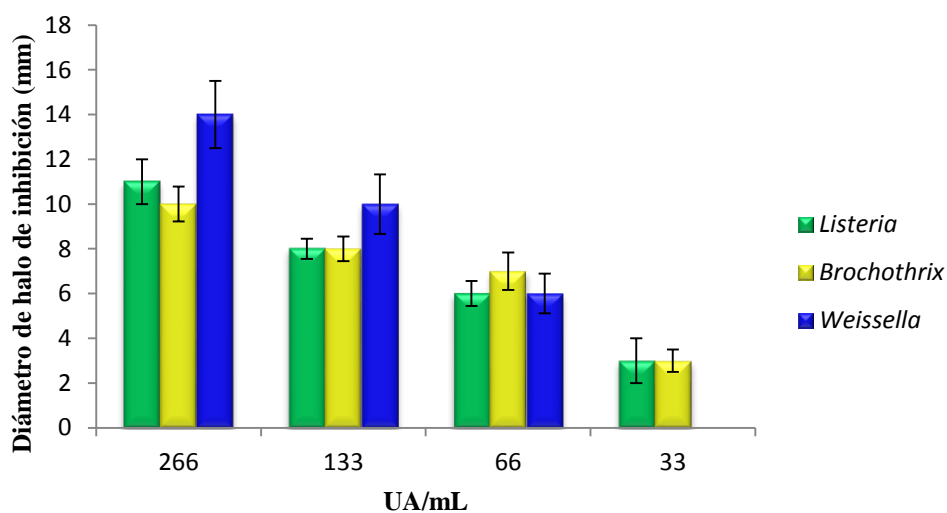


Figura 16 Efecto inhibitorio de la enteriocina 29

6.2.3. Determinación de la estabilidad de las bacteriocinas por tratamiento con tripsina

Se evaluó la estabilidad de las bacteriocinas mediante un tratamiento con tripsina, para verificar que la actividad era debida a péptidos: la tripsina (como otras proteasas, p. ej. la proteinasa K) hidrolizan proteínas y péptidos (Cocolin y col., 2007). En la figura 17, se muestran los resultados de la prueba de actividad sin tratamiento para las dos bacteriocinas

observándose los halos de inhibición mientras que con el tratamiento con tripsina se perdió la actividad inhibitoria. Estos resultados corroboran el carácter peptídico de las dos bacteriocinas utilizadas.

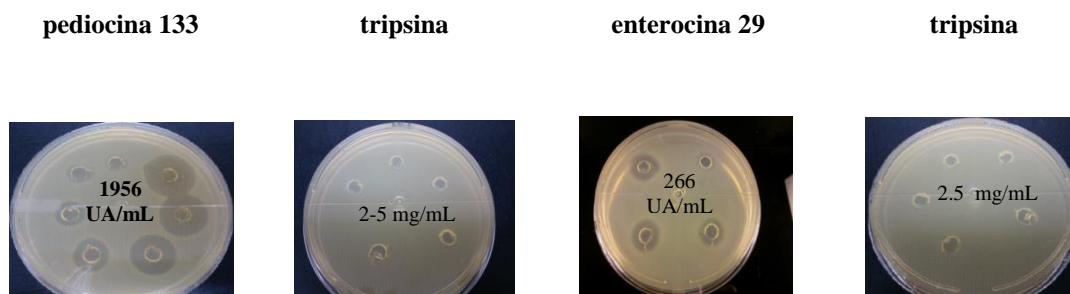


Figura 17. Estabilidad de bacteriocinas tratadas con tripsina

6.3. Efecto de la combinación *in vitro* de las combinaciones de pediocina-enterocina contra microorganismos sensibles.

6.3.1. *Listeria innocua*

La evaluación del efecto de la combinación *in vitro* de las bacteriocinas se llevó a cabo mediante un ensayo de tablero de ajedrez, como se describió en el inciso 5.5. En una cinética de 20 horas se demostró que hubo una disminución significativa ($p < 0.001$) de *L. innocua* con respecto al control (Anexo B). En la figura 18 se muestra la comparación de medias de los valores promedio de absorbencias ($OD_{600\text{ nm}}$) para el crecimiento de *Listeria innocua* en todos los tratamientos y el control (sin antimicrobianos). Se observa una disminución significativa en todas las combinaciones, inclusive en los vales obtenidos utilizando las bacteriocinas individuales. Se aprecia que conforme fue aumentando la concentración aumentó ligeramente la inhibición del microorganismo sensible, en todas las demás combinaciones la inhibición es similar, excepto en las combinaciones de enterocina 29 (250-2000) -pediocina 133 (2000) en las que se aprecia un ligero aumento de resistencia de *L. innocua*, la concentración de la bacteria aumentó conforme se incrementó la concentración de la enterocina 29 (250-2000).

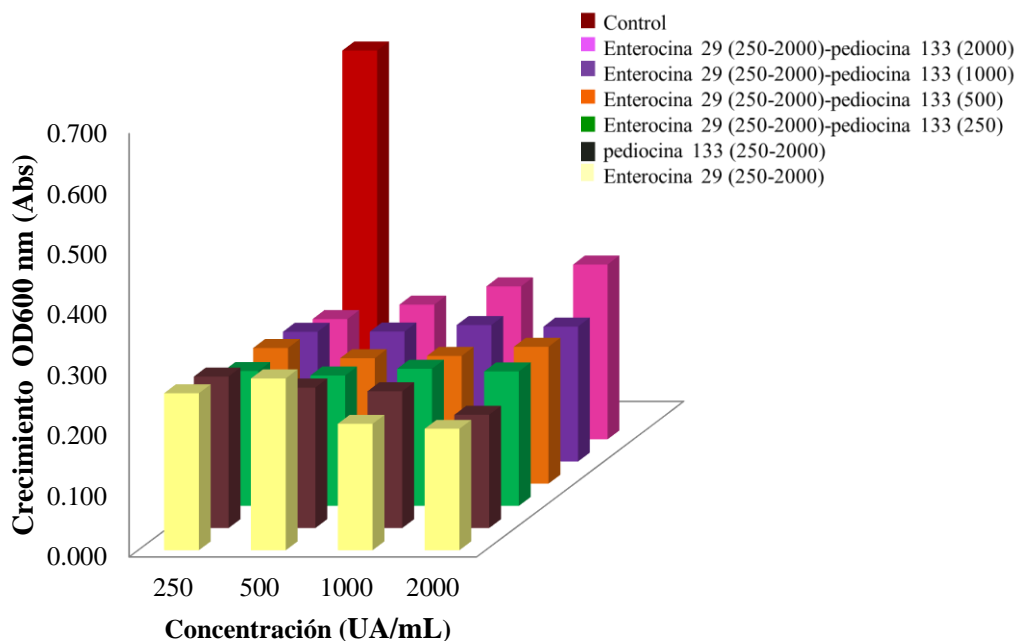


Figura 18. Comparación de medias de valores promedio de cultivos de *Listeria innocua* tratados con las combinaciones del arreglo de ajedrez enterocina 29-pediocina 133 *in vitro*

En la tabla 6 se muestran los parámetros de las curvas crecimiento microbiano de *Listeria innocua* con las bacteriocinas individuales: enterocina 29 (250-2000), pediocina 133 (250-2000) y el control. Se observa una disminución de los valores de la velocidad máxima en todas las concentraciones de bacteriocinas probadas, así como un aumento en el tiempo de adaptación y el tiempo de duplicación con respecto al control, lo cual muestra que hubo efecto en la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Listeria innocua*.

Tabla 6. Parámetros de las curvas de crecimiento de *Listeria innocua* con enterocina 29 (250-2000 UA/mL) y pediocina 133 (250-2000 UA/mL)

Parámetros crecimiento	Control	E ₂₅₀	E ₅₀₀	E ₁₀₀₀	E ₂₀₀₀	P ₂₅₀	P ₅₀₀	P ₁₀₀₀	P ₂₀₀₀
N ₀	0,12	0,14	0,18	0,16	0,20	0,13	0,125	0,15	0,2
N _{max}	0,78	0,83	5,02	0,56	2,08	6,07	0,78	0,58	0,14
μ _{max} (h ⁻¹)	1,29	0,57	0,31	0,62	0,04	0,23	0,31	0,37	0
t-lag(h)	4,60	15,75	17,19	17,63	34,31	17,56	15,81	15,53	0,38
t-d(h)	0,54	1,23	2,33	1,13	22,30	3,09	2,25	1,88	466,52

(E) enterocina, (P) pediocina, (No) población inicial, (N-max) población máxima, (μ_{max}) velocidad específica de crecimiento, (t-lag) tiempo de adaptación o fase lag, (td) tiempo de duplicación.

La tabla 7 muestra los parámetros de las curvas de crecimiento microbiano de *L. innocua* con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000)/pediocina 133 (250) y enterocina 29 (250-2000)/pediocina 133 (500) y el control. De igual forma, se aprecia una disminución significativa en la velocidad máxima en todas las combinaciones así mismo se observa un efecto de tratamiento por el aumento en el tiempo de adaptación de la célula bacteriana y el tiempo de duplicación con respecto al control.

Tabla 7. Parámetros de las curvas de crecimiento de *Listeria innocua* con las combinaciones enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (250 UA/mL) y enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (500 UA/mL)

Parámetros crecimiento	Control	E-P 250/250	E-P 500/250	E-P 1000/250	E-P 2000/250	E-P 250/500	E-P 500/500	E-P 1000/500	E-P 2000/500
N ₀	0,12	0,14	0,16	0,19	0,22	0,14	0,16	0,17	0,22
N _{max}	0,78	0,73	0,53	0,49	2,10	0,57	0,46	0,44	0,25
μ _{max} (h ⁻¹)	1,29	0,40	0,32	0,46	0,00	0,36	0,35	0,35	0,04
t-lag(h)	4,60	16,80	16,92	17,44	13,88	15,62	16,54	16,89	0,82
t-d(h)	0,54	1,74	2,19	1,51	294,79	1,97	2,03	2,06	19,52

(E) enterocina, (P) pediocina, (No) población inicial, (N-max) población máxima, (μ_{max}) velocidad específica de crecimiento, (t-lag) tiempo de adaptación o fase lag, (td) tiempo de duplicación.

La tabla 8 muestra los parámetros de las curvas de crecimiento microbiano de *L. innocua* con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000)/pediocina 133 (1000) y enterocina 29 (250-2000)/pediocina 133 (2000) y el control. Como en las combinaciones anteriores, la velocidad máxima presentó una disminución en todos los casos, y el tiempo de adaptación y el de duplicación presentaron también un aumento.

Tabla 8. Parámetros de las curvas de crecimiento de *Listeria innocua* con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (1000 UA/mL) y enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (2000 UA/mL)

Parámetros	Control	E-P	E-P	E-P	E-P	E-P	E-P	E-P	E-P
velocidad		250/1000	500/1000	1000/1000	2000/1000	250/2000	500/2000	1000/2000	2000/2000
N_0	0,12	0,15	0,18	0,21	0,22	0,19	0,22	0,24	0,27
N_{max}	0,78	0,52	0,46	0,39	0,26	3,58	0,25	0,29	0,35
$\mu_{max}(h^{-1})$	1,29	0,37	0,50	0,88	0,04	0,70	0,06	0,04	0,04
t-lag(h)	4,60	16,32	17,76	18,55	1,17	21,16	0,66	0,92	1,68
t-d(h)	0,54	1,90	1,40	0,81	17,73	0,99	11,94	18,44	18,45

(E) enterocina, (P) pediocina, (No) población inicial, (N-max) población máxima, (μ_{max}) velocidad específica de crecimiento, (t-lag) tiempo de adaptación o fase lag, (td) tiempo de duplicación.

Debido a que hubo una inhibición significativa de *L. innocua* en todos los tratamientos, se seleccionaron las combinaciones en las cuales el microorganismo mostró mayor sensibilidad, tomando como prioritario el parámetro de crecimiento de velocidad máxima obtenido. Con el objetivo de analizar el comportamiento inhibitorio de las bacteriocinas individuales y en combinación se calculó el área fraccional (*fa*), la cual se define como la relación del crecimiento del cultivo con inhibidor entre el crecimiento sin inhibidor; su valor varía entre 0 y 1, y un valor cercano a cero representa una total inhibición.

La figura 19 muestra el área fraccional (*fa*) de las combinaciones de enterocina 29 (250 a 2000 UA/mL) y pediocina 133 (2000 UA/mL) contra *L. innocua*. Se observa un efecto antagonista de la combinación de enterocina-pediocina E 250 – P 2000, ya que se observa que el valor de *fa* fue mayor al que se obtuvo para las bacteriocinas sin combinar. Por otra parte, las combinaciones E 500 – P 2000 y E 1000 – P 2000 presentaron efecto sinérgico, con un valor de *fa* de 0.04 y 0.03, respectivamente. Para la combinación E 2000 – P 2000 el efecto fue aditivo, debido a que se obtuvo el mismo efecto inhibitorio en combinación y sin combinar. Esto concuerda con estudios anteriores realizados con *L. innocua*, donde se menciona que se crea resistencia en presencia de altas concentraciones de bacteriocinas (Harris y col., 1991; Ming y Daeschel., 1993; Rasch y Knochel., 1998).

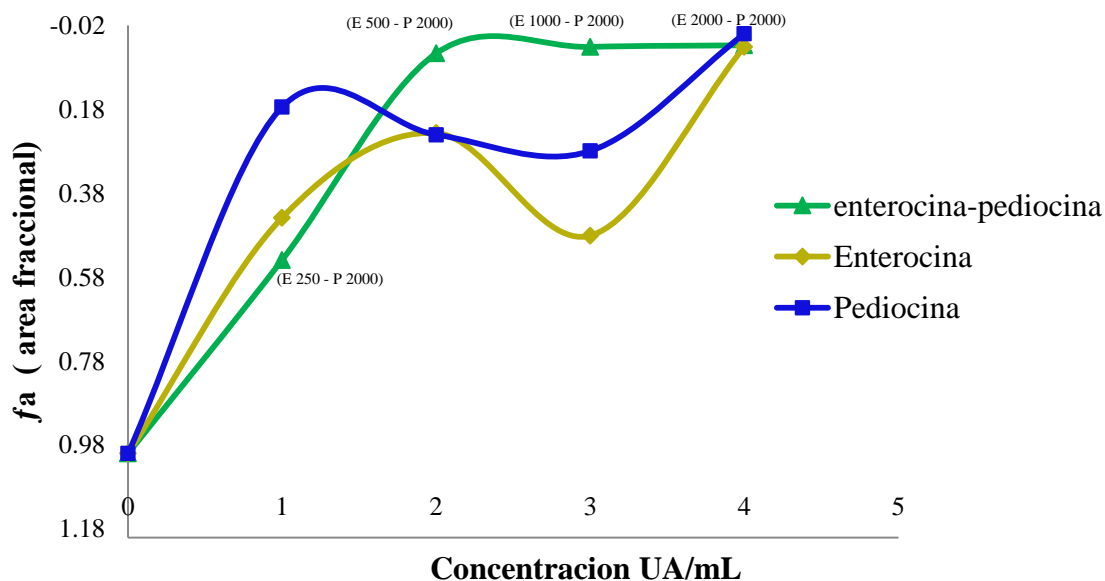


Figura 19. Efecto inhibitorio de las combinaciones enterocina 29-pediocina 133 (250-2000 UA/mL)/ (2000 UA/mL); enterocina 29 (250-2000 UA/mL) y pediocina 133 (250-2000 UA/mL) sobre el crecimiento *in vitro* de *Listeria innocua in vitro*

6.3.2. *Brochothrix thermosphacta*

La evaluación del efecto de la combinación *in vitro* de las bacteriocinas se llevó a cabo mediante un ensayo de tablero de ajedrez como se describe en el inciso 5.5, etapa 2. En una cinética de 20 horas *Brochothrix thermosphacta* presentó una diferencia significativa ($p < 0.001$) del desarrollo del microorganismo sensible con respecto al control. En la figura 20 se muestra la comparación de medias de los valores promedio de crecimiento (absorbencias $_{600\text{ nm}}$) de todos los tratamientos de *Brochothrix thermosphacta* y el control (sin tratamiento). En la primer serie de columnas, con las diferentes concentraciones de enterocina 29 sin combinar (250-2000 UA/mL) se observa una disminución significativa del crecimiento, excepto para la concentración de 250 UA/mL, la siguiente serie de representan a las diferentes concentraciones de pediocina 133 (250-2000 UA/mL) sin combinar, apreciándose una disminución significativa con respecto al control, con un pequeño aumento en la sensibilidad del microorganismo en la concentraciones intermedias. En las siguientes de las diversas combinaciones, se observa un efecto significativo de los tratamientos con respecto al control, detectándose un aumento en la sensibilidad del microorganismo en las

concentraciones más bajas de estas combinaciones. En las columnas de las combinaciones de enterocina 29 (250-2000)-pediocina 133 (2000) (color rosa), se aprecia un ligero aumento en la resistencia de *Brochothrix thermosphacta* conforme se incrementó la concentración de la enterocina 29 (250-2000). Como en el caso anterior, estas combinaciones posteriormente se analizarán más a fondo, con el objetivo de poder tener una visión del comportamiento inhibitorio de las bacteriocinas.

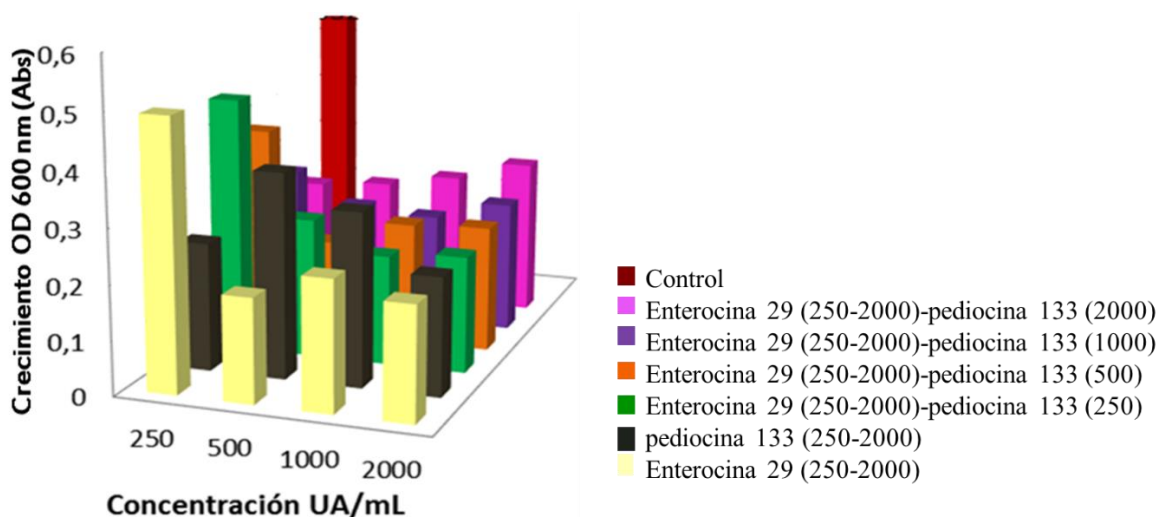


Figura 20. Comparación de medias de valores promedio de cultivos *in vitro* de *Brochothrix thermosphacta* con las combinaciones del arreglo de ajedrez enterocina 29 – pediocina 133 *in vitro*

En la tabla 9 se muestran los parámetros de las curvas crecimiento microbiano de *B. thermosphacta* con las bacteriocinas individuales: enterocina 29 (250-2000), pediocina 133 (250-2000) y el control. Se observa una disminución de los valores de la velocidad máxima en todas las concentraciones de bacteriocinas aplicadas, excepto para enterocina 29 (250), así como un aumento en el tiempo de adaptación el cual aumentó proporcionalmente con la concentración de las bacteriocinas, excepto para enterocina 29 (500), con respecto al control, lo cual muestra que hubo efecto significativo en la inhibición del crecimiento *in vitro* de *B. thermosphacta*.

Tabla 9. Parámetros de las curvas de crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* tratadas con enterocina 29 (250-2000 UA/mL) y pediocina 133 (250-2000 UA/mL)

Parámetros crecimiento	Control	E ₂₅₀	E ₅₀₀	E ₁₀₀₀	E ₂₀₀₀	P ₂₅₀	P ₅₀₀	P ₁₀₀₀	P ₂₀₀₀
N ₀	0,12	0,13	0,18	0,18	0,20	0,16	0,14	0,15	0,21
N _{max}	0,65	0,80	0,25	3,20	2,57	3,70	0,77	0,75	34,00
μ _{max} (h ⁻¹)	0,95	0,44	0,04	0,26	0,22	0,14	0,50	0,37	0,30
t-lag(h)	3,46	5,09	2,15	19,71	22,87	20,69	10,72	12,49	22,36
t-d(h)	0,75	1,59	20,84	2,87	3,51	7,57	1,43	1,90	2,33

(E) enterocina, (P) pediocina, (N₀) población inicial, (N_{max}) población máxima, (μ_{max}) velocidad específica de crecimiento, (t-lag) tiempo de adaptación o fase lag, (td) tiempo de duplicación.

