



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INCORPORACIÓN DE LA PEDIOCINA PRODUCIDA POR *Pediococcus parvulus* MXVK133 EN PELÍCULAS Y RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

M. en B. BACILIZA QUINTERO SALAZAR

DIRECTORA DE TESIS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

ASESORES

DRA. ISABEL GUERRERO LEGARRETA

DR. JAIME VERNON CARTER

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL

MARZO 2006

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados (PNP) del CONACYT con categoría de alto nivel y además cuenta con el convenio 471-01 **Doctorado en Biotecnología**.

Iztapalapa, D.F. a 23 de marzo de 2006

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Incorporación de la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133 en películas y recubrimientos comestibles”

que presentó

Baciliza Quintero Salazar

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Edith Ponce Alquicira
Asesora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta
Asesor: Dr. Jaime Vernon Carter

Jurado:

Dr. Jaime Vernon Carter (Presidente)
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dra. Isabel Guerreto Legarreta (Secretaria)
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dra. Amelia Farrés González-Saravia (Sinodal)
Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Carlos Regalado González (Sinodal)
Universidad Autónoma de Querétaro

AGRADECIMIENTOS

Al Pueblo Trabajador de México, quien con su esfuerzo y dedicación constantes contribuye día con día al sostenimiento de la mejor herramienta que un pueblo puede poseer para crecer y salir adelante: la educación pública.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

A mi *Alma Mater*: la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme regalado los elementos más valiosos que deleitan y enaltecen el espíritu del hombre: conocimientos y sensibilidad.

A esta "*Casa Abierta al Tiempo*", por permitirme realizar en sus aulas mis estudios de Posgrado. Asimismo por haber contribuido substancialmente en mi desarrollo científico, personal y espiritual.

Al Programa de Movilidad Nacional Estudiantil Santander-Serfin-Universia, por la beca otorgada para la realización de la estancia de investigación en la Universidad Autónoma de Querétaro.

A Edith por su ayuda excepcional, por la confianza depositada en mi persona y en mi trabajo. Gracias también por haberme regalado no solo grandes lecciones científicas sino de y para la vida.

Al Dr. Jaime Vernon por su valiosa ayuda, por su paciencia y por haberme mostrado la luz en varias ocasiones. ¡En verdad, un millón y medio de gracias!

A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta, por el asesoramiento recibido en el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Dr. David Sepúlveda por su valiosa ayuda en la preparación y el análisis de la estructura microscópica de las películas. Gracias también por mostrarme que la paciencia, así como la alimentación del espíritu y la pasión por lo que se hace son factores indispensables para el disfrute total de las tareas científicas.

Al Dr. Carlos Regalado y a la Maestra Blanca Armendáriz, por su amistad y por permitirme realizar la estancia de investigación dentro de su grupo de trabajo, en la UAQ. Asimismo, por sus sugerencias para mejorar la calidad de esta tesis.

A la Dra. Amelia Farrés, por sus valiosas sugerencias para darle un mejor enfoque a esta tesis. Igualmente, por haber sido la profesora quien con sus clases de Biotecnología en la UNAM inspiró en mi el interés por la Biotecnología Alimentaria.

A mis compañeros, ex-compañeros y amigos del Área de Macromoléculas: Conny, Cuahutemoc, Elvia, Ernesto, Hugo, Isadora, Jarumi, Lizbeth, Luis Cira, Marcelo, Marisol, Miriam, Octavio, Raquel, Raquelita, Rosa, Ruth, Silvia y Yoyi.

A mis amigos del laboratorio de "Biotecnología" de la Universidad Autónoma de Querétaro: Ana, Claus, Cuahutemoc, Francois, Lorenzo, Mundo, Said, Lupita, Omar y Tere, por su amistad y por su invaluable ayuda en el laboratorio. Asimismo, por haber hecho muy placentera e inolvidable mi estancia en la UAQ.

A mis entrañables Escolapios: Andrés, Edgar, Gina, Hugo, Mis, Octavio y Yadis por su amistad, la cual espero perdure por siempre.

A las Bolchevicas y Pantaleones de la Tercera Raíz: Cielo, Evelia, Edith, Fidel, Fili, Flor, Minerva, Daniel, Jimena, Mara, Marcela y Toño, por su amistad y por compartir conmigo sus presentaciones e infinidad de momentos divertidísimos.

A Roberta Beta, por deleitar intensamente mis sentidos sábado a sábado con la música y danzas de su pueblo, Brasil. Gracias por enseñarnos que las costumbres, la libertad y dignidad de los pueblos son tesoros invaluables por los cuales vale la pena luchar en la vida.

A Isadora y Carlos por su amistad y por compartir conmigo días de júbilo, tristezas, e infinidad de momentos de reflexión.

A Irán, Salvador y Set, por su amistad incondicional y por los inolvidables momentos vividos en la "Big House".

A Irene y a Manuel, por su amistad sincera y su bondad inmensa en todo momento.

A Baruch, por su amistad, escucharme y por compartir conmigo su amor y gusto por la naturaleza; por las largas caminatas en la montaña y por mostrarme la infinidad de bellezas naturales y arquitectónicas del sureste mexicano, en su Ruta Maya 2004.

A mis amigas las meras meras Fandangueras: Caro, Edna, Itzbe, Miroslava y Rocío, por compartir y disfrutar conmigo esa pasión tan intensa por el Son Jarocho y los Fandangos.

A Juan Varela, por su amistad y por mostrarme que el Son Jarocho también se disfruta a través de su versada, mensajes y los pasajes de la historia y de la vida cotidiana que en él se describen. Además, por describirme pacientemente cómo se vive y se disfruta un Fandango allá en el Hato. Finalmente, gracias por compartir conmigo tu bellísima colección de Son Jarocho, la cual ha deleitado inmensamente mi espíritu es estos días de tensión.

A mis amigas del alma Ale, América, Estela y Martha, por su amistad incondicional y sincera. Además por enseñarme con su diario ejemplo que es necesario poseer un

espíritu libre, sensible a la danza, la música, a la poesía, a la naturaleza y a la gastronomía, para disfrutar intensamente de la vida. Gracias por enriquecer con su sensibilidad mi existencia. ¡Las quiero y las admiro mucho!

A mis abuelos, primos, tíos y sobrinos, pues son parte importante de mi vida.

A mis padres Luisa y Kefrén, a quienes quiero y admiro inmensamente y por sobre todas las cosas. Gracias por apoyarme siempre, por su confianza y amor incondicionales. Asimismo, por regalarme aquellos valores fundamentales que en ninguna otra parte más que en la casa se adquieren.

A mis hermanos: Male, Lety, Toño, por su amor y por las lecciones de vida que cada uno de ustedes me ha regalado. Gracias por todo lo que hemos vivido juntos. Los quiero muchísimo, los admiro y estoy súper orgullosa de ustedes.

A mi sobrina Karla a quien tanto quiero y quien con sus ocurrencias me hace muy feliz cada vez que la veo. También a su hermanita que viene en camino y a Joaquín.

A mi tía Elvia (q.e.p.d), a quien admiraré siempre por su labor alfabetizadora y ayuda prestadas en escuelas de las comunidades indígenas de La Sierra Norte del Estado de Veracruz.

A todos aquellos quienes de alguna manera colaboraron o estuvieron a mi lado durante la realización de este proyecto, en esta etapa tan importante de mi vida.

Mi más grande y sincero reconocimiento

Basy

Con todo mi amor, cariño y admiración:

A mis padres: Luisa y Kefrén;

A mis hermanos: Lety, Male y Toño

A mi sobrina Karla.