La tabla 10 muestra los parámetros de las curvas de crecimiento microbiano de *B. thermosphacta* con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000)/pediocina 133 (250) y enterocina 29 (250-2000)/pediocina 133 (500) y el control. De igual forma, se aprecia una disminución significativa en la velocidad máxima. El tiempo de adaptación presentó un aumento significativo en todas las combinaciones con respecto al control, excepto en la combinación enterocina 29 (2000)/pediocina 133 (500), que presentó un valor menor al control.

Tabla 10. Parámetros de las curvas de crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* con las combinaciones enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (250 UA/mL) y enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (500 UA/mL)

Parámetros crecimiento	Control	E-P 250/250	E-P 500/250	E-P 1000/250	E-P 2000/250	E-P 250/500	E-P 500/500	E-P 1000/500	E-P 2000/500

N_0	0,12	0,13	0,15	0,18	0,20	0,14	0,16	0,18	0,23
N_{max}	0,65	0,92	0,65	0,25	0,26	0,83	0,38	0,57	0,27
$\mu_{max}(h^{-1})$	0,95	0,52	0,36	0,23	0,25	0,35	0,53	0,24	0,03
t-lag(h)	3,46	9,17	15,03	12,17	15,33	11,13	12,37	15,92	2,10
t-d(h)	0,75	1,34	1,99	3,21	2,90	2,16	1,36	3,16	26,69

(E) enterocina, (P) pediocina, (No) población inicial, (N-max) población máxima, (μ_{max}) velocidad específica de crecimiento, (t-lag) tiempo de adaptación o fase lag, (td) tiempo de duplicación.

La tabla 11 muestra los parámetros de las curvas de crecimiento microbiano de *B. thermosphacta* con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000) /pediocina 133 (1000) y enterocina 29 (250-2000) /pediocina 133 (2000) y el control. Se observa que la velocidad máxima presentó valores menores al control en todas las combinaciones, mientras que en el caso del tiempo de adaptación, los valores aumentaron en todas las combinaciones excepto en tres de ellas: enterocina 29 (2000)/pediocina 133 (1000); enterocina 29 (1000)/pediocina 133 (2000) y enterocina 29 (2000)/pediocina 133 (2000), para las cuales se obtuvieron valores más bajos que para el control.

Tabla 11. Parámetros de las curvas de crecimiento de *Brochothrix thermosphacta* con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (1000 UA/mL) y enterocina 29 (250-2000)/pediocina 133 (2000 UA/mL)

Parámetros	Control	E-P		E-P		E-P		E-P	
		250/1000	500/1000	1000/1000	2000/1000	250/2000	500/2000	1000/2000	2000/2000
velocidad									
N_0	0,12	0,16	0,20	0,19	0,24	0,21	0,22	0,24	0,27
N_{max}	0,78	0,65	0,30	0,61	0,30	13,15	10,17	4,58	0,36
$\mu_{max}(h^{-1})$	1,29	0,34	0,20	0,28	0,33	0,09	0,19	0,02	0,05
t-lag(h)	4,60	14,74	17,25	17,20	2,59	48,28	30,41	0,93	4,33
t-d(h)	0,54	2,07	3,63	2,51	27,54	8,00	3,78	107,21	15,62

(E) enterocina, (P) pediocina, (No) población inicial, (N-max) población máxima, (μ_{max}) velocidad específica de crecimiento, (t-lag) tiempo de adaptación o fase lag, (td) tiempo de duplicación.

Los valores de velocidad máxima disminuyeron considerablemente en todas las combinaciones del ensayo, además de no presentarse datos atípicos, por lo que se decidió tomar este parámetro para el cálculo de la *fa* y poder analizar el efecto inhibitorio *in vitro* de

la combinación de las bacteriocinas sobre *B. thermosphacta*. Los valores obtenidos de la *fa* se representaron en la figura 21. En el eje de las (x) se dispusieron las concentraciones de las bacteriocinas y en el de las (y) los valores de *fa* obtenidos en las combinaciones analizadas. En las primeras dos concentraciones, se observa un efecto sinérgico con la enterocina individual, mientras que en las dos últimas concentraciones se aprecia un efecto sinérgico con la pediocina individual, en todas las combinaciones en estudio, no hay efecto sinérgico si se combinan las dos bacteriocinas.

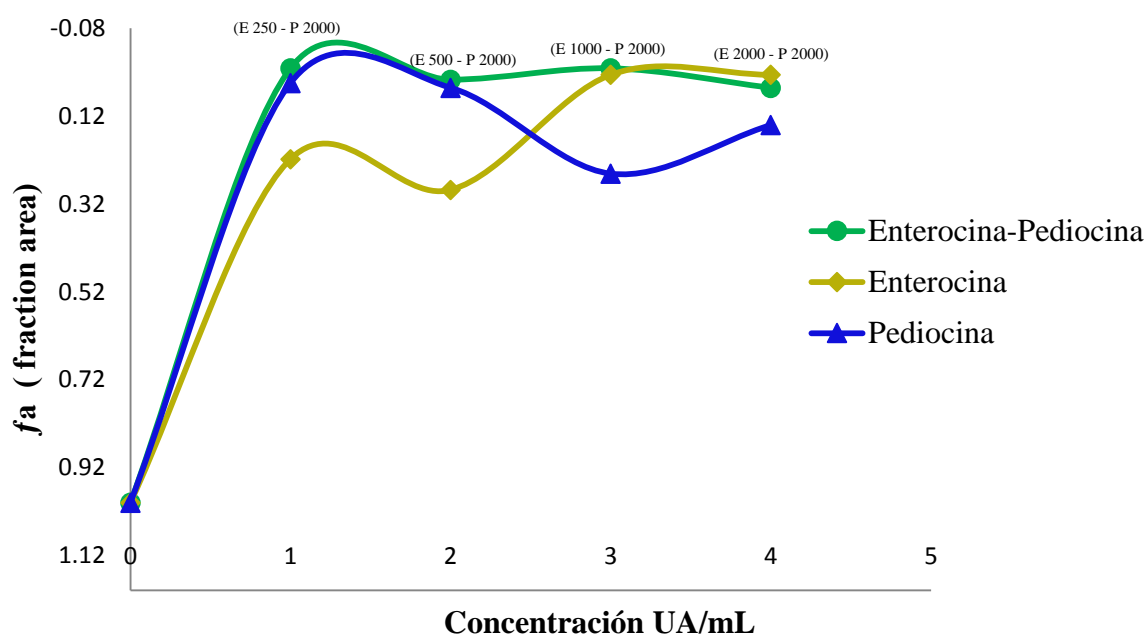


Figura 21. Efecto inhibitorio de las combinaciones enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (2000 UA/mL); enterocina 29 (250-2000 UA/mL) y pediocina 133 (250-2000 UA/mL) sobre el crecimiento *in vitro* de *B. thermosphacta*

6.3.3. *Weissella viridescens*

La evaluación del efecto de la combinación *in vitro* de las bacteriocinas se llevó a cabo mediante un ensayo de tablero de ajedrez como se describió en el inciso 5.5., en las mismas condiciones que el experimento realizado con *L. innocua*, el análisis de varianza ANOVA de los datos obtenidos en todos los tratamientos muestran una diferencia significativa ($p < 0.001$) del desarrollo de *W. viridescens* con respecto al control (Anexo B). Cabe señalar que los tratamientos con las bacteriocinas sin combinar (en todas las concentraciones probadas), obtuvieron valores más bajos de crecimiento microbiano, mientras que los

tratamientos con las combinaciones de bacteriocinas presentaron un ligero aumento en el crecimiento a medida que aumentaban las concentraciones de las mismas. En el análisis estadístico demostró que hubo una resistencia del microorganismo en la combinación con las concentraciones más altas de las bacteriocinas. Este fenómeno se puede observar en la figura 22, donde se muestra la comparación de medias de los valores promedio de todos los tratamientos y el control. Se puede apreciar que a medida que aumentan las concentraciones de las bacteriocinas se observa un aumento en el desarrollo de *W. viridescens*, siendo más marcado con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000) – pediocina (1000) y enterocina 29 (250-2000) – pediocina 133 (2000), respectivamente. Por otra parte, los valores de absorbencia obtenidos son menores a los obtenidos por los otros dos microorganismos sensibles probados, posiblemente debido a las características de crecimiento de *W. viridescens* (como microorganismo psicrófilo y por la temperatura utilizada de 35 °C su crecimiento fue más lento). Como sucedió con los microorganismos anteriores, se tomaron las combinaciones de la columna con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000) – pediocina 133 (2000) (color rosa), para el cálculo de la *fa* ya que bajo las condiciones probadas, se presentó un aumento proporcional de la población microbiana conforme al aumento de la concentración de la enterocina 29.

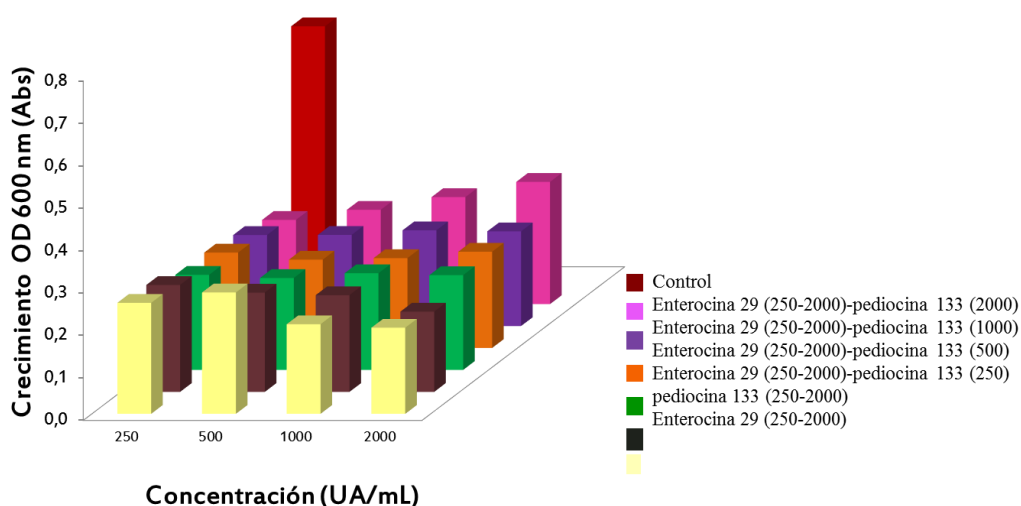


Figura 22. Comparación de medias de valores promedio de cultivos *in vitro* de *Weisella viridescens* con las combinaciones del arreglo de ajedrez de enterocina 29 – pediocina 133

A continuación se presentan en la tabla 12 los parámetros de las curvas crecimiento microbiano de *W. viridescens* con las bacteriocinas individuales: enterocina 29 (250-2000), pediocina 133 (250-2000) y el control. Se observa una disminución significativa de los valores de la velocidad máxima en todas las concentraciones de las bacteriocinas con respecto al control. El tiempo de adaptación, a diferencia de los otros dos microorganismos sensibles, fue mayor en el control en comparación con las demás concentraciones probadas de las bacteriocinas, excepto para la enterocina 29 (500) y enterocina 29 (2000), con las que se obtuvo un valor más alto que el del control. En lo que respecta al tiempo de duplicación o generación (tiempo que tarda la célula bacteriana en dividirse), presentó valores más altos en todas las concentraciones de las bacteriocinas que en el control, y justifica el crecimiento más lento en comparación con los otros microorganismos sensibles.

Tabla 12. Parámetros de las curvas de crecimiento de *Weissella viridescens* tratadas con enterocina 29 (250-2000 UA/mL) y pediocina 133 (250-2000 UA/mL)

Parámetros crecimiento	Control	E ₂₅₀	E ₅₀₀	E ₁₀₀₀	E ₂₀₀₀	P ₂₅₀	P ₅₀₀	P ₁₀₀₀	P ₂₀₀₀
N ₀	0,13	0,13	0,16	0,17	0,20	0,14	0,16	0,15	0,20
N _{max}	0,53	0,23	0,18	0,20	1,24	0,18	0,26	0,20	0,24
μ _{max} (h ⁻¹)	0,66	0,07	0,03	0,03	0,07	0,02	0,05	0,02	0,03
t-lag(h)	8,32	6,75	9,51	4,42	28,11	1,04	2,94	1,16	3,66
t-d(h)	1,06	11,59	23,33	24,51	11,38	37,63	16,55	32,20	27,76

(E) enterocina, (P) pediocina, (N₀) población inicial, (N-max) población máxima, (μ_{max}) velocidad específica de crecimiento, (t-lag) tiempo de adaptación o fase lag, (td) tiempo de duplicación.

En la tabla 13 se aprecian los parámetros de las curvas de crecimiento microbiano de *Weissella viridescens* con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000)/pediocina 133 (250) y enterocina 29 (250-2000)/pediocina 133 (500) UA/mL y el control. Se aprecia una disminución significativa en la velocidad máxima. La fase de latencia o el tiempo de adaptación presentó valores más altos en comparación con los de los otros dos microorganismos sensibles, aunque para *W. viridescens* las combinaciones probadas provocaron la aparición de valores menores al del control, excepto para la combinación enterocina 29 (2000)/pediocina 133 (500) que presentó un valor mayor al control. En el caso del tiempo de duplicación, se presentaron valores significativamente más altos con respecto al control, tanto con las bacteriocinas individuales como con las diferentes combinaciones.

Tabla 13. Parámetros de las curvas de crecimiento de *Weisella viridescens* con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (250 UA/mL) y enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (500 UA/mL)

Parámetros crecimiento	Control	E-P	E-P	E-P	E-P	E-P	E-P	E-P	E-P
		250/250	500/250	1000/250	2000/250	250/500	500/500	1000/500	2000/500
N_0	0,13	0,15	0,15	0,17	0,22	0,15	0,15	0,18	0,22
N_{max}	0,53	0,18	0,24	0,20	0,26	0,22	0,17	0,20	3,39
$\mu_{max}(h^{-1})$	0,66	0,03	0,05	0,02	0,03	0,03	0,01	0,02	0,05
t-lag(h)	8,32	5,48	3,31	5,14	3,87	0,82	3,68	1,56	26,51
t-d(h)	1,06	26,15	18,79	33,95	32,40	22,66	48,19	41,27	16,82

(E) enterocina, (P) pediocina, (No) población inicial, (N-max) población máxima, (μ_{max}) velocidad específica de crecimiento, (t-lag) tiempo de adaptación o fase lag, (td) tiempo de duplicación.

La tabla 14 muestra los parámetros de las curvas de crecimiento microbiano de *W. viridescens* con las combinaciones de enterocina 29 (250-2000)/pediocina 133 (1000) y enterocina 29 (250-2000)/pediocina 133 (2000) y el control. La velocidad máxima presentó valores menores al del control en todas las combinaciones. En el caso del tiempo de adaptación, todas las combinaciones presentaron nuevamente valores menores con respecto al control, excepto para las combinaciones enterocina 29 (1000)/pediocina 133 (1000) y enterocina 29 (2000)/pediocina 133 (1000). Respecto al tiempo de generación, éste presentó un aumento significativo con respecto al control en todas las combinaciones de enterocina 29/ pediocina 133.

Tabla 14. Parámetros de las curvas de crecimiento microbiano de *Weisella viridescens* con las combinaciones enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (1000 UA/mL) y enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (2000)

Parámetros velocidad	Control	E-P	E-P	E-P	E-P	E-P	E-P	E-P	E-P
		250/1000	500/1000	1000/1000	2000/1000	250/2000	500/2000	1000/2000	2000/2000
N_0	0,13	0,17	0,18	0,22	0,23	0,20	0,23	0,24	0,28
N_{max}	0,53	0,20	0,20	0,37	2,30	0,24	0,27	0,30	0,37
$\mu_{max}(h^{-1})$	0,66	0,02	0,03	0,24	0,11	0,02	0,03	0,04	0,05
t-lag(h)	8,32	3,40	3,52	9,92	14,53	1,20	5,02	5,14	5,73
t-d(h)	1,06	28,99	28,62	14,22	16,45	33,69	27,11	17,94	17,75

(E) enterocina, (P) pediocina, (No) población inicial, (N-max) población máxima, (μ_{max}) velocidad específica de crecimiento, (t-lag) tiempo de adaptación o fase lag, (td) tiempo de duplicación.

La figura 23 muestra el efecto inhibitorio de las combinaciones enterocina-pediocina contra *W. viridescens*. Las características especiales de crecimiento de este microorganismo, por ejemplo el que pueda crecer a temperatura de refrigeración lo lleva a tener un crecimiento lento, causa principal por la de que los valores de fa sean muy cercanos a cero (o que se alcanzó la total inhibición del microorganismo). Aun así, el microorganismo podría estar latente a temperaturas de refrigeración y recuperarse y crecer (provocando deterioro en el producto cárnico) si cambiasen las condiciones de crecimiento. Por esta razón, no es descartable la información generada en este experimento. En todas las combinaciones enterocina 29/pediocina 133 analizadas el efecto de inhibición fue aditivo y se obtuvo el mismo efecto con las bacteriocinas individuales que en combinación.

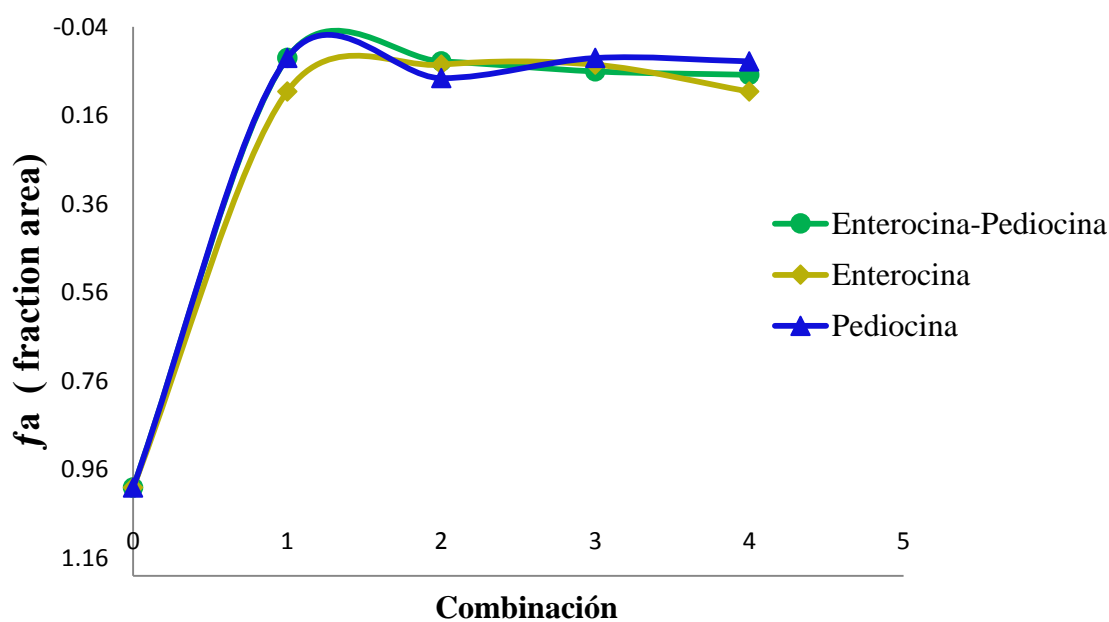


Figura 23. Efecto inhibitorio de las combinaciones enterocina 29 (250-2000 UA/mL)/pediocina 133 (2000 UA/mL), enterocina 29 (250-2000 UA/mL y pediocina 133 (250-2000 UA/mL) sobre el crecimiento *in vitro* de *Weisella viridescens*

6.3.4. Selección de las mejores combinaciones

De acuerdo al análisis del efecto de las combinaciones de enterocina 29/pediocina 133 sobre los tres microorganismos sensibles se seleccionaron las siguientes combinaciones para proceder con la elaboración y evaluación del efecto antimicrobiano de las películas antimicrobianas sobre los microorganismos sensibles:

- ❖ Enterocina 29/pediocina 133 (250/2000 UA/mL)
- ❖ Enterocina 29/pediocina 133 (500/2000 UA/mL)
- ❖ Enterocina 29/pediocina 133 (1000/2000 UA/mL)
- ❖ Enterocina 29/pediocina 133 (2000/2000 UA/mL)

6.4. Soluciones formadoras de recubrimientos y películas antimicrobianas

6.4.1. Obtención de películas

Se elaboraron las películas de acuerdo con lo descrito en el inciso 5.7, se procedió a la elaboración de las películas antimicrobianas utilizando una proporción de 90:10 de APSL y mezcla de bacteriocinas con la adición de las combinaciones enterocina 29/pediocina 133 anteriormente seleccionadas (figura 24).