A mi tía Elvia (q.e.p.d)

*Voy con las riendas tensas
y refrenando el vuelo,
porque no es lo que importa llegar solo
ni pronto
sino con todos y a tiempo*

León Felipe

*Yo fui a la Revolución
a luchar por el derecho
de sentir sobre en mi pecho
una gran satisfacción.
Pero hoy vivo en un rincón,
cantándole a mi amargura,
pero con la fe segura
y anunciándole al destino
que es el hombre campesino
nuestra esperanza futura*

Arcadio Hidalgo

Índice General

Índice general.....	i
Índice de tablas.....	v
Índice de figuras.....	vii
Resumen.....	ix
Abstract.....	xii
1.Introducción.....	1
2. Justificación.....	3
3. Revisión bibliográfica.....	4
3.1 Nuevas tecnologías en empaques para alimentos.....	4
3.2 Empaques activos con actividad antibacteriana.....	6
3.2.1 Definición, modo de acción y clasificación.....	6
3.2.2 Antecedentes.....	6
3.2.3 Factores a considerar durante su desarrollo.....	12
3.2.3.1 Condiciones proceso.....	13
3.2.3.2 Interacción agentes antibacterianos-alimentos.....	13
3.2.3.3 Temperatura de almacenamiento.....	14
3.2.3.4 Propiedades fisicoquímicas	14
3.2.3.5 Coeficientes de transferencia de masa.....	14
3.2.3.6 Inocuidad y legislación.....	15
3.3 Películas y recubrimientos comestibles	16
3.3.1 Definición.....	16
3.3.2 Ventajas del empleo de películas y recubrimientos comestibles.....	16
3.3.3 Materiales empleados para su elaboración.....	18
3.3.3.1 Polisacáridos.....	18
3.3.3.2 Lípidos.....	19
3.3.3.3 Proteínas.....	19
3.3.3.4 Agentes plastificantes.....	20

3.4	Características de algunas proteínas empleadas en la elaboración de películas y recubrimientos comestibles.....	20
3.4.1	Zeína de maíz	20
3.4.1.1	Propiedades fisicoquímicas.....	21
3.4.1.2	Constitución y estructura.....	21
3.4.1.3	Aplicaciones.....	22
3.4.2	Aislado de proteína de suero de leche.....	23
3.4.2.1	Naturaleza de las proteínas del suero.....	23
3.4.2.2	Aplicaciones.....	24
3.5	Bacteriocinas de las bacterias lácticas.....	24
3.5.1	Características generales.....	26
3.5.2	Clasificación.....	27
3.5.3	Modo de acción.....	28
3.6	Pediocina.....	29
3.6.1	Estructura.....	30
3.6.2	Propiedades fisicoquímicas.....	31
3.6.3	Solubilidad.....	31
3.6.4	Factores que afectan su actividad.....	31
3.6.5	Estabilidad durante almacenamiento.....	33
3.6.6	Espectro de inhibición.....	33
3.6.7	Aplicaciones y limitaciones.....	33
4.	Hipótesis	35
5.	Objetivos.....	36
6.	Metodología.....	38
6.1	Materiales empleados para la elaboración de películas y/o recubrimientos.....	38
6.2	Microorganismos y medios de cultivo.....	38
6.3	Producción, aislamiento y purificación de la pediocina producida por <i>Pediococcus parvulus</i> MXVK133.....	39
6.3.1	Cuantificación de la actividad antimicrobiana.....	40

6.4	Elaboración de las soluciones formadoras de películas (SFP).....	40
6.5	Preparación de películas con actividad antimicrobiana.....	41
6.6	Determinación de la actividad antimicrobiana de las películas por el método de difusión de agar.....	41
6.7	Actividad antibacteriana de películas de zeína y APSL adicionadas con pediocina contra algunas cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	42
6.8	Estudios sobre la migración de la pediocina contenida en películas de APSL y zeína en medio acuoso.....	42
6.8.1	Estudios sobre la migración de pediocina contenida en películas de APSL y zeína en medio acuoso.....	42
6.8.1.1	Migración en agua.....	43
6.8.1.2	Elaboración de la curva patrón	43
6.8.1.3	Efecto del pH sobre la migración.....	46
6.9	Efecto del pH de las SFP de APSL sobre la actividad antimicrobiana en medio semi-sólido.....	44
6.10	Evaluación de la efectividad de las películas para reducir una población de <i>L. innocua</i> en suspensión.....	45
6.11	Análisis de la estructura de las películas por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	46
6.12	Efecto de la concentración de bacteriocina en el control de <i>Listeria innocua</i> en un sistema cárnico.....	46
6.13	Análisis estadístico.....	47
7.	Análisis y discusión de resultados.....	48
7.1	Producción y actividad de la bacteriocina producida por <i>Pediococcus parvulus</i> MXVK133 en las diferentes etapas.....	48
7.2	Descripción visual de las películas.....	48
7.3	Actividad antilisteria de películas de aislado de proteína de suero	

	de leche y zeína de maíz adicionadas con pediocina.....	50
7.4	Efecto de la concentración de bacteriocina en las películas.....	54
7.4.1	Efecto sobre el espesor	54
7.4.2	Efecto sobre la actividad antimicrobiana.....	55
7.5	Migración de la pediocina en agua.....	59
7.6	Efecto del pH sobre el grado de migración de la pediocina contenida en las películas.....	63
7.7	Efecto del pH de las soluciones formadoras de película de APSL sobre la actividad antimicrobiana contra <i>L. innocua</i> en medio semisólido.....	69
7.8	Eficacia de la pediocina incorporada en películas en el control de la población de <i>L. innocua</i> en suspensión.....	71
7.9	Análisis de estructura por microscopía electrónica de barrido.....	74
7.10	Aplicación de recubrimientos de zeína y APSL con actividad antibacteriana para el control de <i>L. innocua</i> en un sistema cárnico.....	76
8.	Conclusiones.....	83
9.	Perspectivas.....	84
10.	Bibliografía.....	85
11.	Anexo 1: Pruebas propiedades mecánicas.....	91
12.	Anexo 2: Producción científica	110

Índice de tablas

Tabla 3.1	Ejemplos de la incorporación de agentes antibacterianos en películas y/o recubrimientos elaborados a partir de biopolímeros.....	8
Tabla 3.2	Películas y recubrimientos con antimicrobianos elaborados a partir de biopolímeros y su aplicación en la conservación de algunos alimentos.....	10
Tabla 3.3	Aplicación recubrimientos comestibles y sus funciones en algunos productos cárnicos.	18
Tabla 3.4	Características de algunas bacteriocinas de bacterias lácticas.....	27
Tabla 3.5	Esquema de clasificación de bacteriocinas	28
Tabla 3.6	Características fisicoquímicas de la pediocina PA-1/AcH.....	32
Tabla 7.1	Actividad de la pediocina producida por <i>Pediococcus parvulus</i> MXVK133 durante las diferentes etapas de extracción por el método de adsorción-desorción.	48
Tabla 7.2	Actividad antilisteria de películas de APSL y zeína adicionadas con 16666 UA /mL SFP de pediocina.....	53
Tabla 7.3	Efecto de la concentración pediocina en películas de zeína de maíz y aislado de proteína de suero de leche (APSL) sobre el espesor y las de inhibición contra <i>Listeria innocua</i>	54
Tabla 7.4	Porcentaje de pediocina liberada de películas de zeína en agua destilada a 10°C durante 48 h.....	60
Tabla 7.5	Efecto del pH del medio sobre la liberación de pediocina incorporada en películas de zeína.	63
Tabla 7.6	Efecto del pH del medio de desorción sobre la liberación de pediocina incorporada en películas de aislado de proteína de suero de leche (APSL).....	67

Tabla 7.7	Efecto del pH de las soluciones formadoras de películas de APSL adicionadas con pediocina sobre la actividad antimicrobiana contra <i>L. innocua</i> en medio semisólido.....	70
Tabla 7.8	Control de <i>Listeria</i> por recubrimientos de APSL con diferentes concentraciones de bacteriocina aplicados sobre salchichas almacenadas a 10°C.....	78
Tabla 7.9	Efecto de control de <i>Listeria</i> por recubrimientos de zeína con diferentes concentraciones de bacteriocina aplicados sobre salchichas almacenadas a 10°C.....	83

Índice de figuras

Figura 3.1-	Funciones de los empaques según Yam <i>et al.</i> (2005).....	5
Figura 3.2	Sistemas de empackado de alimentos y los fenómenos de migración (Han, 2000).....	13
Figura 3.3	Migración de sustancias activas inmovilizada en un empaque, según Han (2000b).....	15
Figura 7.1	Actividad de la pediocina producida por <i>Pediococcus parvulus</i> MXVK133 durante las diferentes etapas de extracción por el método de adsorción-desorción.....	15 49
Figura 7.2	Películas elaboradas a partir de aislado de proteína de suero de leche (APSL) y zeína de maíz.....	50
Figura 7.3	Actividad antilisteria de películas de aislado de proteína de suero de leche (APSL) y zeína de maíz (ZM) con 16 666 UA pediocina/mL SFP. <i>Listeria monocytogenes</i> cepas: LM82, LM47, Scott A, y LM48.....	56
Figura 7.4	Efecto de la concentración de pediocina en películas de zeína de maíz sobre la actividad antimicrobiana contra <i>Listeria innocua</i>	56
Figura 7.5	Actividad antimicrobiana contra <i>Listeria</i> de películas de zeína de maíz (ZM) y aislado de proteína de suero de leche con 16666, 33333 y 50 000 UA/mL SFP de pediocina.....	56
Figura 7.6	Zonas inhibición generadas contra <i>L. innocua</i> por películas de aislado de proteína de suero de leche y zeína adicionadas con diferentes concentraciones de pediocina.....	57
Figura 7.7	Efecto del pH sobre el porcentaje de migración de la pediocina incorporada en películas de zeína.	65
Figura 7.8	Cambios en el número de cargas en la zeína de maíz y en la pediocina a diferentes valores de pH.....	66

Figura 7.9	Cambios en el número de cargas de las proteínas del APSL y la pediocina a diferentes valores de pH.....	69
Figura 7.10	Áreas de inhibición formadas contra <i>L. innocua</i> por películas de APSL elaboradas a partir de SFP con pH 7,8 y 9 y adicionadas con 16666 UA de pediocina/mL SFP.....	71
Figura 7.11	Efecto de la concentración de pediocina en películas de: a) zeína y b) APSL en el control de <i>L. innocua</i> en suspensión.....	72
Figura 7.12	Microscopía electrónica de barrido de la superficie y sección transversal de películas de zeína (a & b) y de APSL (c & d) con 16666 UA/mL SFP.....	77
Figura 7.13	Efecto de la concentración de la pediocina presente en recubrimientos de APSL aplicados en el control de <i>Listeria innocua</i> en salchichas almacenadas a 10°C.....	74
Figura 7.14	Efecto de la concentración de pediocina presente en recubrimientos de zeína aplicados en el control de <i>Listeria innocua</i> en salchichas almacenadas a 10°C.....	80
Figura 15	Actividad contra <i>L. innocua</i> a los 0 (a) y 5 (b) días de almacenamiento a 10 °C, de muestras de salchicha recubiertas con soluciones formadoras de películas de APSL y zeína de maíz (Z) adicionadas con 10,000 UA/mL de pediocina.....	82

Resumen

La bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133 es un agente antimicrobiano natural, cuyas características fisicoquímicas y secuencia amino terminal coinciden con la pediocina PA-1. Asimismo, su actividad antilisteria y estabilidad en un amplio intervalo de pH y de temperatura, le confieren un gran potencial para ser empleada en la elaboración de empaques comestibles con actividad antimicrobiana.

El objetivo de este trabajo fue evaluar de qué manera la actividad y eficacia antimicrobianas, tanto *in vitro* como en un sistema cárnico, además del grado de migración de la pediocina incorporada en matrices proteicas formadoras de películas, eran afectados por el pH del medio, naturaleza de los materiales de película y estructura microscópica de las mismas.

Para este estudio se seleccionaron 2 materiales formadores de películas con diferentes características hidrofóbicas: zeína de maíz y aislado de proteína de suero de leche. La actividad antimicrobiana de películas adicionadas con 16666 UA de pediocina/mL de solución formadora de película (SFP) se probó contra *Listeria monocytogenes*: Scott A, LM82, LM47 y LM48; y también contra *L. innocua* ATCC33090. Para determinar la cantidad mínima de pediocina necesaria para producir películas con actividad antimicrobiana, diferentes concentraciones de pediocina (416-50000 UA) se adicionaron a las SFP y la actividad de las mismas se evaluó midiendo los halos de inhibición generados contra *Listeria innocua* en placas de agar. El grado de migración de la bacteriocina contenida en películas adicionadas con 16666, 33333 y 50000 UA/mL SFP se evaluó agua destilada a 10°C. Asimismo, se evaluó el efecto del pH sobre el grado de migración en un intervalo de pH de 4 a 7. Asimismo, se evaluó la actividad antimicrobiana de las películas de APSL adicionadas con pediocina (25000 UA/mL SFP) obtenidas al ajustar el pH de las SFP en un intervalo de 2 a 9. Adicionalmente, se realizó un análisis de la superficie

de las películas por microscopía electrónica de barrido para poder determinar si dichas diferencias podrían afectar el grado de migración de la pediocina contenida en ellas. Finalmente, se evaluó la eficacia de las películas y recubrimientos para controlar el crecimiento de *L. innocua* *in vitro* y en una emulsión cárnica.

Las películas de zeína de maíz (ZM) y aislado de proteína de suero de leche (APSL) adicionadas con 16666 UA de pediocina/mL de SFP presentaron actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* Scott A, LM48, LM82; y contra *L. innocua*, pero no contra *L. monocytogenes* LM47. La concentración mínima de pediocina para generar películas con actividad antimicrobiana contra *L. innocua* ATCC33090 fue de 833 y 3333 UA/mL SFP, para las películas de ZM y APSL, respectivamente. La migración de la pediocina en agua destilada fue detectada sólo en las películas de ZM más no en las de APSL. Sin embargo, cuando la migración se llevó a cabo en soluciones amortiguadoras ajustadas a valores de pH entre 4 y 7 ésta se favoreció significativamente a pH's ácidos (<5) tanto en películas de ZM como de APSL. Por otra parte, las películas de zeína mostraron una mayor eficacia en el control en la población de *L. innocua* tanto en pruebas *in vitro* como en una emulsión cárnica.

Las diferencias en la actividad antimicrobiana y eficacia en el control de *Listeria* mostradas por las películas de zeína y APSL se explicaron con base al establecimiento de interacciones de diferente naturaleza entre la pediocina y los materiales formadores de películas: interacciones de tipo hidrofóbico entre la zeína y la pediocina e interacciones de tipo electrostático, entre el APSL y la pediocina. Aunado a esto, la estructura menos compacta mostrada por las películas de zeína contribuyó a una mejor migración y eficacia de la pediocina para el control de *L. innocua*.

Las películas y recubrimientos elaborados a partir de APSL y zeína de maíz adicionados con pediocina pueden ser empleados satisfactoriamente para controlar mantener la calidad microbiológica de los alimentos. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de la pediocina contenida en ellos dependerá de naturaleza de las interacciones establecidas entre ésta y los materiales formadores de películas,

estructura microscópica de las películas, así como del pH del producto sobre el cual se apliquen

Palabras clave: empaques comestibles con actividad antimicrobiana, pediocina, zeína de maíz (ZM), aislado de proteína de suero de leche (APSL), *Listeria monocytogenes*.

Abstract

The bacteriocin produced by *Pediococcus parvulus* MXVK133 is a natural antimicrobial agent, presenting physicochemical characteristics and amino acid sequence similar to pediocin PA-1. Due to its antilisteria activity and pH stability, this bacteriocin presents potential to be used in the elaboration of edible antimicrobial films.

The aim of this work was to study the activity and antimicrobial effectiveness, as well as pediocin migration in films as affected by hydrophobicity and structure of film materials, as well as by pH.

Two film-forming materials with different hydrophobicity were selected: ethanol-soluble corn zein (CZ), and water-soluble whey protein isolate (WPI). Antimicrobial activity of films added with 16666 AU of pediocin/mL of film forming solution (FFS) was evaluated against 4 *Listeria monocytogenes*: strains Scott A, 82, 47 and 48 and against *L. innocua* ATCC33090. Minimal pediocin concentration to produce films with some antimicrobial activity was evaluated by adding various pediocin levels (416-50000 AU)/ mL of FFS. Film antimicrobial activity was studied by measuring the inhibition areas generated against *L. innocua* on agar plates.

Release of pediocin contained into films added with 16666, 33333 y 50000 AU/mL FFS was analyzed in distilled water at 10°C and in buffer solutions, at pH 4 to 7. WPI film forming solutions (FFS) were added with 25000 UA pediocin/mL of FFS and FFS; pH 2 to 9. Film antimicrobial activity was analyzed against *L. innocua*. CZ and WPI film topography was evaluated by scanning electron microscopy (SEM) for structural differences observed in CZ and WPI film surfaces, as affected by may affect the migration grade and antimicrobial effectiveness of pediocin. Finally, antimicrobial effectiveness of CZ and WPI coatings added with 1500, 6000 and 12000

UA pediocin/mL FFS was in an emulsified meat product, using *L. innocua* as indicator.