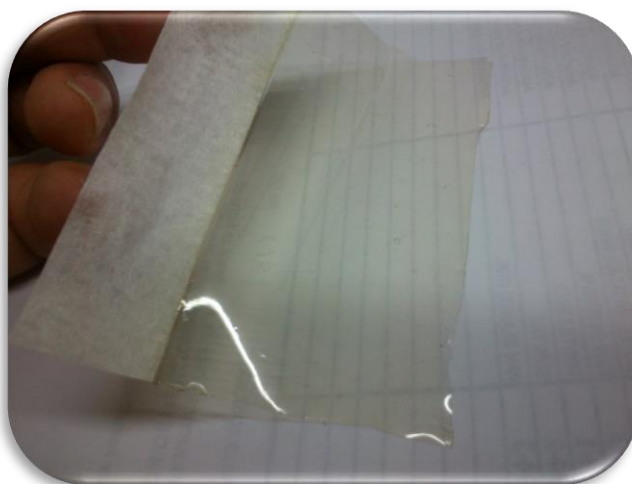


Figura 24. Película antimicrobiana adicionada con las bacteriocinas enterocina 29 y pediocina 133

Las películas antimicrobianas fueron elaboradas a partir de APSL, adicionándolas con la mezcla de bacteriocinas, la figura 25 muestra las diferentes películas antimicrobianas elaboradas con las combinaciones seleccionadas.

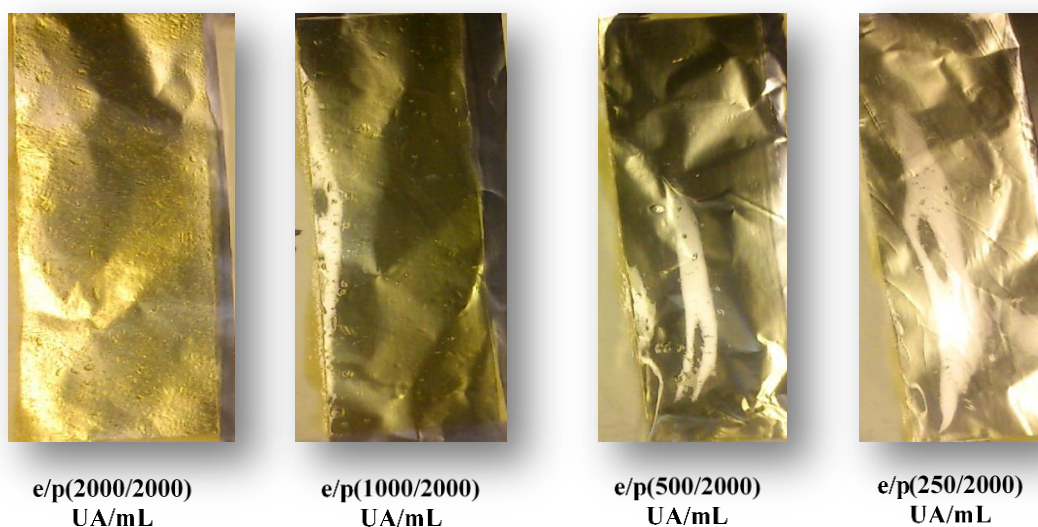


Figura 25. Películas antimicrobianas formadas a partir de APSL adicionadas con una combinación de bacteriocinas en diferentes concentraciones

6.5. Actividad antimicrobiana de las películas adicionadas con las combinaciones enterocina 29/pediocina 133

La determinación de la actividad antimicrobiana de las películas elaboradas a partir de APSL se realizó por el método de difusión en agar descrito en el inciso 5.8, utilizando discos de las películas. En la figura 26 se pueden observar halos de inhibición generados: de izquierda a derecha se aprecia en primer lugar el control (película sin antimicrobianos), que no generó halo de inhibición, después se encuentran los halos de inhibición producidos por las películas adicionadas con la combinación enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL), la diferencia entre las dos aplicaciones de la misma concentración es la proporción APSL y de mezcla de bacteriocinas de 90:10 y 80:20 respectivamente (que como se puede apreciar no influyó en el diámetro del halo). A continuación se encuentra el halo de inhibición presentado por la combinación enterocina 29/pediocina 133 (1000-2000 UA/mL),

observándose un diámetro muy similar a los anteriores aunque ligeramente difuso, a un lado se encuentra el halo de inhibición producido por la combinación enterocina 29/pediocina 133 (500-2000 UA/mL), apreciándose que todavía hay inhibición del microorganismo sensible aunque con un diámetro ligeramente más pequeño, finalmente se encuentra el halo de inhibición producido por la combinación enterocina 29/pediocina 133 (250-2000) UA/mL es menor que el anterior, aunque en él todavía se aprecia inhibición, mientras que el halo de inhibición producido por la nisina se aprecia un poco más grande y más nítido (control). El halo de inhibición del centro de la placa corresponde a un control respecto al contenido de bacteriocinas de los discos de la película antimicrobiana. En medio TSB, se observa que el halo de inhibición es mucho más grande, en comparación a los presentados por las películas antimicrobianas, esta diferencia puede ser debido a que la difusión más lenta de las bacteriocinas de las películas hacia el medio por estar en un medio sólido. Otro factor que podría afectar es el pH: las películas fueron elaboradas a pH 7 y si tomamos en cuenta que el punto isoeléctrico de las proteínas del aislado de proteínas de suero de leche se encuentra alrededor de 5, en las condiciones de pH utilizadas para la formación de SFP podrían existir más cargas negativas que harían que las bacteriocinas, de naturaleza catiónica, fueran atrapadas en la película y difundieran menos al medio. Por otra parte de acuerdo con Ennhar y col. (2000), la pediocina puede ser inactivada a pH 7, porque el pH óptimo de la misma es de 6.0, donde tiene una carga neta de +7.

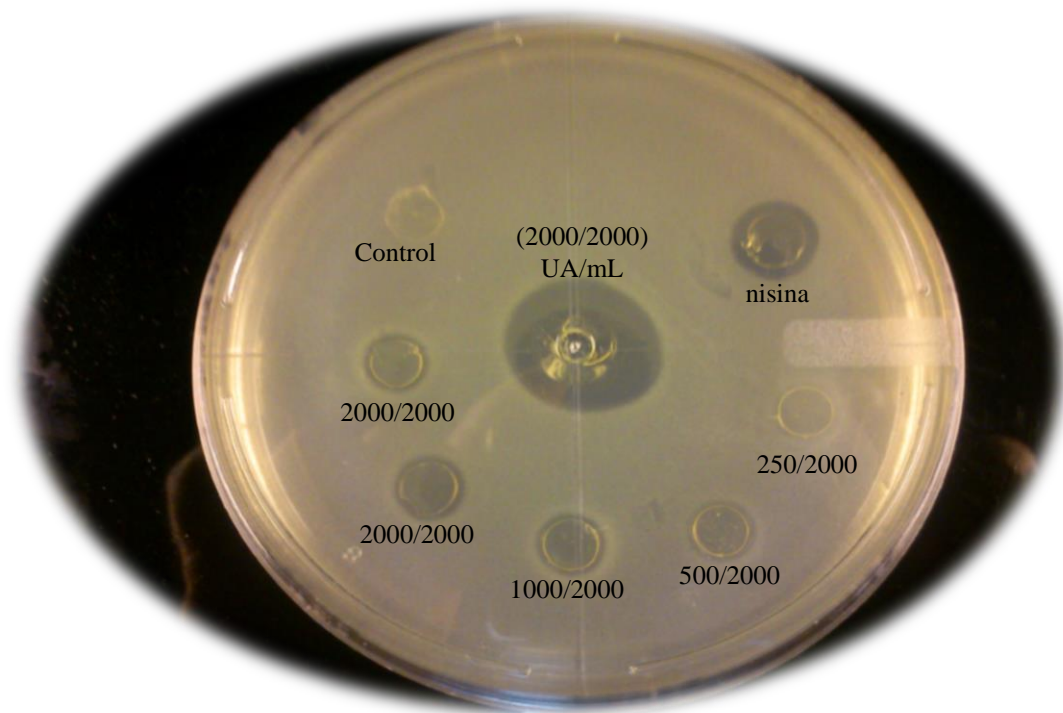


Figura 26. Actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* de películas elaboradas a partir de APSL adicionadas con diferentes combinaciones de enterocina 29/pediocina 133 a pH 7

Con el fin de aumentar la inhibición de las películas antimicrobianas se aumentó la proporción de la mezcla de enterocina 29/pediocina 133 que se le adiciona a la SFP, hasta una relación APSSL-bacteriocinas de 80:20. Los resultados se muestran en la figura 27, en la que se puede apreciar que el control (película sin antimicrobianos) no permite obtener halo de inhibición, mientras que las películas antimicrobianas con las combinaciones enterocina 29/pediocina 133 con concentraciones más altas (2000/2000 y 1000-2000 UA/mL) mejoraron su efecto inhibitorio, comparado con el mostrado en la figura 26, Con respecto a las películas antimicrobianas con las combinaciones enterocina 29/pediocina 133 con concentraciones más bajas, el halo de inhibición presentado es más difuso, por lo que muy probablemente éstas concentraciones no van a ser consideradas para aplicar el recubrimiento al producto cárnico. El control de nisina mostró un halo de inhibición bien definido así como el halo del pozo central (control del contenido de bacteriocinas), mostrando que la difusión de bacteriocinas que se encuentran en las películas antimicrobianas hacia el medio es menor.

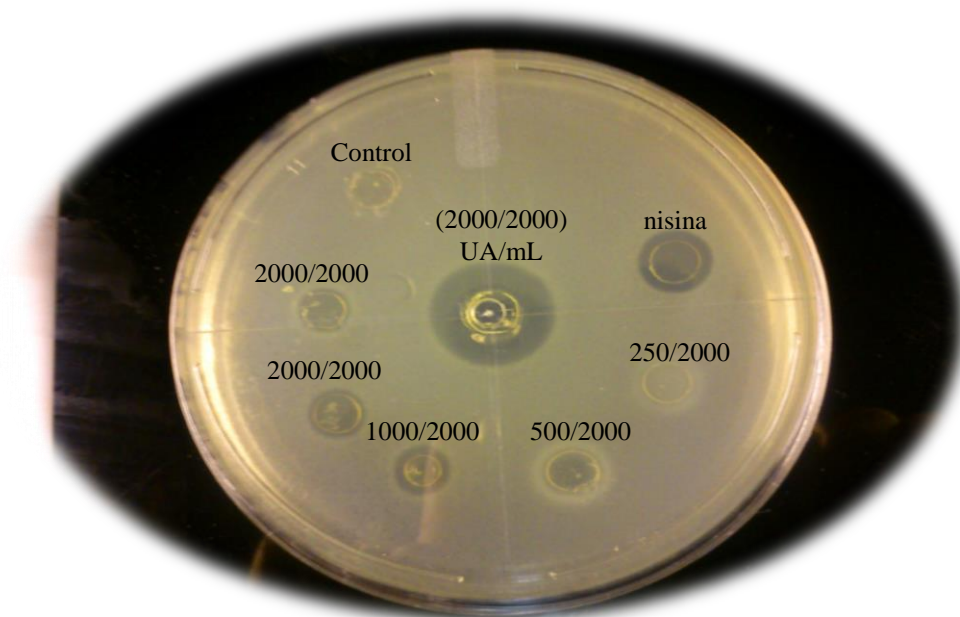


Figura 27. Actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* de películas elaboradas a partir de APSL adicionadas de diferentes combinaciones de enterocina 29/pediocina 133 a pH 7

Con el objetivo de aumentar la difusión de las bacteriocinas al medio, se elaboraron películas antimicrobianas con pH más bajos, logrando buenos resultados hasta un pH de 6. La figura 28 muestra la actividad antimicrobiana de películas obtenidas a pH 6: se observa que el control no presentó halo de inhibición, las primeras dos películas antimicrobianas con una relación 70:30 de APSL y mezcla de bacteriocinas y una combinación enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL), no presentaron un aumento en el diámetro de inhibición debido al aumento de porcentaje de la mezcla de bacteriocinas. Las siguientes dos películas antimicrobianas, con una relación APSL-bacteriocinas de 80:20 y una combinación enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000), sí presentaron halo de inhibición, al igual que sucedió con las demás combinaciones, la concentración más baja de enterocina: enterocina 29/pediocina 133 (250-2000). El control de nisina nuevamente presentó un diámetro más grande, debido probablemente a la mayor a la difusión que presentan las bacteriocinas en un medio líquido.

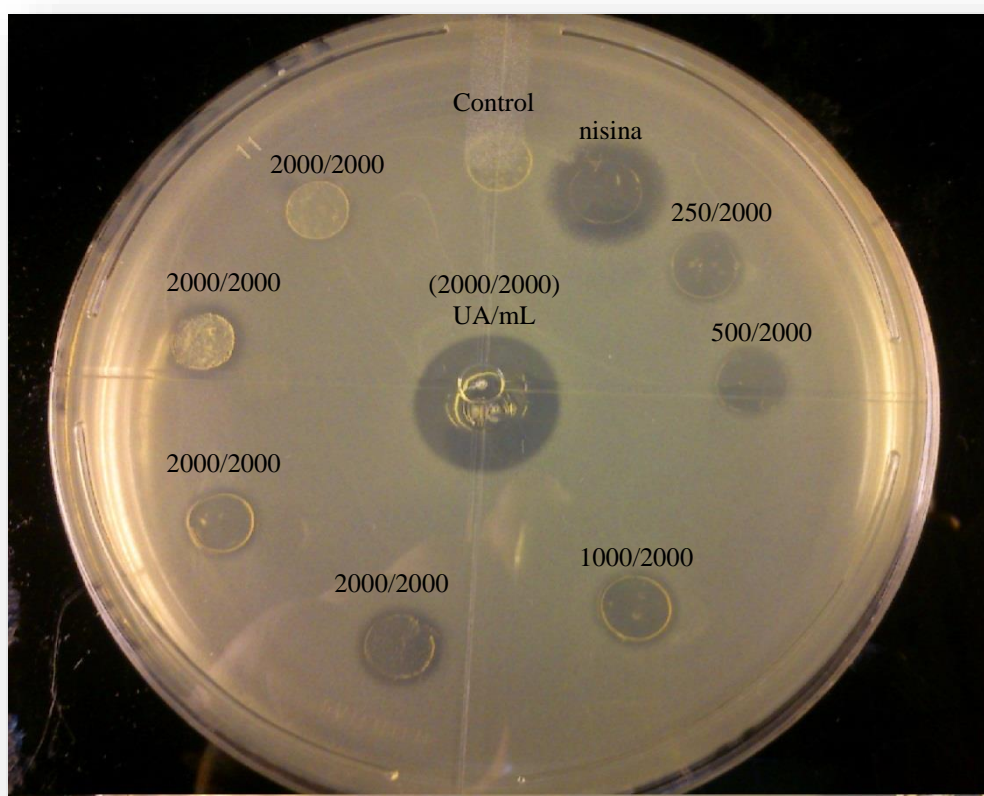


Figura 28. Actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* de películas elaboradas a partir de APSL adicionadas con combinaciones de enterocina 29/pediocina 133 a pH 6

La figura 29 muestra el efecto inhibitorio contra *B. thermosphacta* de las películas antimicrobianas realizadas a partir de APSL adicionado con bacteriocinas, a pH 6. El crecimiento de este microorganismo no es tan homogéneo como el de *L. innocua*, aun así se observa que el control no presentó halo de inhibición. De izquierda a derecha, las películas con la concentración más alta de bacteriocinas enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL) con una relación de APSL y bacteriocinas de 70:30 presentaron halos de inhibición un poco más definidos que los halos de inhibición que mostraron las películas antimicrobianas con las mismas concentraciones de bacteriocinas y una relación de APSL y bacteriocinas de 80:20. La película antimicrobiana con la combinación de bacteriocinas enterocina 29/pediocina 133 (1000-2000 UA/mL) presentó un halo de inhibición un poco difuso, y las películas con las combinaciones con concentraciones más bajas de

bacteriocinas, enterocina 29/pediocina 133 (500-2000) y enterocina 29/pediocina 133 (250-2000), no presentaron halos de inhibición. Por su parte, la película control adicionada con nisina sí presentó halo de inhibición, con un diámetro mayor a las anteriores y bien definido. De igual forma, el pozo central con el volumen equivalente de la mezcla de bacteriocina adicionadas a las películas presentó un halo de inhibición bien definido, no se había logrado halos de inhibición para este microorganismo con películas elaboradas a pH de 7, con las mismas concentraciones utilizadas. Por otra parte hay una disminución de actividad de las bacteriocinas en las películas y las bacteriocinas en medio líquido, debido probablemente a las interacciones electrostáticas iónicas o hidrofóbicas que se pueden establecer entre la matriz proteica y las bacteriocinas influyendo en la eficiencia de la mismas (Murray y Richard 1997).

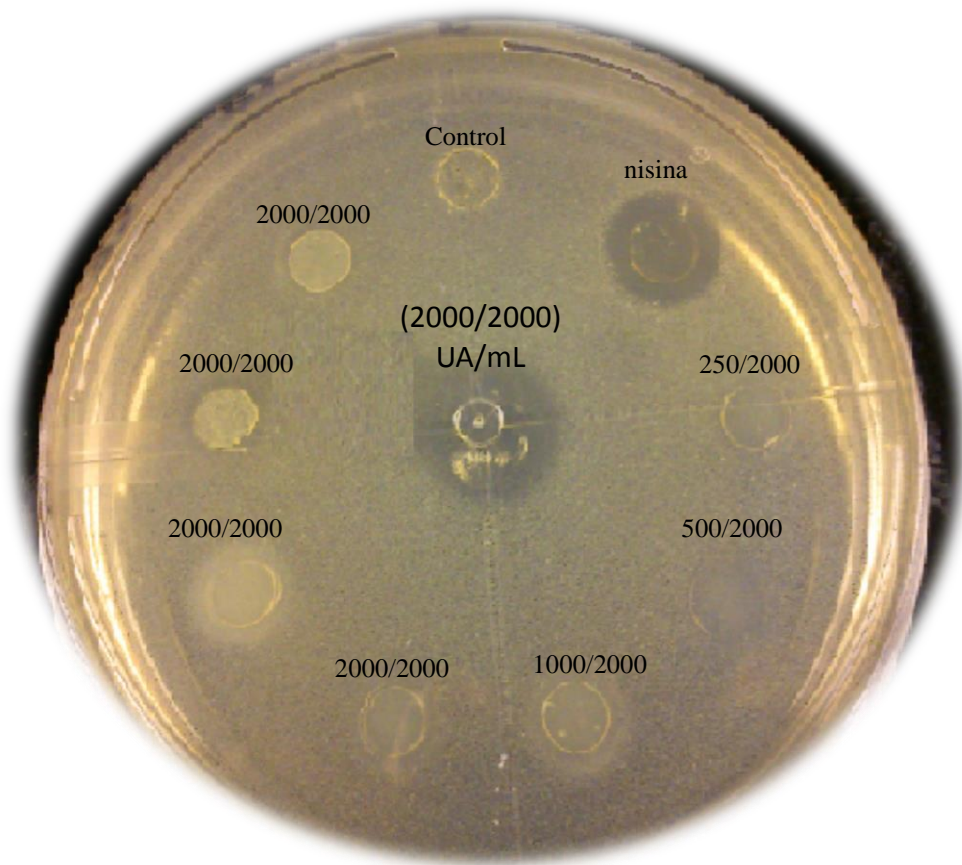


Figura 29. Actividad antimicrobiana contra *Brochothrix thermosphacta* de películas elaboradas a partir de APSL adicionadas con diferentes combinaciones de enterocina 29/pediocina 133 a pH 6

La figura 28 muestra la actividad antimicrobiana contra *Weissella viridescens* de películas elaboradas a partir de APSL adicionado con combinaciones de enterocina 29/pepidocina 133, a pH 6. Debido al reducido crecimiento de este microorganismo no se aprecia una forma bien definida de los halos, pero sí se observa una diferencia entre los mismos. En el caso del control, no se presentó halo de inhibición, mientras que las películas antimicrobianas con una combinación de enterocina 29/pepidocina 133 (2000-2000 UA/mL) en sus diferentes relaciones de adición de APSL y bacteriocinas de 70:30 y 80:20 sí lo presentaron (muy similar en ambos casos). De igual forma sucedió con la película antimicrobiana con la combinación enterocina 29/pepidocina 133 (1000-2000 UA/mL), que presentó un halo de inhibición muy similar e igual de definido que las películas antimicrobianas con las concentraciones más altas de bacteriocinas. Al contrario las películas antimicrobianas con las concentraciones más bajas de bacteriocinas, las cuales mostraron halos de inhibición más difusos. El halo de inhibición producido por el control con nisina fue el que mostró más nitidez, mientras el halo del pozo central se mostró difuso.