CZ and WPI films added with pediocin showed antimicrobial activity against *L. monocytogenes* strains Scott A, 48 and 82, as well as against *L. innocua*, but not against *L. monocytogenes* strain 47. Was necessary to add 833 and 3333 AU/mL FFS to CZ and WPI FFS, respectively, to produce films with some antimicrobial activity against *L. innocua* ATCC33090.

Release of pediocin contained in films with 16666, 33333, and 50000 UA/mL of SFP into distilled water was only detected in CZ but not in WPI films. However, when pediocin release was analyzed in buffer solutions, at pH between 4 and 7, it was observed that pediocin release improved at acid pH (<5) in both, CZ and WPI films. Finally, CZ films where the most effective to control *L. innocua* in both, *in vitro* and in a meat emulsion product.

Differences in antimicrobial activity as well as effectiveness to control *Listeria* growth in CZ and WPI films could be explain by interactions established between pediocin and film forming materials: hydrophobic interactions between pediocin and CZ and strong electrostatic interactions between WPI proteins and pediocin, together with specific topography characteristics observed in the different films.

Coatings and edible films made with CZ and WPI, added with a pediocin used successfully, to control, maintain, and improve the microbial quality of foods. However, the antimicrobial activity and the effectiveness of pediocin to control microbial growth of indicator microorganisms will depend on the nature of interactions established between the bacteriocin and the film forming materials, as well as on pH of the product of the product which they will be applied.

Key words: antimicrobial edible films, pediocin, corn zein (CZ), whey protein isolate (WPI), antimicrobial food packaging, pediocin, *Listeria monocytogenes*.

1. Introducción

Tradicionalmente, los empaques han sido útiles como una barrera “inerte” que protege a los alimentos frente al medio ambiente. Anteriormente, la selección de los mismos se realizaba considerando únicamente la estabilidad de los sustratos a los que protegían (Cha y Chinnan, 2004). Sin embargo, la demanda creciente por alimentos sanos, seguros y frescos dio origen al desarrollo de empaques que además brindar protección frente al medio ambiente, oxígeno y humedad, mantuvieran la calidad sensorial, nutricional y microbiológica del producto empacado (Han, 2000b; Ouatarra *et al.*, 2000). Esta nueva generación de empaques es conocida como “*empaques activos*” (Han, 2000a y b). Una versión de los empaques activos son los empaques con actividad antimicrobiana, los cuales pueden elaborarse mediante la adición de agentes antimicrobianos tales como ácidos orgánicos, antimicóticos (Han, 2000b), extractos de especias, bacteriocinas (Padgett *et al.*, 1998; Cha y Chinnan, 2005) y recientemente mediante la incorporación del sistema lactoperoxidasa (Min *et al.* 2005) o de la lactoferrina (Min y Krochta, 2005), entre otros. En este contexto, una gran parte de los reportes se enfocan en la incorporación de la nisina, lo cual probablemente se debe al hecho de ser la única bacteriocina aprobada para su uso en alimentos por la *Food Drug Administration* (FDA), desde 1988 (Cotter *et al.*, 2005). No obstante, existen otras bacteriocinas tales como la pediocina PA-1 la cual debido a su gran estabilidad frente al pH, temperatura, además de su actividad antilisteria (Ray *et al.*, 2001) posee un gran potencial para ser empleada en la bioconservación de carne y productos cárnicos (Cleveland *et al.*, 2001).

Por otra parte, *Listeria monocytogenes* es un microorganismo patógeno frecuentemente asociado con intoxicaciones por el consumo de alimentos. Este microorganismo es capaz de crecer bajo condiciones adversas tales como pH's

ácidos, bajas temperaturas (1°C), altas concentraciones de sales y altas temperaturas (Theivendran *et al.*, 2006). Las enfermedades generadas por la presencia de *L. monocytogenes* genera en Estados Unidos gastos cuantiosos de alrededor de 2.3 billones de dólares (Theivendran *et al.*, 2006). Esto resulta de gran importancia sobre todo para aquellas empresas mexicanas interesadas en la exportación de productos alimenticios a dicho país, debido a que se ha declarado “cero tolerancia” para la presencia de dicho microorganismo (Zu *et al.*, 2005).

Por otra parte, con el objeto de reducir la cantidad de desechos generados por los empaques sintéticos de los alimentos, recientemente los científicos han fijado su atención en el desarrollo de empaques, llámese películas o recubrimientos, biodegradables y/o comestibles a partir de polímeros naturales tales proteínas, incluyendo caseína, gelatina, soya, gluten, zeína y proteínas aisladas del suero de leche (Padgett *et al.*, 1998)

En este trabajo se evaluaron la actividad y la eficacia antimicrobiana de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133, la cual es similar a la pediocina PA-1 (Schneider *et al.*, 2005), una vez que ésta se incorporó en 2 matrices proteicas: a) aislado de proteína de suero de leche (APSL): soluble en agua, el cual produce películas transparentes, blandas, flexibles con excelentes propiedades mecánicas y de barrera frente al oxígeno y aromas a humedades relativamente bajas (Wu *et al.*, 2002); y b) zeína de maíz: un material con propiedades termoplásticas capaz de formar de formar microcápsulas, películas y recubrimientos fuertes, lustrosos, resistentes al ataque microbiano, insolubles en agua; con propiedades antioxidantes y capacidad de adhesión (Fu *et al.*, 1999).

Se analizó si la actividad antimicrobiana, migración hacia un medio líquido y eficacia en el control de *Listeria innocua*, tanto *in vitro* como en un sistema cárnico, eran afectadas por la naturaleza hidrofóbica de los materiales formadores de películas y el tipo de interacciones establecidas entre éstos y la pediocina, así como por la estructura superficial de las películas y el pH del medio de migración.

2. Justificación

La pediocina producida por *P. parvulus* MXVK133 presenta una gran estabilidad frente al pH y a la temperatura, y por ello, tiene un gran potencial para ser empleada como agente antimicrobiano en la conservación de alimentos. La incorporación esta bacteriocina en recubrimientos o películas comestibles, a diferencia de la adición directa, permitiría su liberación gradual y controlada disminuyendo los problemas de inactivación o insolubilización ocasionados por la presencia de proteasas, lípidos o por el pH de los alimentos (Hoffman *et al.*, 2001). Sin embargo, aunque existen varios trabajos en donde diversas bacteriocinas han sido incorporadas como agentes antimicrobianos en películas o recubrimientos comestibles (Cha y Chinnan, 2004), son escasos los trabajos en donde la pediocina, a pesar de su gran potencial bioconservante, haya sido empleada como agente antimicrobiano en la elaboración de películas y/o recubrimientos. Además no hay reportes en donde se analice de manera conjunta el efecto del pH del medio, la naturaleza de los materiales de película y topografía de las películas en la actividad antimicrobiana, migración y eficacia de la pediocina contenida en las películas y recubrimientos tanto “*in vitro*” como en un sistema cárnico modelo. De ahí que el estudio de dichos factores sea fundamental para establecer aplicaciones futuras en alimentos.

3. Revisión Bibliográfica

3.1 Nuevas tecnologías en empaques para alimentos

Desde sus inicios, el hombre instintivamente ha protegido a los alimentos. Se cree que los primeros empaques consistieron en hojas, piel de animales, conchas y huesos. En 1856 se elaboraron los primeros empaques a partir de celulosa y en 1907 el plástico fenol formaldehído (Bakelita) fue descubierto. A partir de este momento, una serie de descubrimientos e innovaciones dieron lugar a la gran diversidad de materiales de empaque empleados hoy en día (Miller y Krochta, 1997).

En un principio, los empaques habían contribuido al desarrollo de los sistemas de distribución. Sin embargo, esto ha cambiado debido a una demanda creciente por alimentos mínimamente procesados y con pocos aditivos, preferentemente naturales. En respuesta a esta demanda, ha surgido una nueva generación de empaques incluyendo los “empaques inteligentes” (Yam *et al.*, 2005) y los “empaques activos” (Suppakul *et al.*, 2003). Un “empaque inteligente” es un sistema que monitorea las condiciones de los alimentos empacados para dar información acerca del producto durante el transporte y el almacenamiento (Ahvenainen, 2000; Yam, *et al.*, 2005). Mientras que un “empaque activo” se define como un sistema de empaque en donde empaque, alimento y ambiente interaccionan para prolongar la vida de anaquel o mejorar la seguridad microbiológica o las propiedades sensoriales de un alimento (Suppakul *et al.*, 2003). Con base en lo anterior y de acuerdo con Yam *et al.* (2005), las funciones actuales de un empaque se pueden clasificar en 4 categorías que son: protección, presentar o informar al consumidor sobre el estado de los alimentos, conveniencia y contención (**Figura 3.1**).