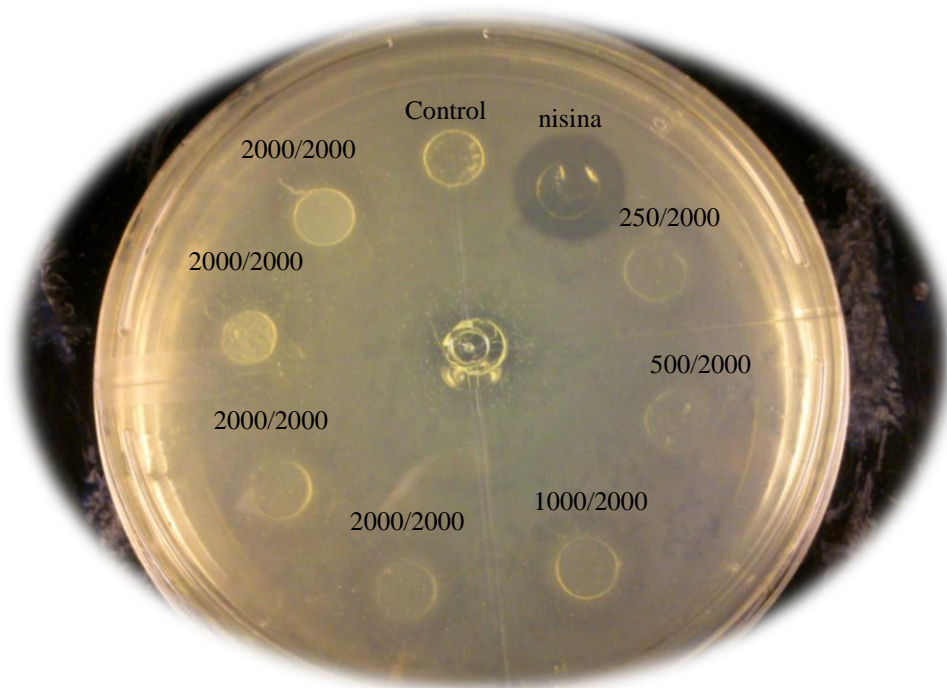


Figura 30. Actividad antimicrobiana contra *Weissella viridescens* de películas elaboradas a partir de APSL adicionadas con diferentes combinaciones de enterocina 29/pepidocina 133 a pH 6

6.6. Recubrimiento antimicrobiano

La elaboración del recubrimiento se llevó a cabo de acuerdo al inciso 5.7. Se elaboraron cuatro diferentes recubrimientos: mezcla de pediocina- enterocina (2000 UA/mL de cada una), pediocina a una concentración de 2000 UA/mL, enterocina a una concentración de 2000 UA/mL y, por último, se elaboró un recubrimiento control sin bacteriocinas. Todos los recubrimientos tuvieron un tratamiento de luz UV durante 20 minutos (figura 31).



Figura 31. Recubrimiento antimicrobiano

6.7. Aplicación del recubrimiento a salchichas tipo Viena

Las salchichas tipo Viena recibieron un tratamiento con luz UV por 20 minutos en campana de flujo laminar, posteriormente se inocularon por inmersión durante 5 minutos en una suspensión celular con una carga microbiana de 10^5 UFC/mL de los microorganismos sensibles, (sección 5.10) (primera imagen de la figura 32), se mantuvo en la campana de flujo laminar durante 15 minutos. Inmediatamente después se aplicó el recubrimiento antimicrobiano por inmersión, y se dejó secar en la campana de flujo laminar durante 60 minutos, (imagen 2 y 3 de la figura 32).

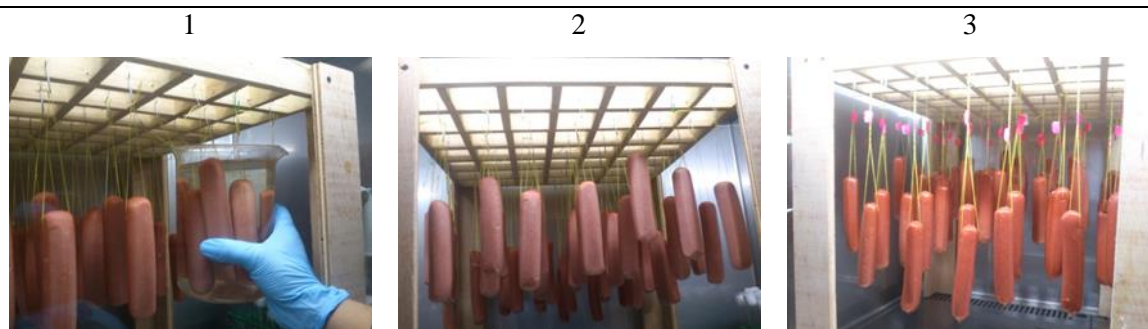


Figura 32. Aplicación del recubrimiento a salchichas tipo Viena inoculadas con los microorganismos sensibles.

Cada salchicha se empacaron al vacío y se almacenó durante 40 días (figura 33).



Figura 33. Salchicha tipo Viena con el recubrimiento antimicrobiano empacada al vacío

6.8. Efecto del recubrimiento en salchichas inoculadas con microorganismos sensibles

Se tomaron muestras los días 1, 5, 12, 19, 26 y 40, para los análisis fisicoquímicos y microbiológicos.

6.8.1. Análisis Fisicoquímicos:

6.8.1.1. Variación de pH

En el día 1 de almacenamiento el valor de pH de todos los tratamientos fue alrededor de 6 (figura 44), concuerda con lo reportado para productos cárnicos curados (Dykes y col., 1995), encontrando una excepción en el tratamiento de la enterocina individual, en el día 5 de almacenamiento, el pH continuo manteniéndose estable, no encontrando alguna diferencia significativa entre tratamientos, excepto de igual forma para el tratamiento de la enterocina sola. En el día 12 empezó un ligero descenso en los valores obtenidos, en los siguientes días de almacenamiento, se continuó con este descenso de pH, esta disminución

se atribuye a la presencia de bacterias lácticas, que como se analizará posteriormente, la cuenta de bacterias lácticas aumentó en los últimos días de almacenamiento y concuerda con estos resultados.

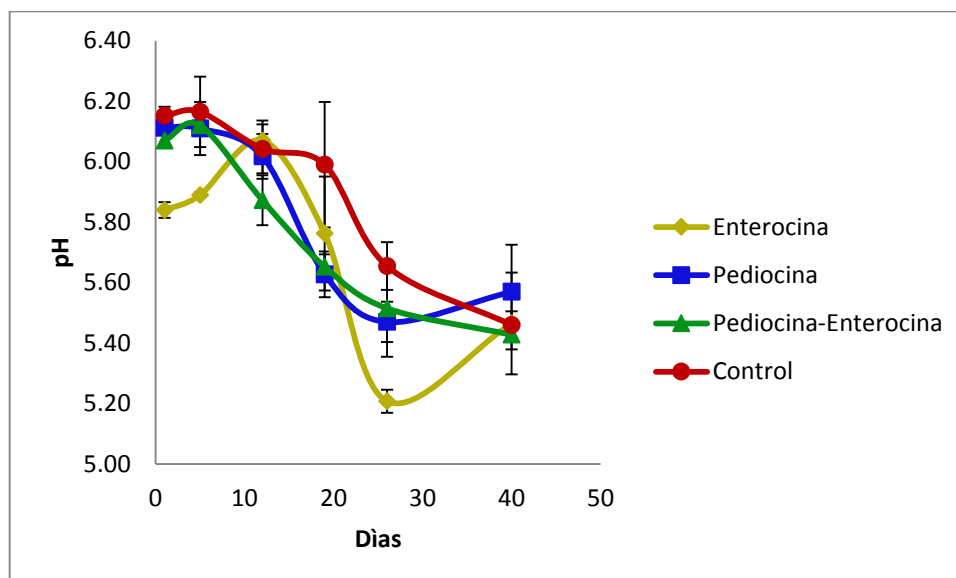


Figura 34. Variación de pH de las muestras de salchicha inoculadas con los tres microorganismos sensibles almacenadas durante 40 días a 4 y 10 °C

6.8.1.2. Determinación de rancidez

La oxidación lipídica es un proceso químico, que ocurre a nivel de los ácidos grasos, en particular los poliinsaturados de cadena larga, los factores que afectan esta oxidación lipídica son luz, la concentración de oxígeno, la temperatura y la radiación. Para determinar la oxidación lipídica o rancidez se utilizó el método de TBARs, que mide el índice de sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico, el cual se fundamenta en la reacción entre el malonaldehído que es uno de los principales productos secundarios que se forman durante la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga con el ácido tiobarbiturico formando un compuesto MDA-TBA cromógeno, el cual presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 533 nm así se puede cuantificar la concentración de MDA en carne y productos cárnicos (Tarladgis y col., 1969; Botsoglou y col., 2004).

En el día 1 hay una diferencia significativa entre el control con un valor de 1.08 mg MDA/kg carne y los tres tratamientos con el recubrimiento adicionado con bacteriocinas, cabe señalar

que antes de inocular las salchichas tratadas, se llevó a cabo un tratamiento con luz UV por 20 minutos en campana de flujo laminar, probablemente la diferencia tan grande entre el control y los 3 tratamientos, fue influido por este tratamiento de luz UV (figura 45). A continuación en el día 5 se obtuvo un máximo tanto para el control con 1.45 mg MDA/kg carne, como para los otros tratamientos, siendo el valor más alto de 0.87 que corresponde a la pediocina individual, mientras que para la combinación de pediocina –enterocina el valor fue de 0.7 mg MDA/kg producto, el valor de TBARs en productos cárnicos cocidos puede ser diferente comparado con el de la carne fresca debido a que con la reducción de tamaño se rompen las membranas del tejido por lo que hay una consecuente incorporación de oxígeno en los tejidos acelerando el desarrollo de rancidez oxidativa a pesar de eso, los valores obtenidos son similares a los de carne fresca sometida a almacenamiento 0.7 mg MDA/kg producto (Tarladgis y col., 1969; Kilinceker y col., 2009), posteriormente en el día 12 hubo un descenso significativo en todos los tratamientos, estos resultados concuerdan con algunos autores que han encontrado un comportamiento similar debido probablemente a la reacción del malonaldehído con los productos de degradación proteica, ya que existe una reactividad entre el malonaldeído y los grupos amino de los aminoácidos (Andreo y col., 2001; Formanek y col., 2001; Giménez y col., 2002;). El día 19 y 26 de almacenamiento los valores de oxidación se mantuvieron estables obteniendo valores no mayores de 0.6 mg MDA/kg producto en todos los tratamientos así como también en el control, al final del almacenamiento se presentó un ligero aumento en el control de 0.69, mientras que para los tratamientos de las bacteriocinas individuales fue de 0.56 mg MDA/kg producto, el tratamiento combinado de bacteriocinas presentó un decremento con un valor de 0.46 presentando una diferencia significativa con los otros tratamientos.

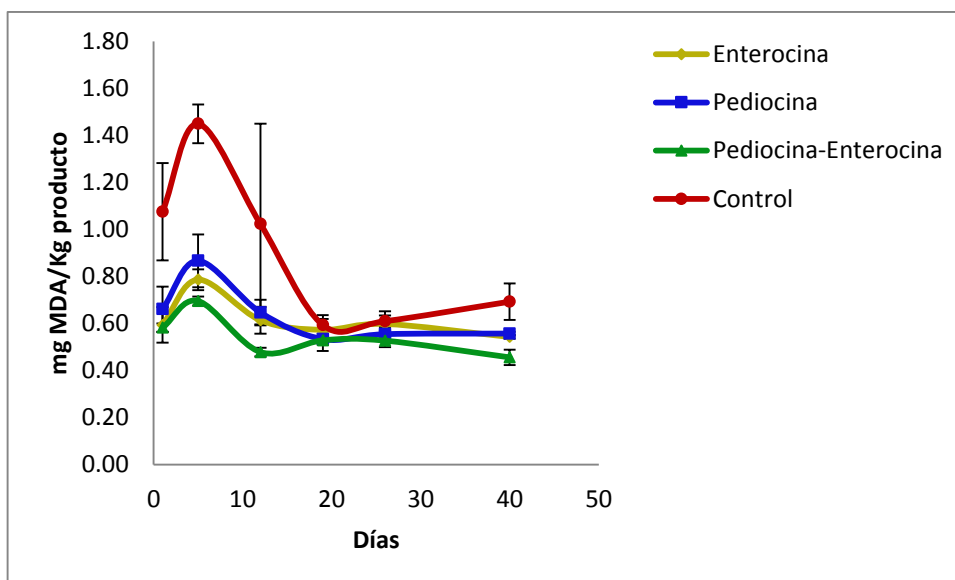


Figura 35. Determinación de rancidez de las muestras de salchicha inoculadas con los tres microorganismos sensibles almacenadas durante 40 días a 4 y 10 °C

6.8.2. Análisis microbiológico

El análisis de varianza ANOVA del análisis microbiológico, mostró una diferencia significativa por efecto de tratamiento (Anexo B). Además se calculó el promedio y la desviación estándar de todos los datos, y se graficaron por microorganismo sensible

6.8.2.1. Crecimiento de *Listeria innocua*

La figura 36 se observa la gráfica del efecto del recubrimiento antimicrobiano adicionado con bacteriocinas sobre el crecimiento en UFC/g de *L. innocua* en salchichas. En el eje de las ordenadas se encuentran los días de almacenamiento, mientras que en el eje de las abscisas se incluye la concentración del microorganismo sensible en Log de UFC/g. Analizando la curva de crecimiento del recubrimiento antimicrobiano adicionado con la mezcla de la combinación enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL) (color verde), muestra que durante los primeros días de almacenamiento hay una diferencia significativa entre la muestra con el recubrimiento antimicrobiano con respecto al control, se obtuvieron valores hasta dos ciclos logarítmicos más abajo que el control hasta el día 12 (donde se aumentó la temperatura de 4 a 10°C). A partir de ese día hubo un aumento, aunque el crecimiento se mantuvo hasta un ciclo logarítmico por debajo del control hasta el día 20. A

partir de este día se dio un aumento de la concentración bacteriana, obteniéndose el día 26 la cuenta más alta de todo el ensayo. Posteriormente, se aprecia una disminución gradual hasta concentraciones de un ciclo logarítmico por debajo del control en el día 40. En el caso del recubrimiento antimicrobiano con pediocina 133 (2000 UA/mL), en el primer día de almacenamiento mantuvo valores de un ciclo logarítmico debajo de las del control, para después aumentar gradualmente. En el día 12 y 26 se obtuvieron valores de medio ciclo logarítmico por debajo del control, observándose un aumento gradual en los últimos días de almacenamiento. Por su parte, con el recubrimiento antimicrobiano con enterocina 29 (2000 UA/mL) se observó un aumento gradual en los primeros dos días de almacenamiento, hasta obtener valores mayores al control en el día 5 de almacenamiento. Posteriormente se presentó una disminución de la población hasta el día 12 de almacenamiento alcanzando medio ciclo logarítmico por debajo de las del control (es en este día donde se presentó una mejor inhibición con respecto al control), para después disminuir gradualmente hasta el final del almacenamiento donde convergieron los valores de los tres tratamientos mostrando un efecto aditivo por parte de las dos bacteriocinas (ya que se obtuvieron valores muy parecidos al tratamiento con el recubrimiento antimicrobiano con las bacteriocinas individuales y la combinación de las dos bacteriocinas). En cualquier caso, en los tres tratamientos se alcanzó una disminución de la población microbiana de un ciclo logarítmico con respecto al control, estos resultados mejoran ampliamente a los obtenidos por Marcos y col. (2007), en el control de *Listeria monocytogenes* en jamón cocido empacado al vacío con un recubrimiento de alginato con una concentración de enterocinas de 2000 UA/cm² obteniéndose valores de 1.5 logaritmos abajo con respecto al control hasta los 15 días de almacenamiento en una vida de anaquel de 29 días a 6 ° C.

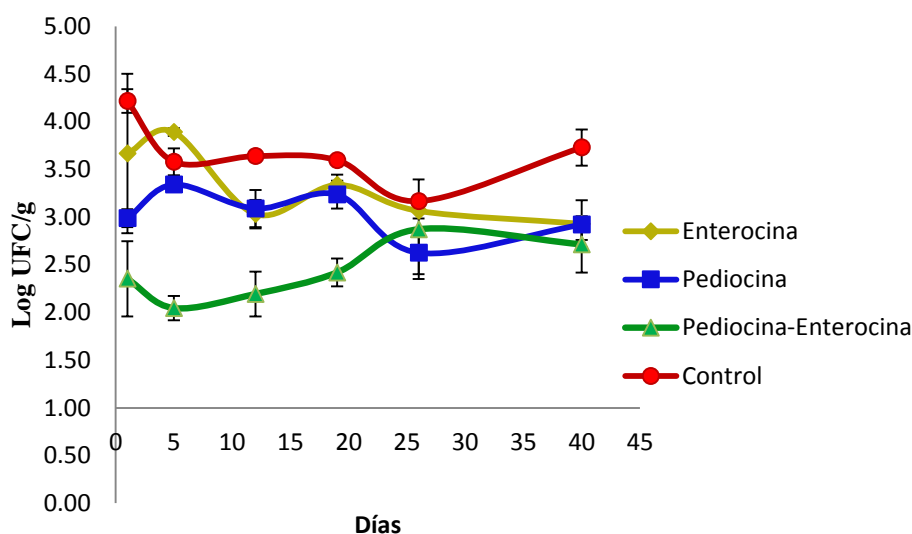


Figura 356. Efecto de la interacción del recubrimiento antimicrobiano sobre las UFC de las muestras de salchicha inoculadas con *Listeria innocua* almacenadas durante 40 días a 4 y 10 °C

6.8.2.2. Crecimiento de *Brochothrix thermosphacta*

Brochothrix thermosphacta es un microorganismo de deterioro, en especial de salchichas. Además, siendo psicrófilo se mantiene latente en refrigeración. En la figura 37 se muestra el efecto de la interacción del recubrimiento antimicrobiano sobre la población de *B. thermosphacta*: en el eje de las ordenadas se representaron los días de almacenamiento y en el eje de las abscisas la concentración de *B. thermosphacta* en Log de UFC/g. Se puede observar en los primeros cinco días de almacenamiento a 4 °C una disminución en la cuenta microbiana en los tres tratamientos, lo mismo que se aprecia en el control (no hay pues un efecto del tratamiento en este tiempo), probablemente es este lapso de tiempo influyó en el crecimiento de este microorganismo, el empaque al vacío aunado a la baja temperatura (Borch y col., 1996). Desde el día cinco al día doce sólo se observa un efecto inhibitorio por parte del recubrimiento antimicrobiano con la combinación enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL), manteniéndose un ciclo logarítmico por debajo con respecto al control. A partir de ese día se aumentó la temperatura a 10°C y en la gráfica se observa un aumento gradual de la población microbiana del recubrimiento antimicrobiano con la combinación de enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL), llegando a ser muy semejante a la de los recubrimientos de enterocina 29 y pediocina 133 sin combinar, aunque manteniéndose casi un ciclo logarítmico por debajo respecto del control. En el día veintiséis de almacenamiento,

el recubrimiento antimicrobiano con la combinación con enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL) obtuvo nuevamente un mayor efecto inhibitorio, con 1.5 ciclos logarítmicos menos que el control, aunque a partir de ese momento se da un aumento ligero hasta el final del almacenamiento en el día 40. Aun así, se mantuvo un ciclo logarítmico por debajo del control. Con estos resultados se puede deducir que *B. thermosphacta* mostró mayor sensibilidad al tratamiento del recubrimiento antimicrobiano con la combinación enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL) que *Listeria innocua*. Lo anterior concuerda con estudios anteriores donde se empleó un empaque antimicrobiano adicionado con nisina, en carne de res, para inhibir el crecimiento de *B. thermosphacta* la cual se mantuvo por al menos 11 días (Ercolini y col., 2010). Asimismo algunos autores como La Storia y col. (2012) han aplicado un recubrimiento adicionado con nisina a filetes de carne evaluando el crecimiento de *B. thermosphacta* por 12 días a 4 °C, donde se logró controlar el crecimiento de este microorganismo durante la primer semana de almacenamiento.

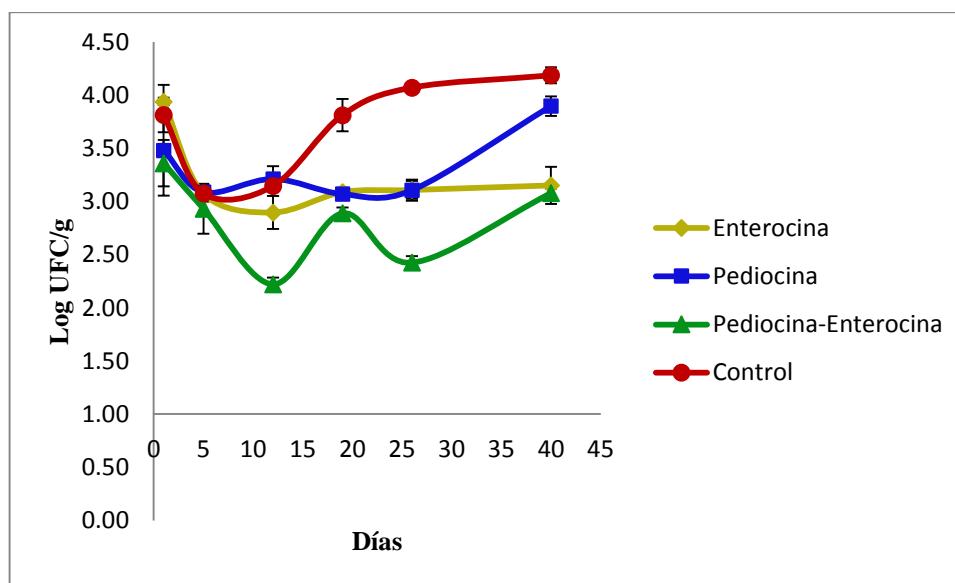


Figura 37. Efecto de la interacción del recubrimiento antimicrobiano sobre las UFC de las muestras de salchicha inoculadas con *Brochothrix thermosphacta* almacenadas durante 40 días a 4 y 10 °C

6.8.2.3. Crecimiento de *Weissella viridescens*

La figura 38 muestra el efecto de la interacción del recubrimiento antimicrobiano sobre la población de *Weissella viridescens*. En el primer día de almacenamiento, la curva de crecimiento de la muestra de salchicha con el recubrimiento antimicrobiano con la combinación enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL) presentó valores menores al control en un ciclo logarítmico. Durante los siguientes 5 días se aprecia un aumento gradual, para alcanzar en el día 12 de almacenamiento una reducción de la población bacteriana de casi 2 ciclos logarítmicos por debajo del control (mayor inhibición del microorganismo sensible alcanzada). A partir de este día, con el aumento en la temperatura de 4 a 10 °C, se observa un aumento gradual en la población microbiana hasta el día 26, para el que se obtuvieron valores de 1.5 ciclos logarítmicos por debajo del control, para posteriormente mantenerse constante hasta el final del almacenamiento a los 40 días. Los otros dos tratamientos (las bacteriocinas individuales), produjeron valores ligeramente superiores a los del control en los primeros cinco días de almacenamiento, mostrando un efecto antagonista por efecto del tratamiento. Los dos tratamientos individuales provocaron curvas de crecimiento muy similares durante todo el almacenamiento, muy parecidas a la curva de crecimiento que mostró el control. Con base en los resultados de los tratamientos con las bacteriocinas individuales, el recubrimiento antimicrobiano con la combinación enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL) mostró un efecto sinérgico en el intervalo de los 12 a 26 días de almacenamiento. Aunque los valores de cuenta microbiana fueron más altos que los obtenidos con *L. innocua* y *B. thermosphacta*, sí es posible apreciar un efecto del tratamiento.

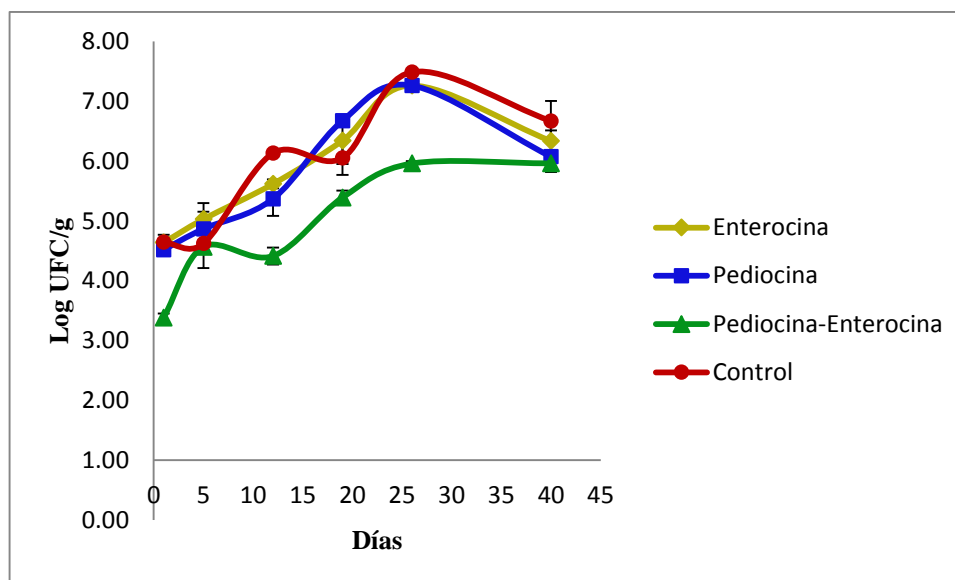


Figura 38. Efecto de la interacción del recubrimiento antimicrobiano sobre las UFC de las muestras de salchicha inoculadas con *Weisella viridescens* almacenadas durante 40 días a 4 y 10 °C.

6.8.2.4. Crecimiento de bacterias lácticas

Las bacterias lácticas forman parte de la microbiota normal de muchos productos cárnicos refrigerados (Comi y col., 2005; Greco y col., 2005; Lebert y col. 2007). Con el incremento en el uso del envasado al vacío para estos productos, las bacterias lácticas encuentran condiciones favorables para su desarrollo, ya que pueden crecer en atmósferas microaerófilas y anaeróbicas, toleran los pH bajos, la presencia de sal y sales de curado (Reuter, 1981; Egan, 1983) convirtiéndose de esta manera en el grupo dominante.

La figura 39 muestra el efecto de la interacción del recubrimiento antimicrobiano sobre las UFC de muestras de salchicha inoculadas con los tres microorganismos sensibles, evaluando la población de bacterias lácticas. En la gráfica se observa que la curva de crecimiento del recubrimiento antimicrobiano con la combinación de enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL) (color verde) mostró un valor de un ciclo logarítmico por debajo de la del control al inicio del almacenamiento. Posteriormente, en los demás días de almacenamiento se mantuvo constante, con una población de medio ciclo logarítmico por debajo del control hasta el día 26 de almacenamiento. A continuación se aprecia una disminución en la población microbiana, alcanzándose valores de 1.5 ciclos logarítmicos por debajo del control. Con respecto al tratamiento con la pediocina individual (color azul), éste produjo una curva de crecimiento muy similar a la del control, aunque manteniendo valores medio

ciclo logarítmico por debajo de éste. Mientras, el tratamiento con la enterocina individual (color amarillo) presentó un comportamiento muy similar al de los otros dos tratamientos, excepto en el día 5 y 26 en los que se puede apreciar un efecto antagonista (ya que se presentó una disminución de la población en el tratamiento con el recubrimiento con la enterocina individual en comparación con el tratamiento con el recubrimiento con la combinación de enterocina 29/pediocina 133).

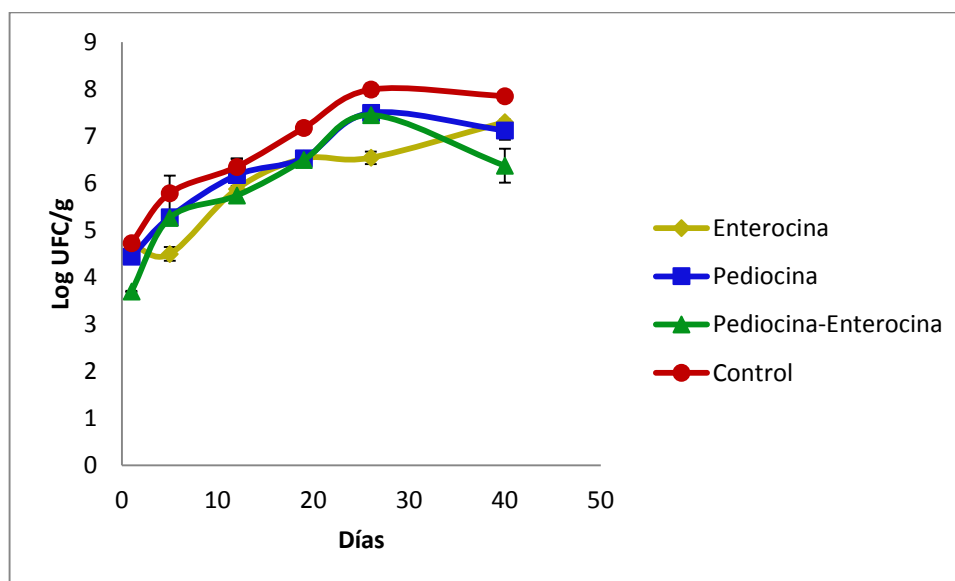


Figura 39. Efecto de la interacción del recubrimiento antimicrobiano sobre las UFC de BAL de las muestras de salchicha inoculadas con los tres microorganismos sensibles almacenadas durante 40 días a 4 y 10 °C

6.8.3. Análisis de la microbiota presente en la salchicha tratada con el recubrimiento antimicrobiano

Las salchichas, siendo un producto cárnico cocido, poseen una composición microbiana variada. Entre los microorganismos más importantes se encuentran bacterias lácticas como *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus* y *Leuconostoc mesenteroides* (Dykes y col., 1995), además de diferentes tipos de bacterias como *Lactobacillus spp*, *B. thermosphacta*, *Leuconostoc spp*, *Weissella viridescens* y *Carnobacterium divergens* (Makela y Korkeala, 1992; Borch y col., 1996; Bjorkroth y Korkeala, 1996; Franz y Von Holy, 1996; Samelis y col., 2000) algunas de estas bacterias son asociadas con el deterioro de productos cárnicos refrigerados causando defectos como sabor amargo, olores desagradables, decoloración,

producción de gas, producción de limo y disminución de pH afectando así la calidad del producto cárnico. Otras bacterias, como algunas de la familia *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Shewanella putrefaciens* y, ocasionalmente, levaduras (Holley y Mckellar, 1996) se han encontrado en productos cárnicos en almacenamiento. Se ha confirmado *Aerococcus viridans* y *Carnobacterium viridans* causan el color verdoso en productos cárnicos (Peirson y col., 2003).

El objetivo de esta parte del proyecto fue el análisis de la interacción de la microbiota presente (evaluando la presencia o ausencia de los microorganismos en todos los días de almacenamiento) en la salchicha tipo Viena inoculada con los microorganismos sensibles seleccionados y tratada con un recubrimiento antimicrobiano a base de APSL adicionado con una mezcla de bacteriocinas, dada la importancia de la microbiota acompañante en la calidad de productos cárnicos.

6.8.3.1. Extracción de ADN

Se realizó la toma de las muestras de salchichas inoculadas con los microorganismos sensibles los días 1, 19 y 40, para la extracción de ADN total, de acuerdo a lo descrito en el inciso 5.12.2.1 y siguiendo el protocolo del Kit “Wizard Genomic DNA Purification Kit”. Una vez obtenido el ADN, se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (figura 40). En el primer carril de izquierda a derecha se encuentra el marcador de peso molecular de concentración conocida, las bandas de abajo hacia arriba son de 100 pb (5 ng) hasta 1500 pb (45 ng), en los siguientes carriles se cargaron dos muestras del día 19 con los tratamientos pediocina 133 (2000 UA/mL) (P19) y enterocina 29 (2000 UA/mL) (E19). En los últimos carriles se encuentran los 4 tratamientos del día 1 que son control (C), enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL) (EP1), pediocina 133 (2000 UA/mL) (P1) y enterocina 29 (2000 UA/mL) (E1). En todos los casos se puede observar las bandas de ADN bien definidas, con una masa molecular suficiente para proceder a la amplificación por el método de PCR del fragmento del gen que codifica el ARNr 16S.

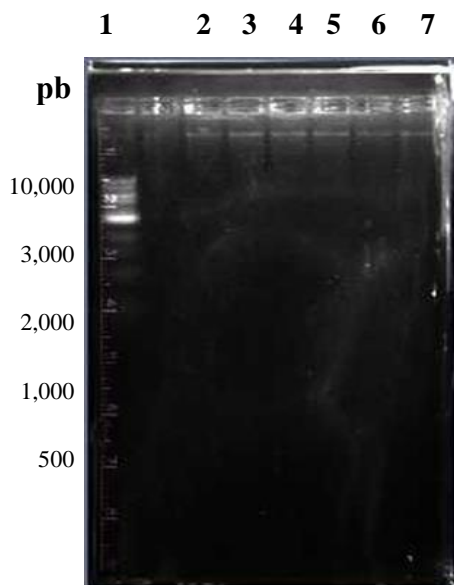


Figura40. Gel de electroforesis de la extracción de ADN, Carril 1, marcador 1 kb Promega®; Carril 2, recubrimiento con pediocina 133 (2000 UA/mL) día 19; Carril 3, recubrimiento con enterocina 29 (2000 UA/mL) día 19; Carril 4, Control día 1; Carril 5, recubrimiento con enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000 UA/mL) día 1; Carril 6, recubrimiento con pediocina 133 (2000 UA/mL) día 1; Carril 7, recubrimiento con enterocina 29 (2000 UA/mL) día 1.

6.8.3.2. Cuantificación de ADN

Una vez que se obtuvo ADN de todas las muestras se procedió a la cuantificación del mismo, la tabla 15 muestra la cuantificación de ADN de todos los tratamientos y el control, en los días 1 y 19 se obtuvo alrededor de $1 \mu\text{g/mL}$, en el día 40 se obtuvo más de $1 \mu\text{g/mL}$ en todos los casos, se obtuvieron lecturas de las muestras a 230, 260, 280 y 340 nm, debido a que los ácidos nucleicos se detectan a una longitud de onda de 260 nm, mientras las proteínas absorben la luz a una longitud de onda de 280 nm, por lo que una relación $260/280$ para una extracción libre de impurezas es alrededor de 1.8 a 2, la relación obtenida para el ADN obtenido esta entre 1 y 1.5, lo cual indica impurezas de naturaleza proteica en el extracto de ADN, también se obtuvo la relación de absorbancia $260/230$, la cual se utiliza para determinar la pureza de ADN, puesto que a 230 nm, se detecta la máxima absorbancia de sales presentes en la extracción, como carbohidratos y otros posibles contaminantes siendo puro con valores menores a 1.5, si los valores se acercan a 2 existe contaminación, los valores obtenidos en los días 1 y 19 no muestran contaminación de este tipo, a excepción del tratamiento E/P del día 19, los tratamientos del día 40 mostraron valores ligeramente arriba

de 1.5. Cabe señalar que los valores obtenidos a la absorbancia de 340, fueron cercanos a 0 lo que indica que las muestras no tenían la presencia de algún solvente.

Tabla 15. Cuantificación de ADN obtenido de muestras de salchichas inoculadas con *Weisella viridescens*, *Brochothrix thermosphacta* y *Listeria innocua*, tratadas con el recubrimiento antimicrobiano y almacenada durante 40 días a 4 y 10 ° C.

	Día 1				Día 19				Día 40			
	E	P	E/P	C	E	P	E/P	C	E	P	E/P	C
ADN (µg/mL)	1.0	1.0	1.1	1.0	1.1	1.1	0.9	0.8	1.2	1.4	2.4	2.3
Absorbancias (nm)												
230	0.022	0.027	0.024	0.026	0.029	0.013	0.006	0.001	0.012	0.01	0.029	0.026
260	0.019	0.020	0.021	0.020	0.022	0.022	0.019	0.017	0.023	0.028	0.048	0.045
280	0.013	0.014	0.014	0.013	0.015	0.020	0.017	0.016	0.023	0.026	0.048	0.047
340	0.007	0.006	0.006	0.006	0.008	0.012	0.009	0.008	0.013	0.017	0.043	0.043
260/280	1.5	1.45	1.54	1.58	1.49	1.09	1.08	1.04	1.01	1.07	1.0	0.97
260/230	0.87	0.74	0.87	0.78	0.76	1.09	3.011		1.96	1.97	1.68	1.72

E enterocina 29 (2000 UA/mL); P pediocina 133 (2000 UA/mL) E/P enterocina-pediocina (20000-2000) UA/mL; C control;

6.8.3.3. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo de acuerdo al inciso 5.12.2.2, con un volumen final de la reacción de 50 µL y 100 ng de ADN. El producto de PCR se mantuvo en refrigeración hasta su uso. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 0.8 %, a 80 V durante 60 minutos.

La figura 41 muestra los geles obtenidos con las muestras de producto de PCR. En la primera figura, de izquierda a derecha, se observan los tratamientos del día 19 (pediocina 133 (2000), enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000) y el control) y los tratamientos del día 40 (enterocina 29 (2000), pediocina 133 (2000), enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000) y el control). De acuerdo al marcador de peso molecular, todas las bandas obtenidas tienen un tamaño de entre 400 a 500 pb. En la siguiente figura se observan los tratamientos del día 1 (enterocina 29 (2000), pediocina 133 (2000), enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000) y el control).

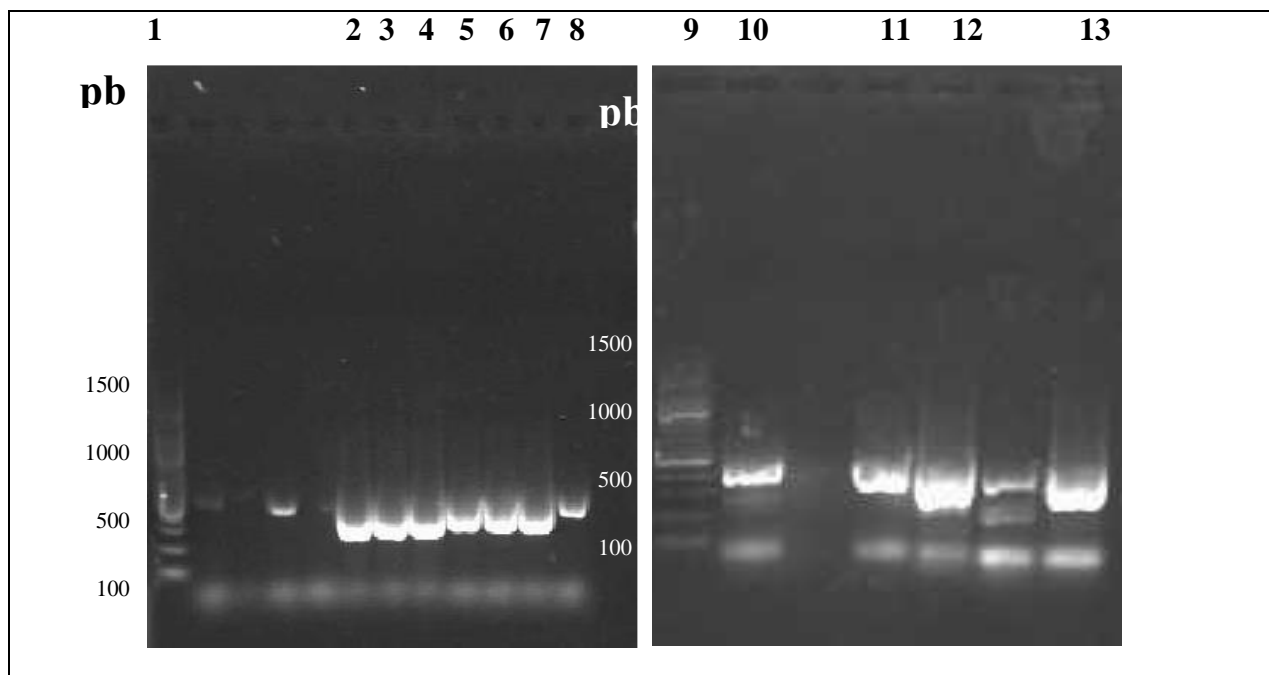


Figura 41. Productos de PCR del fragmento de los genes que codifican el ARNr 16S, CCarriles 1 y 9, marcador de 100 bp, Promega®; Carriles 2-4 tratamientos del día 19 pediocina 133, enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000) y el control; Carriles 5-8 tratamientos del día 40 enterocina 29, pediocina 133, enterocina 29/pediocina 133 y el control; Carriles 10-13 tratamientos del día 1 enterocina 29, pediocina 133, enterocina 29/pediocina 133 y el control.