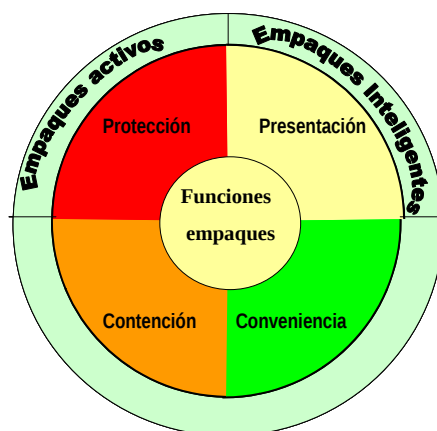


Figura 3.1 Funciones de los empaques según Yam *et al.* (2005)

Dentro de los empaques activos se encuentran los sistemas absorbedores y de liberación. Ejemplos del primer grupo son los “secuestradores de oxígeno”, absorbedores de humedad, y control de la generación de CO₂ y etileno (Suppakul *et al.*, 2003). Asimismo, existen sistemas absorbedores de malos olores como aminas y aldehídos; así como absorbedores de luz UV, entre otros. Los sistemas de liberación, incluyen emisores de CO₂, etileno, dióxido de azufre, sabores y pesticidas. Adicionalmente, existen sistemas liberadores de agentes antioxidantes y antimicrobianos (Ahvenaine, 2000). Éstos últimos pueden elaborarse mediante la adición ya sea de ácidos orgánicos y sus sales (Lungu y Johnson, 2005), lisozima, antibióticos, alcoholes (Han, 2000), sistema lactoperoxidasa (Min *et al.* 2005), la lactoferrina (Min y Krochta, 2005), aceites esenciales, y desde luego, bacteriocinas (Cha y Chinnan, 2005).

3.2 Empaques activos con actividad antibacteriana

3.2.1 Definición, modo de acción y clasificación

Dentro de la clasificación de los empaques activos, los empaques actividad antimicrobiana son los más prometedores (Suppakul *et al.*, 2003). Un empaque antibacteriano es un sistema capaz de inhibir microorganismos patógenos o causantes de deterioro que podrían contaminar a un alimento (Han, 2000a y b). Su mecanismo de acción se basa en la extensión de la fase de latencia y la reducción de la velocidad de crecimiento de los microorganismos, lo cual prolonga la vida de anaquel y mantienen la seguridad microbiológica de los alimentos (Han, 2000b). Los empaques antibacterianos se clasifican en 2 grupos: los que contienen un agente antibacteriano que migra hacia la superficie del alimento, o los que actúan sobre los microorganismos presentes en la superficie del alimento sin que el agente antibacteriano migre (Suppakul *et al.*, 2003).

3.2.2 Antecedentes

Los primeros reportes sobre la incorporación de bacteriocinas como compuestos antibacterianos “naturales” se realizaron en biopolímeros y corresponden a Cutter y Siragusa (1997) y a Ming *et al.* (1997). Cutter y Siragusa elaboraron un gel comestible a partir de alginato de calcio adicionado con nisina para inhibir el crecimiento de *Brochotrix thermosphacta* en carne molida. Estos mismos autores, un año antes, habían observado que la actividad de la nisina contra bacterias Gram positivas causantes del deterioro era mayor cuando la bacteriocina era inmovilizada en el gel de alginato, que cuando era aplicada directamente en la carne (Cutter y Siragusa, 1996). Por su parte, Ming *et al.* (1997) incorporaron las bacteriocinas nisina y pediocina en películas de celulosa las cuales fueron capaces de inhibir completamente el crecimiento de *L. monocytogenes* durante 12 semanas en pollo, jamón y carne de vacuno. A partir de este momento, surge un gran número de reportes y un año más tarde Padgett *et al.* (1998) demuestran que el espectro

inhibitorio de la nisina puede ampliarse contra bacterias Gram-negativas tales como *E. coli*, cuando dicha bacteriocina se adiciona en combinación con lisozima y EDTA en películas de zeína y aislado de proteína de soya.

La incorporación de bacteriocinas también se ha realizado en materiales de empaque sintéticos. En este sentido, Siragusa *et al.* (1999) y posteriormente Cutter *et al.* (2001) observan que la actividad de la nisina es retenida en un polímero sintético (nylon) el cual es útil para inhibir el crecimiento de *Lactobacillus helveticus* y *Brochotrix thermosphacta* en superficies de canales de vacuno. Más tarde, Scannell *et al.* (2000) incorporaron nisina y lacticina 3147 en un polímero de polietileno/poliamida y en celulosa. Natrajan y Sheldon (2000) incorporaron nisina, EDTA, ácido cítrico, tween 80 en polímeros sintéticos y en papel absorbedor de humedad de productos cárnicos para inhibir el crecimiento de *Salmonella tiphyurium* en piel y muslos de pollo. Posteriormente, Mauriello *et al.* (2004) elaboran películas de polietileno de manera industrial con actividad antilisteria mediante la adición de la bacteriocina producida por *Lactobacillus curvatus* 32Y.

Aunque la incorporación de compuestos antibacterianos puede realizarse tanto en materiales sintéticos como naturales, la atención se ha enfocado más hacia la incorporación de compuestos antibacterianos en biopolímeros, ya que éstos, además de funcionar como barreras selectivas contra la transmisión de gases, vapores, solutos, pueden proporcionar protección mecánica y funcionar como acarreadores de aditivos, antioxidantes, nutrientes y compuestos antibacterianos, además de que tienen la ventaja adicional de ser sustratos biodegradables (Wu *et al.*, 2002; Khwaldia *et al.*, 2004) (**Tabla 3.1**).

Existe una gran variedad de bacteriocinas con diferentes espectros de inhibición (Chen y Hoover, 2003), sin embargo la nisina es la bacteriocina de mayor aplicación en materiales de empaque ya sea sintéticos, biodegradables o comestibles. No obstante, para incrementar el espectro de inhibición de la nisina incorporada en ellos se han adicionado otros compuestos, incluyendo EDTA y ácidos orgánicos. Hofman *et al.* (2001) incorporaron EDTA, ácido láurico y nisina en películas de zeína las cuales fueron activas contra *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritis*.

Tabla 3.1. Ejemplos de la incorporación de agentes antibacterianos en películas y/o recubrimientos elaborados a partir de biopolímeros

Biopolímero	Agente antimicrobiano	Microorganismo Sensible	Referencia
Proteínas			
	Lactoferrina	<i>Penicillium commune</i>	Min y Krochta (2005)
Aislado de proteína de suero de leche	Sistema lactoperoxidasa	<i>Listeria monocytogenes</i>	Min et al., (2005)
	Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ko et al. (2001)
	Ácido p-aminobenzoico Ácido sórbico	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Salmonella tiphymurium</i> <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Cagri et al. (2001)
Zeína	EDTA, ácido laurico, nisina	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Salmonella enteritis</i>	Hoffman et al. (2001).
Aislado de proteína de soya	Lisozima Nisina EDTA	<i>Lactobacillus platarum</i> <i>Escherichia coli</i>	Padgett et al. (1998)
Zeína	Ácido cítrico Ácido láctico Ácido tartárico Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Escherichia coli</i> O157:H7 <i>Salmonella gaminara</i>	Eswaranandam et al. (2004)
Polisacáridos			
Na-alginato k-carragenina	Lisozima, nisina, extracto de semillas de uva, EDTA	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Salmonella enteritis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Cha et al. (2002)
Celulosa y derivados			
	Nisina	<i>Micrococcus luteus</i>	Sebti et al. (2003)
Hidroxipropilmetil-celulosa (HMPC)	Nisina	<i>Listeria innocua</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Sebti y Coma (2002)
	Nisina	<i>Listeria innocua</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Coma et al. (2001)
	Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Sebti et al.(2002)

Dawson *et al.* (2002), adicionaron nisina en combinación con ácido láurico en películas de soya para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en bologna de pavo. Asimismo, Cha *et al.* (2002) elaboraron películas de alginato de sodio y κ -carragenina adicionadas con EDTA y lisozima, nisina, y extracto de semilla de uva las cuales fueron activas contra *Micrococcus luteus*, *Listeria innocua*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Finalmente, Eswaranandam *et al.* (2004) incorporaron ácidos orgánicos y nisina en películas de soya las cuales fueron activas contra *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella gaminara*.