6.8.3.4. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante

La corrida electroforética fue llevada a cabo en un gel de poliacrilamida al 40 %, a una temperatura uniforme de 60 ° C, 85 volts y con un gradiente de desnaturalización de 40-60% formado por dos soluciones desnaturalizantes de (100 y 0 %). En la figura 40 se muestra el gel de DGGE. De izquierda a derecha se encuentran los tratamientos del día 1 Carril 1: enterocina 29 (2000); Carril 2: pediocina 133 (2000); Carril 3: enterocina 29/pediocina 133 (2000); Carril 4: Control. En estos cuatro tratamientos se observa que el control tiene mayor contenido de bandas: cada banda corresponde a un microorganismo diferente. En los tratamientos del día 19 (enterocina 29 (2000), pediocina 133 (2000), enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000) y el control). En este día ya hay una mayor diferencia en el número de bandas con respecto al día 1: se observa que el tratamiento con menos bandas es el de enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000). La ausencia de microorganismos en esta muestra confirmaría el efecto del tratamiento. Puede observarse también que el tratamiento con enterocina 29 (2000) provoca la aparición de un numero de bandas muy semejante al control, lo que concordará con el análisis microbiológico de cuenta en placa de los microorganismos

sensibles (este tratamiento tuvo menos efecto inhibitorio que la pediocina 133 (2000) para los tres microorganismos sensibles). Los últimos carriles corresponden al día 40 (enterocina 29 (2000), pediocina 133 (2000), enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000) y el control). En estos tratamientos se observan bandas que se han conservado desde el día 1, mientras que en el control aparecen bandas que no existían al inicio. El tratamiento con la combinación enterocina 29/pediocina 133 (2000-2000) mantiene las bandas que aparecían en el día 19, aunque hay una diferencia notoria entre la ubicación y el número de bandas de los días 1 y 40. Se procedió al corte de las bandas más definidas y separadas, para re-amplificar utilizando los mismos primers, posteriormente purificar y secuenciar.

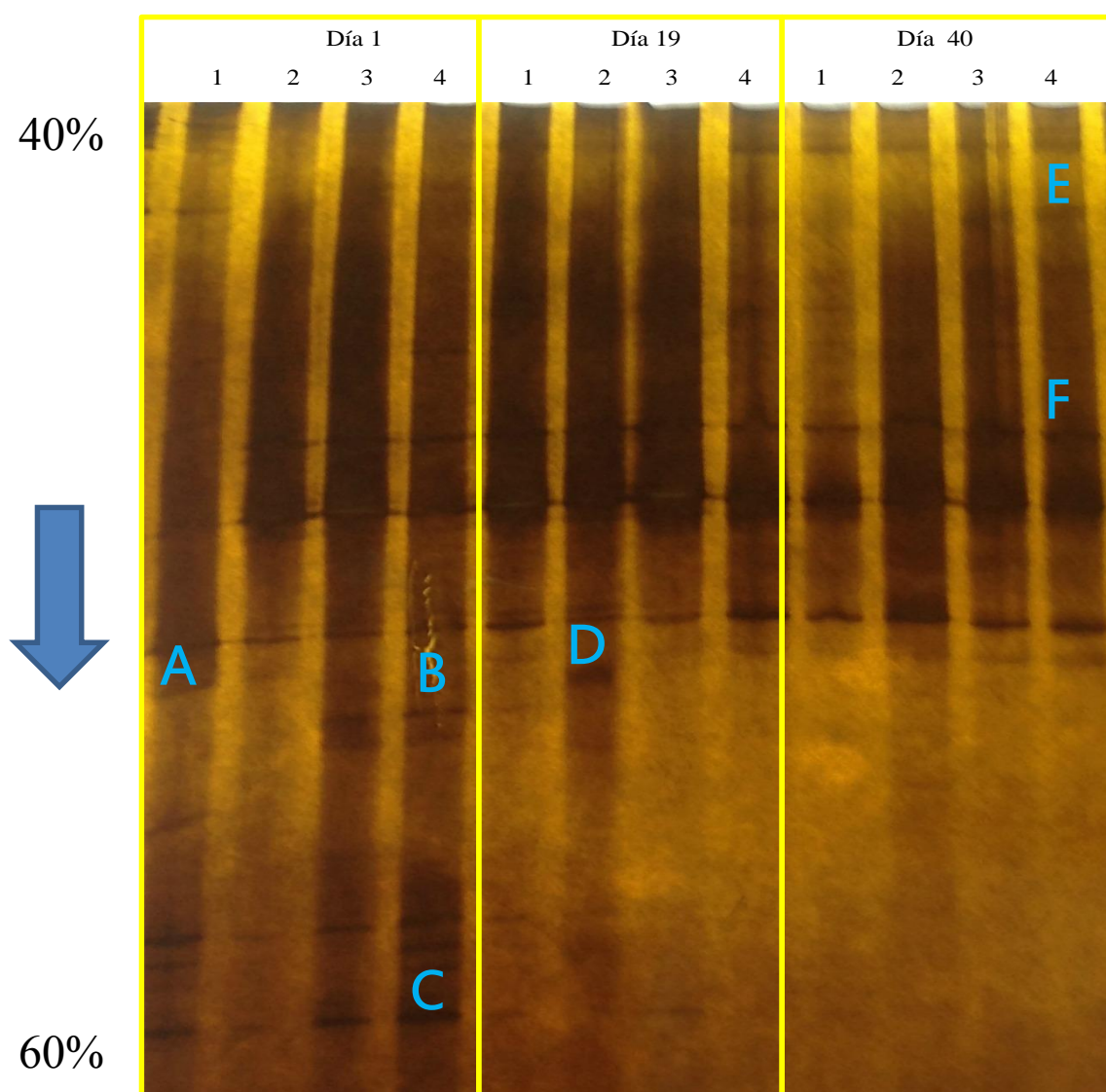


Figura 42. Gel de DGGE del ADN amplificado, Carril 1: enterocina 29 (2000); Carril 2: pediocina 133 (2000); Carril 3: enterocina 29/pediocina 133 (2000); Carril 4: Control

Se cortaron las bandas y se etiquetaron con una letra correspondiente al carril y un número correspondiente a la posición de la banda en el carril. A continuación se procedió a la elución del ADN de acuerdo a lo descrito en el inciso 5.12.2.3.1.3. Con el ADN eluido se realizó una amplificación de ADN correspondiente al gen que codifica el ARNr 16S, utilizando los mismos primers usados en la primera amplificación, de acuerdo al inciso 5.12.2.2.

6.8.3.5. Electroforesis de productos del PCR de reamplificación

La figura 41 muestra el gel de electroforesis de los productos de PCR del ADN eluido de las bandas de DGGE. Se observan bandas con un tamaño aproximado de 400 pb, adecuado para tener una secuencia confiable.

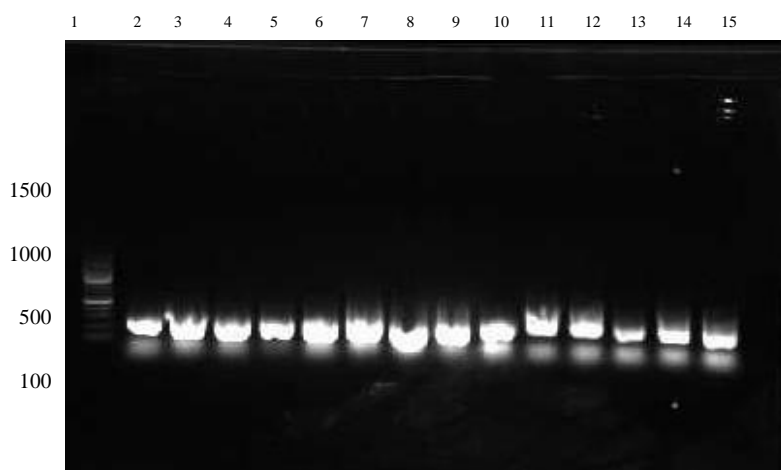


Figura 36. Gel de electroforesis de los productos de PCR obtenidos del ADN eluido de las bandas del gel de DGGE, Carril 1, marcador de peso molecular; Carriles 2-6, Columna A, bandas 1-5; Carriles 7-10, Columna D, bandas 1-4; Carril 11, Columna F, banda 1; Carriles 12-14, Columna L, bandas 1-3; Carril 15, Columna F, banda 1.

6.8.3.6. Secuencias de ADN

La tabla 16 muestra los microorganismos con mayor porcentaje de similitud encontrados para las secuencias obtenidas del ARNr 16S de las muestras de salchichas inoculadas con los microorganismos sensibles y tratadas con el recubrimiento antimicrobiano. Como se puede apreciar, todos los microorganismos con alto porcentaje de similitud son bacterias

lácticas, lo que concuerda con los resultados del análisis microbiológico (con valores en UFC/g mucho más altos para éstas que para los microorganismos sensibles). No se encontró ninguna similitud con los microorganismos sensibles utilizados.

Tabla 16. Microorganismos con mayor porcentaje de similitud de las secuencias obtenidas.

Banda	Descripción	Cobertura	E	identidad
		%		%
D	Lactobacillus sakei strain IMAU94189	86	0.0	99
E	Carnobacterium maltaromaticum LMA 28	84	3 e -89	97
C	Lactobacillus curvatus 16 s ribosomal RNA gene	88	5 e -115	96
B	Lactobacillus sakei strain A 156 16 s	98	6 e -94	93
A	Lactobacillus sakei strain MN1 16 S	94	3 e -163	100
F	Lactobacillus sakei strain LB 49 16 S	88	2 e -160	100

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

6.8.3.7. Análisis y comparación de las secuencias

La figura 43 muestra los microorganismos con mayor porcentaje de similitud y a que banda corresponden, se observa que *Carnobacterium* se encuentra en el primer día de almacenamiento en la muestra que corresponde a enterocina 29 (2000) y al final del almacenamiento (bien definida en el control y un poco difusa en el tratamiento de la combinación enterocina 29 (2000)/pediocina 133 (2000)), mientras que *Lactobacillus sakei*, se encuentra presente en todos los tratamientos durante todos los días de almacenamiento y *Lactobacillus curvati* sólo se encuentra en el día 1 de todos los tratamientos.

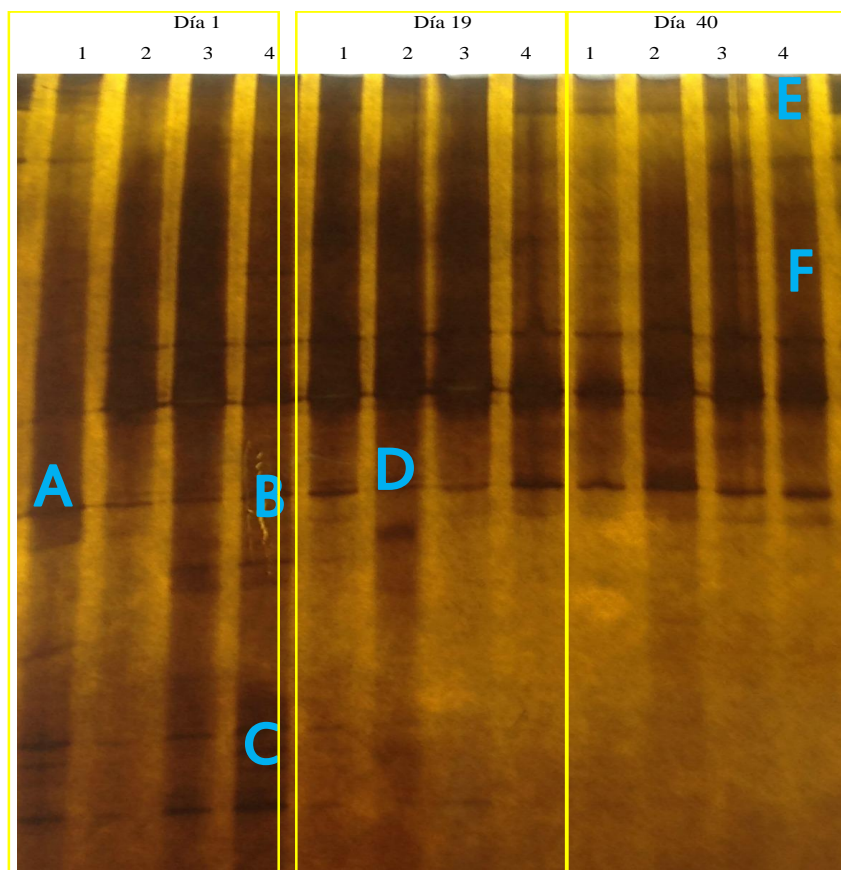


Figura 44. Gel de DGGE del ADN amplificado. Carril 1: enterocina 29 (2000); Carril 2: pediocina 133 (2000); Carril 3: enterocina 29/pediocina 133 (2000); Carril 4: Control

7. CONCLUSIONES

Se encontró un efecto sinérgico en la combinación pediocina 133-enterocina 29 (500-2000 UA/mL) y (1000-2000 UA/mL) contra *Listeria innocua*. Por otra parte *Weissella viridescens* fue sensible en todos los tratamientos.

El recubrimiento de APSL con la combinación pediocina-enterocina, controló el crecimiento microbiano en una salchicha tipo viena, durante 26 días de almacenaje en abuso de temperatura.

Mediante la técnica de DGGE se demostró la presencia de 4 cepas de bacterias ácido lácticas, además se observó la inhibición de *Lactobacillus* sp a partir del día 19.

8. PERSPECTIVAS

En la industria alimentaria hay una creciente necesidad de reducir pérdidas por contaminación del producto, lo que ha favorecido al desarrollo de la tecnología del envasado, buscando satisfacer la demanda de seguridad alimentaria, la evaluación de la combinación de las bacteriocinas y posterior incorporación a un recubrimiento biodegradable, es una contribución a este fin, en el desarrollo de la bioconservación alimentaria. Una desventaja en la utilización de bacteriocinas es su producción, ya que el rendimiento es muy bajo, por lo que se decidió en este ensayo utilizar el extracto crudo, obteniendo buenos resultados.

9. REFERENCIAS

- Akkaya, L., Cetinkaya, Z., Alisarli, M., Telli, R., Gök, V., 2008. The prevalence of *E. coli* O157/O157:H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. on bovine carcasses in Turkey. *Journal of Muscle Foods* 19: 420–429.
- Aymerich, T., Garriga, M., Ylla, J., Valler, J., Monfort, J.M., Hugas, M. 2000. Application of enterocinas as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *Journal of Food Protection* 53:721-726.
- Bernbom, N., Jelle, B., Brogren, C.H., Vogensen, F.K., Norrung, B. 2009. Pediocin PA-1 and a pediocin producing *Lactobacillus plantarum* strain do not change the HMA rat microbiota. *International Journal Food Microbiology* 130(3): 251-257
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal Applied Bacteriology* 70:25-30.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. y Kalchayanad, N. 1991. Mode of action of *pediocin AcH* on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 25–33.
- Bierbaum, G., Sahl, H.G. 2009. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10:2-18.
- Bjorkroth, J., Korkeala, H. 1996. rRNA gene restriction patterns as a characterization tool for *Lactobacillus sake* strains producing ropy slime. *International Journal of Food Microbiology* 30: 293–302.
- Blanno, M.L. 2005. La emulsión cárnica en la elaboración de salchicha viena. *Mundo Lácteo y Cárnico* 4–8.
- Bohaychuk, V.M., Gensler, G.E., King, R.K., Manninen, K.I., Sorensen, O., Wu, J.T., Stiles, M.E., McMullen, L.M. 2006. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. 69: 2176–2182.
- Borch, E., Kant-Muemansb, M.L., Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat products and cured meat. *International Journal of Food Microbiology* 28, 89–100.
- Botsoglou, N.A., Grigoropoulou, S.M., Botsoglou, E., Govaris, A., Papageorgiou, G., 2003. The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science* 65, 1193–1200.

-
- Brody, A. L., Bugusu, B., Han, J. H., Sand, C. K., McHugh, T. H. 2008. Innovative food packaging solutions. *Journal of Food Science* 73(8), R107–R116.
 - 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. *Journal of Food Science* 66 (6) pp. 865–870
 - Callewaert, R., Hugas, M., De Vuyst L. 2000. Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of spanish-style dry fermented sausages. *International Journal Food Microbiology*. 57:33–42
 - Cañas Urbina, A., Pérez Alonso, A., Morales, H., Saucedo, I., Fernández, L., Castillo, R., Santiago Cruz, V. 2000. Bacterias patógenas más comunes en los productos cárnicos: características y métodos para su control. *Industria Alimentaria*. Septiembre-Octubre 40–49.
 - Chen, H., and Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2:82-100.
 - Chen, Y., Shapira, R., Eisenstein, M., Montville, T.J. 1997. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Applied Environmental Microbiology* 63, 524^531.
 - Chikindas M.L, Chi-Zhang Y., Yam K.L. 2004. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *International Journal of Food Microbiology* 90: 15–22
 - Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Havarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces Enterocin L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *Journal of Bacteriology* 182:6806-6814.
 - Cintas, L.M., Casaus, M.P., Heranz, C., Nes, I.P., Hernández, P.E. 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science Technology International*. 7(4):281-305.
 - Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71:1-20
 - Cocolin, L., Foschino, R., Comi, G., Fortina, M.G. 2007. Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiology* 24, 752-758.

-
- Cogan, T.M. 1996. History and Taxonomy of Starter Cultures. Edited by T.M. Cogan and J.P. Accolas (Wiley. VCH Inc., New York) pp. 1-25.
 - Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C. 2005. Characterization of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science* 69: 381–392.
 - Collins-Thompson, D.L., Rodriguez-Lopez, G. 1980. Influence of sodium nitrite, temperature, and lactic acid bacteria on the growth of *Brochothrix thermosphacta* under anaerobic conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 26 (12):1416-21.
 - Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Feresu, S., Jones, D. 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 10.1099/00207713-37-4-310
 - Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, S., Wallbanks, S. 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal Applied Bacteriology* 75:595-603.
 - Coma, V. 2008. Perspectives for the active packaging of meat products. En: L. M. L. Nollet, & F. Toldrá (Eds.), advanced technologies for meat processing. Boca Raton: Taylor & Francis, pp. 452–469.
 - Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C., Cocolin, L., 2005. Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science* 69, 381–392.
 - Comi, G., Iacumin, L. 2012. Identification and process origin of bacteria responsible for cavities and volatile offflavour compounds in artisan cooked ham. *International Journal Food Science Technology* 47: 114-121
 - Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. 2013. Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics?. *Nature Microbiology Reviews* 11: 95-105.
 - Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. 2005. Bacteriocin: developing innate immunity for food. *Nature Microbiology Reviews* 3: 777-788.
 - Degnan, A. J., Buyong, N., Luchansky, J. B. 1993. Anti-listerial activity of *pediocin AcH* in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. *International Journal of Food Microbiology* 18: 127–138.
 - Desriac, F., Defer, D., Bourgoignon, N., Brillet, B., Le Chevalier, P. 2010. Bacteriocin as Weapons in the Marine Animal-Associated Bacteria Warfare: Inventory and Potential Applications as an Aquaculture Probiotic. *Marine Drugs* 8: 1153–1177.