Existen varios estudios sobre la incorporación de compuestos antimicrobianos en una gran variedad de materiales formadores de películas y su actividad ha sido probada tanto en sistemas alimentarios como *in vitro* (**Tablas 3.1 y 3.2**). Sin embargo, existen pocos reportes relacionados con los factores que podrían afectar la actividad antimicrobiana, las propiedades mecánicas y de barrera así como la difusión de los agentes antimicrobianos adicionados. En este sentido, Ko *et al.* (2001) observaron que las películas elaboradas a partir de proteínas con mayor hidrofobicidad y en un ambiente ácido mostraron mayor inhibición contra *L. innocua*. Por su parte Leung *et al.* (2003) observaron un fenómeno similar, pero en películas de polietileno recubiertas con nisina.

Otro factor que puede afectar la actividad antimicrobiana y las propiedades mecánicas de las películas es la adición de lípidos, como una medida para disminuir la permeabilidad al vapor de agua. Padgett *et al.* (2000) observaron que las zonas de inhibición contra *Lactobacillus plantarum* así como la permeabilidad al vapor de agua disminuyeron inversamente proporcional con el nivel de ácido laurico adicionado a la solución formadora de películas. Mientras que Sebti *et al.* (2002) advirtieron que aunque la adición de 15% de ácido esteárico mejoraba las propiedades de barrera frente a la humedad en películas de hidroxipropilmetilcelulosa que contenían nisina; tanto la resistencia mecánica como la actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* y *S. aureus* se vieron reducidas con la adición de dicho compuesto.

Tabla 2. Películas y recubrimientos con antimicrobianos elaborados a partir de biopolímeros y su aplicación en la conservación de algunos alimentos

Biopolímero	Agente antimicrobiano	Microorganismo al que inhibe	Alimento	Referencia
Proteínas				
Aislado de proteína de suero leche	Sistema lactoperoxidasa Ácido p-aminobenzoico	<i>Listeria monocytogenes</i>	Salmón ahumado	Min <i>et al.</i> (2005)
		<i>Listeria monocytogenes</i>	Hot dogs	Cagri <i>et al.</i> (2003)
	Ácido p-aminobenzoico Ácido sórbico	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Escherichia coli</i> O157:H7 <i>Salmonella typhimurium</i>	bologna y salchichas	Cagri <i>et al.</i> (2001)
Aislado de proteína de suero leche/ caseinato de calcio	Ácido ascórbico	<i>Enterobacterias</i> <i>Pseudomonas</i>	Carne picada	Ouattara <i>et al.</i> (2002)
Aislado de proteína de soya	Nisina Ácido laurico	<i>Listeria monocytogenes</i>	Bologna de pavo	Dawson <i>et al.</i> (2002).
Zeína	Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i>	Salchichas	Lungu y Johnson (2005)
	Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i>	Pollo	Janes <i>et al.</i> (2002)
Polisacáridos				
Alginato de calcio	Nisina Ácido cítrico EDTA	<i>S. typhimurium</i>	Pollo	Natrajan y Sheldon (2000b)
	Nisina	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Carne molida	Cutter y Siragusa (1997)
Quitosano	Ácido acético Ácido propiónico	<i>Enterobacterias</i> <i>Serratia liquefaciens</i>	Productos cárnicos	Ouattara <i>et al.</i> (2000)
Celulosa y Derivados				
Metilcelulosa	Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i>	Tofu	Cha <i>et al.</i> (2003)
	Nisina/Lacticina 3147	<i>Listeria lactis</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Queso Jamón	Scannell <i>et al.</i> (2000)
Celulosa	Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i>	Jamón	Ming <i>et al.</i> (1997)
	Pediocina		Carne vacuno Pechuga de pavo	

No obstante, la migración de nisina de este tipo de películas puede incrementarse mediante la adición de cloruro de calcio (Sebti y Coma, 2002). Por otra parte, Sebti *et al.* (2003a) observaron que el grado de elongación, las características higroscópicas e hidrofílicas, así como la actividad antimicrobiana contra *Micrococcus luteus* en películas de hidroxipropilmetilcelulosa pueden ser afectadas por el grado de entrecruzamiento de dicho polímero.

La migración de una sustancia activa contenida en un empaque es un factor importante en el control del crecimiento de microorganismos en los alimentos (Choi *et al.*, 2001), por lo que resulta de interés el estudio de la migración de las sustancias antimicrobianas a los alimentos. En este sentido, Kim *et al.* (2000) sugieren que la actividad del agente antimicrobiano contenido en una película depende no solamente del grado de migración sino también de la naturaleza del medio en el cual se lleva a cabo ésta. Teerakarn *et al.* (2002) observaron que la difusión de la nisina contenida en películas de zeína y gluten de trigo depende de la naturaleza de la película, así como del método de formación de la misma y de la temperatura a la que se lleva a cabo la difusión. Dawson *et al.* 2003 y Cha *et al.* (2003) establecieron que tanto el tipo de proteína como el método de formación de las películas afectan la migración de nisina contenida en películas de zeína y gluten de trigo. Por su parte, Sebti *et al.* (2003b) advirtieron que la nisina contenida en películas de agarosa reacciona con dicho compuesto pero induce una retención parcial sobre la superficie de los alimentos, lo cual podría favorecer la liberación controlada de la nisina, por lo que podría ser útil en la inhibición de los microorganismos que crecen sobre la superficie de los alimentos. No obstante, deben realizarse varios experimentos para establecer los factores que afectan la actividad y migración de los compuestos antimicrobianos contenidos en las películas y recubrimientos para establecer el tipo de alimentos en los que pueden ser empleados.

3.2.3 Factores a considerar durante su desarrollo

De acuerdo con Han (2000a y b), la mayor parte de los sistemas de empaque se encuentran representados por: a) sistemas empaque/alimento y b) sistemas empaque/espacio de cabeza/alimento (**Figura 3.2**). En el primer caso, un alimento sólido o un líquido de baja viscosidad está en contacto con el material de empaque. Ejemplos de este tipo de empaques con los productos cárnicos listos para consumirse empacados o envueltos individualmente, en donde los compuestos antibacterianos contenidos en el sistema migran hacia el alimento a través de la difusión entre el material de empaque y el alimento. El segundo grupo se encuentra representado por alimentos empacados en empaques flexibles, botes, copas, latas y cartones. Aquí, la evaporación o la distribución equilibrada de una sustancia entre el espacio de cabeza y el material de empaque y/o el alimento son parte de los principales mecanismos de migración para estimular la distribución interfacial del agente antibacteriano (**Figura 3.3**). Adicionalmente, existen sistemas en los cuales sustancias antimicrobianas activas de grado no alimentario pueden incorporarse en el empaque sin la transferencia de éstas hacia el alimento (Quintavalla y Vicini, 2002).

Otros factores de relevancia en el diseño de un empaque con actividad antimicrobiana sobre los que se debe poner especial atención son: las condiciones de proceso de elaboración de los empaques, características de los compuestos antibacterianos y de los alimentos, las interacciones entre los agentes antimicrobianos y las sustancias e ingredientes formadoras de películas, la temperatura de almacenamiento, los coeficientes de transferencia de masa, las propiedades químicas y físicas de los materiales de empaque; así como el costo e inocuidad de los agentes antibacterianos (Suppakul *et al.*, 2003).

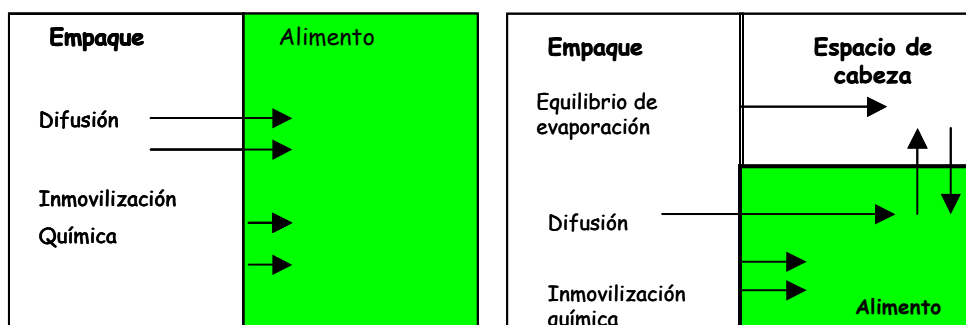


Figura 3.2. Sistemas de empaque de alimentos y los fenómenos de migración (Han, 2000).

3.2.3.1 Condiciones de proceso

La actividad antimicrobiana de los agentes antimicrobianos incorporados podría verse deteriorada durante el proceso de elaboración de los empaques ya sea por el empleo de extrusión, altas temperaturas, fuerza de cizalla y altas presiones. Asimismo, podría haber una pérdida de actividad durante la distribución y almacenamiento (Suppakul *et al.*, 2003; Han 2000a).

3.2.3.2 Interacción agentes antibacterianos-alimentos

El peso molecular, la carga iónica, pH y la solubilidad de los agentes antibacterianos empleados podría afectar la velocidad de migración y por tanto, la efectividad de los mismos (Suppakul *et al.*, 2003). El pH afecta el grado de ionización y la solubilidad de las sustancias antimicrobianas (Han 2000b; Quintavalla y Vicini, 2002; Suppakul *et al.*, 2003). Tal es el caso de la “nisina A” la cual se ha observado reduce su actividad antimicrobiana a valores de pH cercanos a la neutralidad (Cleveland *et al.*, 2001; Rollema *et al.*, 1995). De igual manera, la presencia de proteasas y lípidos propios de los alimentos, así como la actividad acuosa del alimento pueden modificar la actividad antimicrobiana de este tipo de compuestos (Hoffman *et al.*, 2001; Quintavalla y Vivini, 2002).

3.2.3.3 Temperatura de almacenamiento

Un incremento o disminución en las temperaturas de almacenamiento puede incrementar o disminuir la migración de los agentes activos contenidos en las películas (Quintavalla y Vicini, 2002). Adicionalmente, la combinación de tratamiento térmico, temperatura de almacenamiento y los agentes antimicrobianos contenidos en las películas pueden tener un efecto sinérgico sobre los microorganismos de interés (Han, 2000).

3.2.3.4 Propiedades fisicoquímicas

La adición de agentes con actividad antimicrobiana podría afectar de manera negativa la procesabilidad, maleabilidad, transparencia, permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno de los materiales de empaque (Quintavalla y Vicini, 2002; Suppakul *et al.*, 2003). Se ha observado que la transparencia de las películas plásticas puede disminuir con la adición de agentes activos (Quintavall y Vicini, 2002). Otras propiedades que podrían afectarse por la adición de agentes antimicrobianos son la permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno (Suppakul *et al.*, 2003).

3.2.3.5 Coeficientes de transferencia de masa

El control de la difusión y la velocidad de migración de los agentes antimicrobianos contenidos en los empaques es muy importante. Se puede emplear un modelo matemático de transferencia de masa para predecir la concentración del agente en la película/recubrimiento durante el tiempo (Suppakul *et al.*, 2003). Han (2000b) ha propuesto modelos que describen la migración de agentes antimicrobianos contenidos en sistema de empaque simples y de capas dobles o triples (**Figura 3.1**). Con estos modelos de transferencia de masa es posible calcular la concentración de agente activo por arriba de la concentración efectiva crítica, y por

lo tanto, la vida de anaquel del alimento (Quintavalla y Vivicini, 2002; Suppakul *et al.*, 2003).

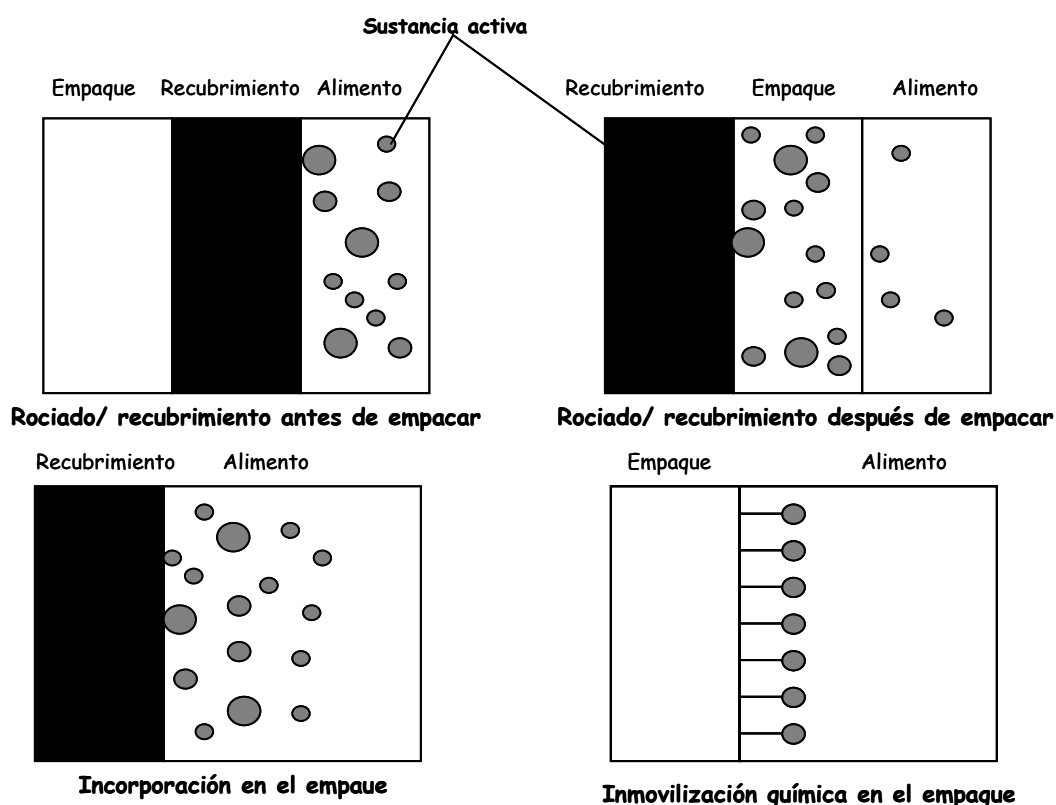


Figura 3.3 Migración de sustancias activas inmovilizadas en un empaque (Han, 2000b).

3.2.3.6 Inocuidad y legislación

Algunos agentes antibacterianos naturales incluyendo ácidos orgánicos tales como el acético, propiónico, benzoico, cítrico, etc.; bacteriocinas, como la nisina, y extractos derivados de plantas han sido aprobados como aditivos en ciertos alimentos. Por otra parte, recientemente la zeolita de plata AgIONTM y Zeomic® ha sido aprobada por la *Food Drug Administration* (FDA) para su uso en materiales que están en contacto con los alimentos. Sin embargo, en el 2003, en la Comunidad

Económica Europea, aún no existía legislación para el empleo de empaques inteligentes y/o activos (Suppakul *et al.*, 2003).

3.3 Películas y recubrimientos comestibles

3.3.1 Definición

Una película o un recubrimiento comestible se define como una capa delgada de material que puede ser ingerida por el consumidor. Puede ser aplicada sobre o entre los alimentos por inmersión, cepillado, rociado o enrollado (Wu *et al.*, 2002), y funciona como una barrera selectiva contra la transmisión de gases tales como el CO₂ y el O₂, vapores y solutos, además de proporcionar integridad mecánica y manejo de los alimentos (Krochta y Mulder-Johnson, 1997; Wu *et al.*, 2002). Además de sus propiedades de barrera, las películas y recubrimientos comestibles pueden actuar como acarreadores de aditivos funcionales para alimentos tales como antioxidantes, sabores, nutrientes y antimicrobianos (Wu *et al.*, 2002; Cha y Chinnan, 2004;)

Este tipo los materiales, a diferencia de los polímeros sintéticos, provienen de fuentes naturales y son biodegradables (Guilbert *et al.*, 1996). Adicionalmente, producen menos basura, son efectivos y pueden ofrecer protección al alimento una vez abierto el empaque (Cha y Chinnan, 2004). Sin embargo, es importante señalar que los materiales de empaque comestibles de ninguna manera pretenden sustituir a los sintéticos, ya que su utilidad se basa en su capacidad para actuar en conjunto para mejorar la calidad de los alimentos, extender la vida de anaquel y, de esta manera, mejorar la eficiencia de los materiales de empaque (Kester y Fennema, 1986).