-
- Díaz, R.G., Wachter, R.C. 2003. Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 45: 1–2.
 - Diep, D.B. Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., Nes, I.F. 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* USA 104: 2384-2389.
 - Difco Laboratories.1998. 11th Edition. Division of Becton Dickinson and Company Sparks, Maryland 21152 USA.
 - Dykes, G.A., Cloete, T.E., von Holy, A. 1995. Taxonomy of lactic acid bacteria associated with vacuum-packed processed meat spoilage by multivariate analysis of cellular fatty acids. *International Journal of Food Microbiology* 28: 89–100.
 - Egan, A. 1983. Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Anton van Leeuwenhoek*. 49:327-336.
 - Eijsink, V., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., Nes, I.F. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 3275–3281.
 - Ercolini, D., Ferrocino, I., Stora, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P., Villani, F. (2010). Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiology* 27 (1): 137-143.
 - Economou T., Pournis N., Ntzimani A., Savvaidis I.N. 2009. Nisin-EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. *Food Chemistry* 114(4):1407–1476
 - Ennahar, E., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*. 24(1):85-106.
 - Farber, J.M., Peterkin, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* 55: 476–511.
 - Falguera, V., Quintero, J.P., Jimenez, A., Munoz, J.A., Ibarz, A., 2011. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology* 22, 292–303.
 - Fontana, C., Vignolo, G., Cocconcelli, P. S. 2005. PCR–DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. *Journal of Microbiological Methods* 63: 254–263.
 - Franz, C.M.A.P., Von Holy, A. 1996. Thermotolerance of meat spoilage lactic acid bacteria and their inactivation in vacuum-packaged Vienna sausages. *International Journal of Food Microbiology*.

-
- Galvez, A., Abriouel, H., Lucas R., Ben, N. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. vol.120, p. 51-70, 2007.
 - Gardner, G.A., Roberts, T.A., Hobbs, G. Christian, N. Skovgaard, JHB. 1981. *Brochothrix thermosphacta (Microbacterium thermosphacta)* in the spoilage of meats: A review: Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity, Academic Press, London.
 - Garvie, E.I. 1986. Genus *Pediococcus* Claussen 1903, 68. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, 2, pp. 1075-1079.
 - Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M., Hugas. M. 2002. Bactericidal synergism through bacteriocinas and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology* 19(5):509-518.
 - Gill, A.O., Holley, R.A. 1998. In vitro evaluation of the effects of nitrite and NaCl on the antimicrobial activity of lysozyme, nisin and EDTA combination treatments. Internal Report, Abbotsford, BC, Canada: Canadian Innovatech.
 - Goff, J.H., Bhunia, A.K., Johnson, M.G. 1996. Complete inhibition of low levels of *Listeria monocytogenes* on refrigerated chicken meat with *pediocin AcH* bound to heat-killed *Pediococcus acidilactici* cells. *Journal of Food Protection* 59: 1187–1192.
 - Gómez-Estaca, A., López de Lacey, A., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillen, M.C., Montero, P. 2010. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology* 27:889–896.
 - Gonzalez, C. F., Kunka, B. S. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Applied Environmental Microbiology* 53:2534-2538.
 - Greco, M., Mazzette, R., De Santis, E., Corona, A., Cosseddu, A. 2005. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. *Meat Science* 69:733–739.
 - Guerra, N.P., Rua, L.M., Pastrana, L. 2001. Nutricional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *International Journal of Food Microbiology* 70:267-281.
 - Guerra, N.P., Pastrana, L. 2002. Modelling the influence of pH on the kinetics of both nisin and pediocin production and characterization of their functional properties. *Process Biochemistry* 37: 1005–1015.
 - Han, J.H., Gennadios, A. 2005. Edible films and coatings: a review. San Diego: Elsevier Academic Press. *Innovations in food packaging* 239-262.

- Harris, L.J., Fleming, H.P., Klaenhammer, T.R., 1991. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to nisin. *Journal of Food Protection* 54, 836–840.
- Henderson, J.T., Chopko, A.L., Wassenaar, P.D. 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 295: 5–12.
- Holley, R. A., & McKellar, R. C. (1996). Influence of unsliced delicatessen meat freshness upon bacterial growth in subsequently prepared vacuum packed slices. *Food Microbiology* 29, 297–309.
- Hu, H., Moake, M., Worobo, R. 2006. Genetic characterization of antimicrobial peptides. En: Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R.E. (Eds). *Food Biotechnology*. Segunda edición, CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 1379-1478.
- Hu, P., Zhou, G., Xu, X., Li, Ch., Han, Y. 2009. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S Rdna-DGGE. *Food Control* 20, 99-104.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. 2003. Functionality of enterococci in meat products. *International Journal of Food Microbiology* 88:223-233.
- Huis in 't Veld, J.H. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* 33: 1–18.
- Izquierdo, E., Marchioni, E., Aoude-Werner, D., Hasselmann, C., Ennahar, S., 2009. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 26, 16–20.
- Jung, D.S., Bodyfelt, F.W., Daeshel, M.A. 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. *Journal of Dairy Science* 75, 387-393.
- Katla, T., Naterstad, K., Vancanneyt, M., Swings, J., Axelsson, L., 2003. Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin A, pediocin PA-1, and nisin. *Applied Environmental Microbiology* 69, 4431–4437.
- Katla, T., Moretto, T., Sveen, I., Aasen, I. M., Axelsson, L., Rorvik, L. M., Naterstad, K. 2002. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*. *Journal of Applied Microbiology* 93: 191–196.
- Khan, H., Flint, S., Yu, Pak-Lam. 2010. Enterocins in food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 141: 1–10.

-
- Khwaldia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S., Hardy, J. 2004. Milk Proteins for Edible Films and Coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44 (4), 239-251.
 - Kilincceker, O., Dogan, I.S., Kucukoner, E. 2009. Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. *Food Science and Technology* 42:868-873.
 - Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS. Microbiology Review* 12:39-86.
 - Ko, S., Janes, M., Hettiarachchy, N.S., Johnson, M., 2001. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science* 66 (7) 1006–1021.
 - Koort, J., Coenye, T., Santos, E.M., Molinero, C., Jaime, I., Rovira, J., Vandamme, P., Björkroth, J. 2006. Diversity of *Weissella viridescens* strains associated with “Morcilla de Burgos”. *International Journal of Food Microbiology* 109: 164–168.
 - Kilincceker, O., Dogan, I.S., Kucukoner, E. 2009. Effect of edible coatings on the quality of frozen fish fillets. *Food Science and Technology*. 42:868-873.
 - Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Lebert, A., Chacornac, J. P., Bover-Cid. 2007. Diversity of micro-organisms in environments and dry fermented sausages of French traditional small units. *Meat Science*. 76:112–122.
 - Lee, K.T. 2010. Quality and safety aspects of meat products as affected by various physical manipulations of packaging materials. *Meat Science* 86: 138–150.
 - Leistner, L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal Food Microbiology* 55, 181–186.
 - Lindsay, R. C. 2010. Aditivos alimentares. Química de Alimentos de Fennema. In S. Damodaran, K. L. Parkin, & O. R. Fennema (Eds.), Porto Alegre: Artmed. pp. 537–584
 - Liu, L., O'Conner, P., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2008. Controlling *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1059–1066.
 - London, J., Chace, N.M. 1976. Aldolases of lactic acid bacteria Demonstration of immunological relationships among eight genera of gram positive bacteria using an antipediococcal aldolase serum. *Archives of Microbiology*, 110. 121-128.
 - Lozano Nieto, J.C., Meyer, J.N., Sletten, K., Pelaz, C., Nes, I.F. 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of General Microbiology* 138:1985-1990.

-
- Lu, S., Xu, X., Zhou, G., Zhu, Z., Meng, Y., Sun, Yuanming. 2010. Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. *Food Control* 21, 444–449.
 - MacFaddin, J. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
 - Makela, P. M., & Korkeala, H. G. (1992). Survival ofropy slime-producing lactic acid bacteria in heat processes used in the meat industry. *Meat Science*, 31, 463–471.
 - Marcos, B., Aymerich, T., Monfort, J. M., Garriga, M. 2007. Use of antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *Food Microbiology* 120 : 152-158.
 - Marcos, B., Aymerich, T., Monfort, J.M., Garriga, M., 2008. High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *Food Microbiology* 25:177–182.
 - Marcos, B., Aymerich, T., Garriga, M., Arnau, J. 2013. Active packaging containing nisin and high pressure processing as post-processing listericidal treatments for convenience fermented sausages. *Food Control* 30: 325-330.
 - Martin, N.I., Breukink, E. 2007. Expanding role of lipid II as a target for lantibiotics. *Future Microbiology* 2: 513-525.
 - Mattila, K., Saris, P., Työppönen, S. 2003. Survival of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked sausage after treatment with pediocin AcH. *International Journal of Food Microbiology* 89: 281–286.
 - Milbourne, K. 1983. Thermal tolerance of *Lactobacillus viridescens* in ham. *Meat Science* 9: 113–119.
 - Ming, X., Daeschel, M.A.1993. Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection* 56: 944–948.
 - Moharem, A.S., Charith Raj, A.P., Janardhana, G.R., 2007. Incidence of *Listeria* species in seafood products of Mysore, India. *Journal of Food Safety* 27: 362–372.
 - Molinos, A.C., Abriouel, H., López, R.L., Valdivia, E., Ben Omar N., Gálvez, A. 2008. Combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 for inactivation of Gram-negative bacteria in soybean sprouts. *Food and Chemical Toxicology* 46: 2912-2921.
 - Montville T.J., Chen Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50: 511–519.

-
- Murillo Martínez, M.M. 2008. Evaluación de Propiedades Físicoquímicas y Antimicrobianas de Películas Comestibles Adicionadas con Nisina y/o Glucosa Oxidasa. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, México.
 - Murray, M., Richard, J. A. 1997. Comparative study of the antilisterial activity of nisin A and pediocin AcH in fresh ground pork stored aerobically at 5 C. *Journal of Food Protection* 60: 1534–1540.
 - Myers, R., Maniatis, T., Lerman, L. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 155: 501–527.
 - Naidu, A.S., Unal, R., Tulpinski, J. 2006. Bacteriocins: antimicrobial activity and applications. En: Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R.E. (Eds). *Food Biotechnology*. Segunda edición. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp. 1391-1437.
 - Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B. 1996. *Anton van Leeuwenhoek*. 70:113-128.
 - NMX-F-065-1984. Alimentos. Salchichas. Especificaciones. Foods. Sausage. Specifications. Normas Mexicanas. Dirección General de NORMAS.
 - NOM-092-SSA1-1994, NORMA Oficial Mexicana, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
 - NOM-110-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
 - NOM-194-SSA1-2004, NORMA Oficial Mexicana, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
 - NOM-213-SSA1-2002, Norma Oficial Mexicana, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
 - O'Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C. 2002. Potential of bacteriocins producing lactic acid bacteria for improvement in food safety and quality. *Biochimie*. 84: 593-604.
 - Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., Lacroix, M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5598–5605.
 - Peirson, M. D., Guan, T. Y., & Holley, R. A. (2003). Aerococci and carnobacteria cause discoloration in cooked cured bologna. *Food Microbiology* 20, 149–158.

-
- Quintavalla, S., Vicini, L., 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* 62: 373–380.
 - Ramos-García, M. L., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. 2010. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(1), 44-77.
 - Ramos, O. L., Santos, A. C., Leao, M. V., Pereira, J. O., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Franco, M. I., Pintado, 465 M. E., & Malcata, F. X. (2012). Antimicrobial activity of edible coatings prepared from whey 466 protein isolate and formulated with various antimicrobial agents. *International Dairy Journal* 467 25(2), 132-141.
 - Rasch, M., Knøchel, S. 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. *Letter Applied Microbiology* 27:275-278.
 - Reuter, G. 1981. Elective and selective media for lactic acid bacteria. *International Journal Food Microbiology* 2:55-58. 1985.
 - Rocourt, J., P. Cossart, 1997 *Listeria monocytogenes*, En: MP Doyle, LR Beuchat, MJ Montville (Eds.). *Food microbiology, fundamentals and frontiers*, ASM Press, Washington, DC (1997), pp. 337–352.
 - Sabia, C., de Niederhäusern, S., Messi, P., Manicardi, G., Bondi, M., 2003. Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages (“cacciatore”). *International Journal Food Microbiology* 87, 173–179.
 - Sahl, H.G., Jack, R.W., Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *European Journal of Biochemistry* 230: 827–853.
 - Samelis, J., Kakouri, A., & Rementzia, J. (2000). Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 °C. *Food Microbiology* 17, 329–340.
 - Sanguinety, C.J., Días N., Simpson A.J.G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-919.
 - Sangsuwan, J., Rattanapanone, N., Auras, R.A., Harte B.R., Rachtanapun, P. 2009. Factors affecting migration of vanillin from chitosan/methyl cellulose films. *Journal of Food Science* 74: 549–555.
 - Santos, E.M., Jaime, I., Rovira, J., Lyhs, U., Korkeala, H., Björkroth, J. 2005. Characterization and identification of lactic acid bacteria in “morcilla de Burgos”. *International Journal of Food Microbiology* 95: 285–296.

-
- Schillinger, U., Lucke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1901-1906.
 - Schillinger, U., and F. Karl-Lücke. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55:1901–1906.
 - Shawanda, W.S., Kalli, A., Hakansson, J.K., Orugunty R.S., Leif, S. 2009. Oxidation of Lanthionines Renders the Lantibiotic Nisin Inactive. *Applied and Environmental Microbiology* 75:1381.
 - Stiles, M. E., Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1–29.
 - Uhart, M., Ravishankar, S. & Maks, N. D. 2004. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials on beef franks stored at 4 ° C. *Journal Food Protection* 67, 2296–2301.
 - Uteng, M., Hauge, H.H., Markwick, P.R., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J., Muhle-Goll, C. 2003. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry* 42: 11417–11426.
 - Walker, P.A., Knabel, S.J., Hartman P.A., Mendonca A.F. 1990. Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurization. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 370–376.
 - Yassi, A., Kjellström, T., Kok, T., Guidotti, T.L. 2002. Salud Ambiental Básica. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Primera edición. México. pp 319-371.
 - Zacharof, M.P., Lovitt, R.W., 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria A Review Article. *SciVerse Science Direct* 2 : 50-56
 - Zivanovic, S., Chi, S., Draughon, A.F. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science* 70: M45–M51.
 - Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., Hamida, J.B. 2010. A new structure-based classification of gram-positive bacteriocinas. *Protein Journal*. 29(6):432-439.

10.ANEXOS

Anexo A. Medios de cultivos utilizados

Medio caldo caseína-glucosa (CGB) para el cultivo de *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Pediococcus acidilactici* MXVK133

Tabla A1. Componentes de la formulación del medio CCG

compuesto	gramos por litro
Peptona biotriptasa	20
Glucosa	10
Extracto de levadura	5
Citrato de amonio	2
Fosfato di sódico	2
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Tween 80	1 ml
pH	7

Medio KF

La cepa *Enterococcus faecium* MXVK 29 se sembró por estría en agar selectivo KF, La peptona ptoteosa es una peptona mixta de alta calidad nutritiva y el extracto de levadura proporcionan la fuente de nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos exigentes. La azida de sodio inhibe flora Gram negativa. La maltosa y lactosa son utilizadas por la mayoría de loa Enterococos como fuente de energía con formación de ácido, éste se manifiesta por el vire a amarillo del indicador púrpura de bromocresol. Los Enterococos reducen el TTC (2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio) produciendo un formazano rojo y se observan por lo tanto colorias de color rojo.

Tabla A2. Componentes de la formulación del medio KF

compuesto	gramos por litro
Peptona biotriptasa	20
Glucosa	10
Extracto de levadura	5
Citrato de amonio	2
Fosfato di sódico	2
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Tween 80	1 ml
pH	7

Enfriar aproximadamente a 45°C y en condiciones de esterilidad agregar por microfiltración 1 ml de solución al 1% de TTC. Homogeneizar y vaciar en cajas de Petri estériles. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

Caldo de Soya Trypticaseína

El caldo de soya tripticaseína provee un excelente soporte de crecimiento para una amplia variedad de microorganismos. En este medio las peptonas proveen la fuente de nitrógeno. La dextrosa provee la fuente de carbohidratos. El cloruro de sodio tiene su función en el balance osmótico. El fosfato dipotásico actúa como buffer.

Tabla A2. Componentes de la formulación del caldo TSB

compuesto	gramos por litro
Peptona de caseína	17.0
Peptona de soya	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	2.5
pH	7.3 ± 0.2

Se suspendieron 30 g del medio en un litro de agua purificada, se calentó con agitación. Se esterilizó en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Agar de acetato de talio y estreptomicina (STAA)
Tabla A3. Componentes de la formulación del caldo STAA

compuesto	gramos por litro
Peptona de carne	20.0
Extracto de levadura	2.0
Fosfato dipotásico	1.0
Sulfato de magnesio	1.0
Agar	15
Glicerol	7.5
“Suplemento selectivo”	
Sulfato de estreptomicina	0.5
Acetato de talio	0.05
Cicloheximida	0.05

Esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Enfriar hasta 50°C y agregar, en condiciones de asepsia, el suplemento selectivo formado por: sulfato de estreptomicina al 5%, cicloheximida al 0,5% y acetato de talio al 0,5%, todas ellas esterilizadas por filtración.

Agar para crecimiento de *Weissella viridiscens* APT

Se utiliza para el cultivo de *Lactobacillus viridiscens* utilizado para cultivar Lactobacilos heterofermentativos y otros organismos que requieren alto contenido de tiamina.

Tabla A4. Componentes del agar APT

compuesto	gramos por litro
Extracto de levadura	7.5
Triptona	12.5
Dextrosa	10
Citrato de sodio	5
Clorhidrato de tiamina	0.001
Cloruro de sodio	5
Fosfato dipotásico	5
Cloruro de manganeso	0.14
Sulfato de magnesio	0.8
Sulfato ferroso	0.04
Complejo Sorbitan Monooleate	0.2

Final pH 6.7 ± 0.2

Se esterilizó en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Anexo B. Estadístico del efecto *in vitro* de las combinaciones de las bacteriocinas

ANOVA de valores promedio del cultivo de *Listeria innocua* en absorbencias

Variable dependiente: absorbencias

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo	3.246(a)	25	.130	558.637	.000
Concentración	3.246	25	.130	558.637	.000
Error	.006	25	.000		
Total	3.252	50			

R cuadrado = .998 (R cuadrado corregida = .996)

Comparación de medias de absorbencias por Tukey

absorbencias

Tukey B

concentración	N	Subconjunto				
		2	3	4	5	1
P 2000	2	.1895				
E-P 250/2000	2	.1985	.1985			
E 2000	2	.2030	.2030	.2030		
E-P 500/500	2	.2080	.2080	.2080		
E 1000	2	.2110	.2110	.2110		
E-P 1000/500	2	.2120	.2120	.2120		
E-P 250/1000	2	.2145	.2145	.2145		
E-P 500/1000	2	.2150	.2150	.2150		
E-P 500/250	2	.2170	.2170	.2170		
E-P 500/2000	2	.2220	.2220	.2220		
E-P 2000/1000	2	.2230	.2230	.2230		
E-P 2000/250	2	.2235	.2235	.2235		
E-P 250/250	2	.2240	.2240	.2240		
E-P 250/500	2	.2245	.2245	.2245		
E-P 1000/1000	2	.2260	.2260	.2260		
E-P 2000/500	2	.2270	.2270	.2270		
E-P 1000/250	2	.2275	.2275	.2275		
P 1000	2	.2275	.2275	.2275		
P 500	2	.2340	.2340	.2340	.2340	
E-P 1000/2000	2		.2520	.2520	.2520	
P 250	2		.2525	.2525	.2525	

E 250	2			.2615	.2615	
E 500	2				.2860	
E-P 2000/2000	2				.2880	
Control	2					.6030

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .000.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000

b Alfa = .05.

Análisis de varianza de los parámetros de crecimiento microbiano de *Listeria innocua*

Factor concentración y variable dependiente velocidad máxima

Variable dependiente: velocidad máxima

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo	10.457(a)	25	.418	156.664	.000
Concentración	10.457	25	.418	156.664	.000
Error	.067	25	.003		
Total	10.524	50			

a R cuadrado = .994 (R cuadrado corregida = .987)

Comparación de medias por Tukey

concentración	N	Subconjunto									
		1	2	3	4	5	6	7	8	1	
E-P 2000/250	2	.0000									
P 2000	2	.0000									
E-P 2000/500	2	.0350									
E-P 2000/2000	2	.0350									
E 2000	2	.0400									
E-P 2000/1000	2	.0400									
E-P 1000/2000	2	.0400									
E-P 500/2000	2	.0600									
P 250	2		.2250								
E 500	2		.3050	.3050							
P 500	2		.3100	.3100							
E-P 500/250	2		.3200	.3200							
E-P 1000/500	2		.3450	.3450							
E-P 500/500	2		.3450	.3450							
E-P 250/500	2		.3550	.3550							
E-P 250/1000	2		.3700	.3700							
E-P 2000/1000	2		.3700	.3700							
E-P 250/250	2		.3950	.3950	.3950						
E-P 1000/250	2			.4600	.4600	.4600					
E-P 500/1000	2			.4950	.4950	.4950					
E 250	2				.5650	.5650	.5650				
E 1000	2					.6200	.6200				
E-P 250/2000	2						.6950				
E-P 1000/1000	2							.8800			
Control	2										1.2900

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = .003.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2.000

b Alfa = .05.

Factor concentración y variable dependiente tiempo de adaptación

Variable dependiente: tiempo de adaptación

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo	12197.375(a)	25	487.895	5.805	.000
Concentración	12197.375	25	487.895	5.805	.000
Error	2101.053	25	84.042		
Total	14298.429	50			

R cuadrado = .853 (R cuadrado corregida = .706)

Factor concentración y variable dependiente población inicial (No)**Variable dependiente: población inicial**

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo	1.650(a)	25	.066	383.791	.000
Concentración	1.650	25	.066	383.791	.000
Error	.004	25	.000		
Total	1.655	50			

a R cuadrado = .997 (R cuadrado corregida = .995)

Factor concentración y variable dependiente población final (Nmax)**Variable dependiente: población final**

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo	177.879(a)	25	7.115	2.815	.006
Concentración	177.879	25	7.115	2.815	.006
Error	63.186	25	2.527		
Total	241.064	50			

R cuadrado = .738 (R cuadrado corregida = .476)

Factor concentración y variable dependiente tiempo de duplicación**Variable dependiente: tiempo de duplicación**

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo	613220.917(a)	25	24528.837	12.607	.000
Concentración	613220.917	25	24528.837	12.607	.000
Error	48641.817	25	1945.673		
Total	661862.734	50			

a R cuadrado = .927 (R cuadrado corregida = .853)

ANOVA valores promedio del cultivo de *Brochothrix thermosphacta* en absorbencias

Variable dependiente: absorbencias

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	4,288 ^a	25	,172	105,622	,000
C	4,288	25	,172	105,622	,000
Error	,041	25	,002		
Total	4,328	50			

a. R cuadrado = ,991 (R cuadrado corregida = ,981)

absorbencias

Tukey B^{a,b}

Concentración	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
E-P 500/500	2	,17850				
E500	2	,19150				
E-P 1000/250	2	,20250				
E-P 1000/1000	2	,20750				
E2000	2	,20950				
E-P 2000/250	2	,21450				
E-P 500/1000	2	,21700				
P2000	2	,21700				
E-P 250/2000	2	,21900				
E-P 1000/500	2	,22600	,22600			
E-P 500/2000	2	,23000	,23000	,23000		
E-P 2000/500	2	,23250	,23250	,23250		
P250	2	,23600	,23600	,23600		
E1000	2	,23900	,23900	,23900		
E-P 2000/1000	2	,24300	,24300	,24300		
E-P 1000/2000	2	,25350	,25350	,25350		
E-P 500/250	2	,25700	,25700	,25700		
E-P 250/1000	2	,27350	,27350	,27350		
E-P 2000/2000	2	,29050	,29050	,29050		
P1000	2	,31800	,31800	,31800		
P500	2		,37650	,37650	,37650	
E-P 250/500	2			,38350	,38350	
E-P 250/250	2				,46850	,46850
E250	2				,49350	,49350
control	2					,53550

Análisis de varianza de los parámetros de crecimiento microbiano de *Brochothrix thermosphacta*

Variable dependiente: Población inicial

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	1,676 ^a	25	,067	609,291	,000
Conc	1,676	25	,067	609,291	,000
Error	,003	25	,000		
Total	1,678	50			

a. R cuadrado = ,998 (R cuadrado corregida = ,997)

Variable dependiente: Población final

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	2979,477 ^a	25	119,179	1,166	,352
Conc	2979,477	25	119,179	1,166	,352
Error	2554,863	25	102,195		
Total	5534,341	50			

a. R cuadrado = ,538 (R cuadrado corregida = ,077)

Variable dependiente: Velocidad máxima

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	6,053 ^a	25	,242	19,313	,000
Conc	6,053	25	,242	19,313	,000
Error	,313	25	,013		
Total	6,366	50			

a. R cuadrado = ,951 (R cuadrado corregida = ,902)

Velocidad máxima

Tukey B^{a,b}

Concentración	N	Subconjunto		
		1	2	3
E-P 1000/2000	2	,0200		
E-P 2000/500	2	,0300		
E500	2	,0350		
E-P 2000/2000	2	,0450		
E-P 250/2000	2	,0900	,0900	
P250	2	,1350	,1350	
E-P 500/2000	2	,1850	,1850	
E-P 500/1000	2	,1950	,1950	
E2000	2	,2150	,2150	
E-P 1000/250	2	,2300	,2300	
E-P 1000/500	2	,2400	,2400	
E-P 2000/250	2	,2450	,2450	
E1000	2	,2600	,2600	
E-P 1000/1000	2	,2750	,2750	
P2000	2	,3000	,3000	
E-P 2000/1000	2	,3250	,3250	
E-P 250/1000	2	,3350	,3350	
E-P 250/500	2	,3450	,3450	
E-P 500/250	2	,3550	,3550	
P1000	2	,3700	,3700	
E250	2	,4350	,4350	
P500	2		,4950	
E-P 250/250	2		,5150	
E-P 500/500	2		,5300	
control	2			,9450

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,013.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

Variable dependiente: Tiempo de adaptación

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	14944,227 ^a	25	597,769	35,120	,000
Conc	14944,227	25	597,769	35,120	,000
Error	425,513	25	17,021		
Total	15369,741	50			

a. R cuadrado = ,972 (R cuadrado corregida = ,945)

Variable dependiente: Tiempo de duplicación

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	27755,741 ^a	25	1110,230	1,763	,082
Conc	27755,741	25	1110,230	1,763	,082
Error	15741,743	25	629,670		
Total	43497,484	50			

a. R cuadrado = ,638 (R cuadrado corregida = ,276)

ANOVA valores promedio del cultivo de *Weisella viridescens* en absorbencias

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: absorbencias

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	2,087 ^a	25	,083	481,771	,000
C	2,087	25	,083	481,771	,000
Error	,004	25	,000		
Total	2,091	50			

a. R cuadrado = ,998 (R cuadrado corregida = ,996)

absorbencias

Tukey B^{a,b}

Concentración	N	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
P250	2	,14250						
E-P 500/500	2	,15000						
E-P 250/250	2	,15400	,15400					
E-P 250/500	2	,15750	,15750					
E250	2	,16050	,16050	,16050				
P1000	2	,16150	,16150	,16150				
E500	2	,16250	,16250	,16250				
E-P 250/1000	2	,16900	,16900	,16900	,16900			
E1000	2	,17100	,17100	,17100	,17100			
E-P 1000/250	2	,17400	,17400	,17400	,17400			
E-P 500/250	2	,17500	,17500	,17500	,17500			
E-P 1000/500	2	,17650	,17650	,17650	,17650			
E-P 500/1000	2	,17850	,17850	,17850	,17850			
P500	2	,18200	,18200	,18200	,18200			
P2000	2		,20250	,20250	,20250	,20250		
E2000	2		,20300	,20300	,20300	,20300		
E-P 250/2000	2			,20950	,20950	,20950	,20950	
E-P 2000/250	2				,21850	,21850	,21850	
E-P 2000/500	2					,23150	,23150	
E-P 1000/1000	2					,23850	,23850	
E-P 500/2000	2					,23850	,23850	
E-P 2000/1000	2					,24150	,24150	
E-P 1000/2000	2						,25250	
E-P 2000/2000	2							,30300
control	2							,32250

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,000.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

Análisis de varianza de los parámetros de crecimiento microbiano de *Weissella viridescens*

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Población inicial

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	1,713 ^a	25	,069	543,667	,000
Conc	1,713	25	,069	543,667	,000
Error	,003	25	,000		
Total	1,716	50			

a. R cuadrado = ,998 (R cuadrado corregida = ,996)

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Población final

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	39,566 ^a	25	1,583	1,325	,243
Conc	39,566	25	1,583	1,325	,243
Error	29,863	25	1,195		
Total	69,429	50			

a. R cuadrado = ,570 (R cuadrado corregida = ,140)

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Velocidad máxima

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	1,063 ^a	25	,043	9,542	,000
Conc	1,063	25	,043	9,542	,000
Error	,111	25	,004		
Total	1,174	50			

a. R cuadrado = ,905 (R cuadrado corregida = ,810)

Velocidad máxima

Tukey B^{a,b}

Concentració n	N	Subconjunto	
		1	2
E-P 500/500	2	,0100	
E-P 1000/250	2	,0200	
E-P 1000/500	2	,0200	
E-P 250/1000	2	,0200	
E-P 250/2000	2	,0200	
P1000	2	,0200	
P250	2	,0200	
E-P 2000/250	2	,0250	
E-P 500/1000	2	,0250	
E-P 500/2000	2	,0250	
P2000	2	,0250	
E-P 250/250	2	,0300	
E-P 250/500	2	,0300	
E1000	2	,0300	
E500	2	,0300	
E-P 1000/2000	2	,0400	
E-P 2000/2000	2	,0450	
E-P 2000/500	2	,0450	
E-P 500/250	2	,0450	
P500	2	,0500	
E2000	2	,0700	
E250	2	,0700	
E-P 2000/1000	2	,1100	
E-P 1000/1000	2	,2350	
control	2		,6600

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,004.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Tiempo de adaptación

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	4520,262 ^a	25	180,810	1,336	,237
Conc	4520,262	25	180,810	1,336	,237
Error	3383,227	25	135,329		
Total	7903,489	50			

a. R cuadrado = ,572 (R cuadrado corregida = ,144)

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Tiempo de duplicación

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	35209,460 ^a	25	1408,378	17,011	,000
Conc	35209,460	25	1408,378	17,011	,000
Error	2069,766	25	82,791		
Total	37279,227	50			

a. R cuadrado = ,944 (R cuadrado corregida = ,889)

Anexo C

Efecto del recubrimiento antimicrobiano en salchichas tipo Viena inoculadas con los microorganismos sensibles.

Técnica de DGGE

Extracción de ADN

a) Rotura-homogenización

Obtención de un lisado celular

1. Se suspendieron las células en 480 µL de EDTA (50 mM), para evitar la acción de las nucleasas al quelar cationes divalentes como el Mg^{+2} .
2. Se adicionaron 120 µL de lisozima (10 mg/mL). El propósito de este tratamiento es debilitar la pared celular de la bacteria Gram positiva con alto contenido de peptidoglucano.
3. Se incubó a 37 °C durante 30 minutos
4. Se centrifugó durante 2 minutos a 14000 rpm

b) Purificación

Separación del ADN

1. Se adicionaron 600 µL de la solución de lisis nucleica.
2. Se incubó durante 5 minutos a 80 °C.
3. Se adicionaron 3 µL de solución de ARNasa, mezclando con cuidado.
4. Se incubó a 37 °C durante 16 minutos

En esta fase se da la separación de los ácidos nucleicos del resto de los componentes.

Precipitación proteica

1. Se adicionaron 200 µL de la solución de precipitación proteica y se mezcló en un vortex.
2. Se incubó en hielo durante 5 minutos.

3. Se centrifugó a 14000 rpm durante 3 minutos. En este paso se da la precipitación proteica. Se transfirió el sobrenadante a un vial con 600 µL de isopropanol.
- c) Concentración
- 1- Después de transferir el sobrenadante al vial con isopropanol, se mezcló lentamente, girando el vial. En este punto se pueden apreciar las hebras de ADN a simple vista.
 - 2- Se centrifugó durante 2 minutos a 14000 rpm, al finalizar se decantó el sobrenadante.
 - 3- Se adicionaron 600 µL de etanol al 70 % a temperatura ambiente. Se invirtió varias veces el vial para lavar el precipitado de ADN y se centrifugó durante 2 minutos a 14000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 10 minutos.
 - 4- Se hidrató el pellet de ADN con 100 µL de solución de rehidratación y se almacenó toda la noche a 4 °C

PCR

El proceso de PCR se realizó en un pequeño vial en el que se adicionaron todos los elementos necesarios como lo indica la tabla A1;

- a) El ADN total del cual se deseaba obtener la amplificación del fragmento que codifica el ARNr 16S
- b) Enzima “ADN polimerasa” termorresistente, capaz de generar una copia de ADN a partir del ADN molde
- c) Buffer 10 x Accu Prime para el buen funcionamiento de la enzima que contiene los cuatro nucleótidos trifostato (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) con los cuales se va a crear una cadena complementaria a la cadena molde mediante la incorporación de los mismos al extremo 3’ del cebador, además de cloruro de magnesio (MgCl₂), que es un cofactor de la enzima
- d) Los cebadores o primers DGGE de bacterias, son secuencias de pocos nucleótidos que delimitan el fragmento a amplificar. El primer Forward es el que tiene la grapa de guanina-citosina (subrayada).
 - Forward ClampBAC-968-F

5'-

CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGAA
CGCGAAGAACCTTAC-3'

- Reverse BAC-1401-R

5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'

Tabla A1. Componentes de PCR.

Componentes	Volumen (μL)	Concentración final
10X Accu Prime	5	1X
Primer R (20 μM)	0.75	0.3 μM
Primer F (20 μM)	0.75	0.3 μM
ADN	5	(80 ng/mL)
AccuPrime “ADN polimerasa” (2.5 U/μL)	0.5	1.25 U/mL
Agua	38	
Total	50	

La reacción ocurrió en tres etapas, conforme a la tabla A2:

- Desnaturalización. Se elevó la temperatura hasta 94 °C durante 1 minuto provocando la separación de la doble hélice en las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrogeno y el consiguiente desapareamiento de las bases complementarias.
- Hibridación de los cebadores. Se bajó la temperatura a 53 °C durante 1 minuto; a esta temperatura se favorece el apareamiento de los primers con las bases complementarias que se encuentran en el ADN molde de la muestra.
- Elongación. Se elevó la temperatura hasta 75 °C, ésta es la temperatura óptima para que la ADN polimerasa comience a replicar, incorporando nucleótidos sobre los primers y sintetizando una copia completa y exacta de la cadena molde comprendida entre los dos primers.

El ciclo se repitió 30 veces y en cada nuevo ciclo, las nuevas cadenas recién sintetizadas en el anterior actúan también como moldes, provocando una amplificación exponencial (Cortes y Morcillo., 2002; Hughes y Moody., 2007; Watson y col., 2008)

Tabla A2. Condiciones de amplificación por PCR.

# de ciclos	Fase	Temperatura °C	tiempo
1	Desnaturalización	94	5 min
30	Desnaturalización	94	1 min
	Hibridación	53	1 min
	Polimerización	72	1 min
1	Polimerización	72	5 min

Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

Preparación del sándwich para el gel de DGGE

1. Se limpiaron los vidrios con etanol al 96 % con sanitas, posteriormente se colocó el gelbond (se cortó al mismo tamaño del vidrio más grande y se adhirió con el lado hidrofílico del lado donde quedaría el gel, una forma de verificar el lado hidrofílico es colocando una gota de agua en el gelbond: el lado donde la gota se desplazó más lento es el lado hidrofílico).
2. Se alinearon los espaciadores entre los dos cristales, colocando el cristal más pequeño al frente, enseguida se sujetaron juntos con las pinzas de encuadernación y se colocaron sobre la junta de goma presionando el mango para que quedara fijo. Se limpiaron nuevamente los vidrios con alcohol al 96 % y se verificó que no hubiera

fugas. Si las hubiese se pueden sellar con 1 ml de solución desnaturalizante al 100%, 20 μ L de APS al 10 % y 5 μ L de TEMED. Finalmente se colocó el peine

Preparación del gel

1. Se prepararon las soluciones desnaturalizantes de baja y alta concentración para formar un gradiente desnaturalizante de 40-60 %. Se necesitaron 20 mL de cada solución para formar el gel.
2. Primero se colocó el aparato para formar el gradiente sobre un agitador magnético, conectándose las mangueras del mismo hacia una bomba peristáltica. Se puso a funcionar la bomba a una velocidad de 20 mL/min y se añadió agua al aparato para limpiar el sistema. Posteriormente se bajó la velocidad a 4 mL/min. Una vez limpio el sistema, se colocó una aguja nueva en la manguera de salida, la cual se colocó al lado del peine.
3. Se prepararon las soluciones desnaturalizantes en campana de flujo laminar en tubos etiquetados con “alta” y “baja” en un baño de hielo de acuerdo a la tabla A3. A ambos tubos se les adicionaron 13 μ L de TEMED y 50 μ L de APS al 10 %.

Tabla A3. Soluciones desnaturalizantes

Tubos	Solución desnaturalizante
Baja, 40 %	• 8 mL de 100%
	• 12 mL de 0 %
Alta, 60 %	• 12 mL de 100%
	• 8 mL de 0 %

4. Las soluciones preparadas anteriormente se vaciaron rápidamente en los compartimentos del aparato para formar el gradiente y se abrió el conducto que comunica a las dos soluciones, al mismo tiempo se encendió la bomba. Lo ideal es que no se formen burbujas en el llenado del gel, para eso se colocó la aguja estratégicamente a un costado del peine.
5. Se dejó polimerizar el gel durante una hora.

Electroforesis

1. Después de que polimerizó el gel, se trasladó el sándwich al contenedor del baño, ajustándolo al mismo haciendo presión hacia abajo. Previamente, el buffer TAE 1X fue calentado a 65 °C en un baño, para que después de colocar el contenedor del baño baje a una temperatura de 60 °C.
2. Se inyectaron 20 µL de los productos de PCR más 5 µL de buffer de carga.
3. Se realizó una precorrida de 10 minutos a 200 V para después bajar el voltaje a 85 V, corriendo el gel toda la noche o durante 16 horas.

Tinción del Gel de DGGE

Se apagó y desmontó el contenedor del baño del DGGE, se procedió a separar el gel que se encontraba entre los vidrios, para colocarlo inmediatamente en un recipiente para proceder a la tinción en plata de acuerdo a lo descrito por Sanguinetti y col. (1994).

1. Se adicionaron 200 mL de la solución de fijación, manteniéndose en agitación moderada durante 3 minutos.
2. Posteriormente se retiró la solución, reservándola para el final. Se adicionaron 200 mL de la solución de tinción de plata, manteniéndose en agitación moderada durante 10 minutos.
3. Se retiró la solución en un contenedor de residuos químicos, se enjuagó el gel con agua destilada y se mantuvo en agitación durante 2 minutos
4. Se retiró el agua destilada a un contenedor de residuos químicos y se traspasó el gel a otro recipiente para desarrollar el color, adicionando un poco de la solución desarrolladora del color. Después de enjuagar el gel, se retiró el líquido para posteriormente colocar toda la solución desarrolladora del color y agitar moderadamente hasta observar la definición de las bandas. Cuando ya se apreciaron las bandas definidas (aproximadamente en 20 minutos) se retiró la solución adicionando agua para enjuagar el gel. Una vez seco se procedió a la toma de la foto, el análisis de las bandas y el corte de las mismas.

Preparación de soluciones

TAE 50 X buffer de electroforesis

- 242 g Tris base (hidroximetil aminometano)

- 57.1 mL Ácido acético glacial
- 100 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Se aforó a 1 L

100% Solución desnaturalizante

- 21.08 g Urea
- 10 mL 40 % Acrilamida-bisacrilamida (37.5:1)
- 20 mL Formamida
- 0.5 mL TAE 50X
- 1 mL Glicerol
- Agua destilada estéril

Se aforó a 50 mL

0 % Solución desnaturalizante

- 10 mL 40 % Acrilamida-bisacrilamida (37.5:1)
- 0.5 mL TAE 50X
- 1 mL Glicerol
- Agua destilada estéril

Se aforó a 50 mL

Preparación 40% acrilamida-bisacrilamida (37.5:1)

- Acrilamida 39.93 g
- Bisacrilamida 1.07 g
- Agua destilada estéril

Se aforó a 100 mL

Se filtró y almacenó a 4 °C

Preparación de soluciones para la tinción del gel

Solución fijadora 8X

- 200 mL de etanol al 96 %
- 10 mL de ácido acético
- 40 mL de agua destilada

Solución fijadora 1X

- 50 mL de solución fijadora 8X
- 350 mL agua destilada

Solución de tinción de plata

- 0.4 g AgNO_3
- 200 mL solución fijadora 1X

Solución desarrolladora del color

- La punta de la espátula de borohidruro de sodio (aproximadamente 10 mg)
- 250 mL de hidróxido de sodio al 1.5 % p/v
- 750 μL formaldehído