3.3.2 Ventajas del empleo de películas y recubrimientos comestibles

Dentro de los problemas involucrados en la pérdida de calidad de carne y productos cárnicos se encuentran: pérdida de humedad, oxidación de lípidos, desnaturalización de proteínas y, consecuentemente, reducción de la capacidad de retención de agua; el deterioro de textura, aroma, sabor y color. De acuerdo con Gennadios *et al.*, (1997), la aplicación de recubrimientos comestibles a carne y productos cárnicos podrían ser de gran ayuda en el mejoramiento de la calidad de los mismos por las siguientes razones:

- a. Reducen la pérdida de humedad, con el consecuente impacto económico.
- b. Previenen la formación de exudado y la necesidad de emplear una capa de material absorbente en el fondo de charolas de poliuretano.
- c. Retardan de oxidación de lípidos y mioglobina, al emplear recubrimientos con baja permeabilidad al oxígeno.
- d. Pueden reducir la carga de microorganismos tanto patógenos como causantes de deterioro e inactivar parcialmente enzimas proteolíticas en la superficie de cortes de carnes rojas, pollo y pescado.
- e. Reducen la pérdida o absorción de compuestos volátiles que pueden deteriorar el sabor de la carne.
- f. Pueden servir como vehículo de agentes antioxidantes y antimicrobianos, minimizando el deterioro microbiano y la rancidez.
- g. Pueden mejorar la calidad nutricional de los productos fritos al reducir la cantidad de aceite que absorbe el producto durante el freído.

Los recubrimientos y películas comestibles elaboradas a partir de polisacáridos, se han aplicado con éxito para prolongar la calidad de carne fresca y congelada, y productos cocidos (**Tabla 3.3**). Se ha observado que los recubrimientos y películas elaborados a partir de geles de alginatos, solos o en combinación con almidón, reducen el encogimiento, la pérdida por goteo y la aparición de aromas indeseables en productos crudos y cocidos, mejorando el color y textura. Asimismo, el empleo de películas compuestas elaboradas a partir de emulsiones de agua en

aceite ha sido útil en la reducción de la deshidratación de carnes rojas, pollo y pescado congelados (Gennadios *et al*, 1997). Con respecto al empleo de proteínas como recubrimientos, Wu *et al*. (2000) reportaron que los recubrimientos de proteínas de gluten y soya fueron más efectivos para evitar la oxidación en productos cocidos que las películas plásticas.

Tabla. 3.3. Aplicación recubrimientos comestibles y sus funciones en algunos productos cárnicos (Krochta y De Mulder-Johnston, 1997)

Polímero	Producto	Función
Metilcelulosa	Pieza de pollo y cerdo	Mejorar adhesión en productos empanizados
Alginatos	Bistec de res	Mejorar textura y reducir pérdida de humedad
	Chuletas de cerdo	
	Muslos de pollo	Reducir pérdida de humedad
	Pescado	Reducción de crecimiento microbiano e incrementar la velocidad de enfriamiento
	Canales de cordero	Barrera contra el oxígeno
Carragenina	Cortes de carne de bovino	
	Pescado congelado	Protección contra desintegración mecánica; pérdida de humedad
	Trozos de pollo	Extensión de la vida de anaquel a bajas temperaturas
Proteínas del suero de leche	Piezas de pollo	Barrera contra el oxígeno
	Cubos de pollo liofilizado	Protección contra desintegración
	Salmón congelado	Acarreador de antioxidantes

3.3.3 Materiales empleados para su elaboración

Los empaques comestibles se pueden elaborar a partir de lípidos, polisacáridos, proteínas o mezclas de estos (Kester y Fennema, 1986). A continuación se describen las características más importantes de cada uno de ellos.

3.3.3.1 Polisacáridos

Los polisacáridos solubles en agua son cadenas largas de polímeros ampliamente utilizados en la industria alimentaria. Estos compuestos son no tóxicos y se encuentran ampliamente distribuidos. (Cha y Chinnan, 2004). Debido a su naturaleza hidrofílica, las películas elaboradas a partir de polisacáridos buenas propiedades de barrera frente al CO₂ y O₂ dentro de ciertas condiciones, pero pobres barreras frente al vapor de agua (Kester y Fennema, 1986; Gennadios *et al.*, 1997). No obstante, ciertos tipos de películas a base de estos compuestos podría proporcionar protección frente a la oxidación de lípidos y otros componentes (Kester y Fennema, 1986). Los alginatos, agar, dextrana, pectina, carragenina, almidón, almidones modificados, derivados de celulosa, varias gomas y quitosano son ejemplos de polisacáridos que pueden ser empleados para elaborar empaques comestibles (Kester y Fennema, 1986; Gennadios *et al.*, 1997; Krochta, 2002).

3.3.3.2 Lípidos

Dentro de los lípidos empleados para elaborar películas y recubrimientos comestibles se encuentran las ceras de abeja, candelilla y carnauba; los triglicéridos, monoglicéridos acetilados, ácidos grasos, alcoholes, y esterres de ácidos grasos de sacarosa. Asimismo, se encuentran en esta categoría las resinas de laca y terpenos (Krochta, 2002). Debido a su hidrofobicidad, los lípidos son empleados como una barrera al vapor de agua (Kester y Fennema, 1986; Gennadios *et al.*, 1997), siendo las películas elaboradas a partir de ceras los más resistentes al transporte de la humedad. Sin embargo, éstos generalmente no forman películas cohesivas por sí mismos (Krochta, 2002). Las películas o recubrimientos elaborados con ceras presentan problemas de control de homogeneidad, grosor, superficie grasosa y ruptura, además de sabor a cera y rancidez (Gennadios *et al.*, 1997).

3.3.3.3 Proteínas

Proteínas de origen animal y vegetal tales como el colágeno, la gelatina, las proteínas miofibrilares de pescado, la queratina, las proteínas del huevo, la caseína, las proteínas del aislado de suero de leche, la zeína de maíz, el gluten de trigo, la proteína de soya, la proteína de cacahuete, entre otras pueden emplearse para elaborar películas y/o recubrimientos comestibles (Krochta, 2002). Las películas y recubrimientos elaborados a partir de proteínas presentan buenas propiedades de barrera frente al O₂ y CO₂, pero no frente al agua (Cha y Chinann, 2004). Poseen entre 2 y 4 veces más permeabilidad al vapor de agua que empaques plásticos tales como el polipropileno, polietileno, poliéster y el PVC (Cho *et al.*, 2002; Gennadios *et al.*, 1997). Pese a lo anterior, podrían proporcionar buenas propiedades de barrera a los gases a humedades relativamente bajas (Cho *et al.*, 2002).

3.3.1.4 Agentes plastificantes

Los agentes plastificantes tales como glicerol, sorbitol, manitol, sacarosa, propilenglicol y polietilenglicol pueden ser incorporados en las películas y recubrimientos comestibles para modificar las propiedades mecánicas (Kester y Fennema, 1986). Su función es debilitar las fuerzas moleculares entre cadenas de polímeros adyacentes, mejorando las propiedades mecánicas de las películas y recubrimientos (Kester y Fennema, 1986; Krochta, 2002). Sin embargo, también disminuyen la capacidad de las películas y recubrimientos para actuar como barreras frente a la humedad, oxígeno y aromas (Krochta, 2002).

3.4 Características de algunas proteínas formadoras de películas y recubrimientos

3.4.1 Zeína de maíz

La zeína es la fracción prolamina de las proteínas del maíz (Cha y Chinnan, 2004). Es un material capaz de formar películas y recubrimientos fuertes, lustrosos, resistentes al ataque microbiano e insolubles en agua (Weller *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 1999; Padua y Wang, 2002) y por estas razones ha sido empleada comercialmente en formulaciones de coberturas de dulces y tabletas farmacéuticas (Cha y Chinnan, 2004).

3.4.1.1 Propiedades fisicoquímicas

La zeína comprende del 50-60% de las proteínas contenidas en el endospermo del maíz (Padua y Wang, 2003). En su forma pura es un polvo de color blanco, sin olor y sabor, y amorfo; sin embargo, las presentaciones comerciales presentan un color amarillo y un sabor suave (Fu *et al.*, 1999). Se cree que la alta proporción de aminoácidos no polares y la falta de grupos iónicos son los responsables de su naturaleza hidrofóbica y de sus características únicas de solubilidad. Su naturaleza hidrofóbica se debe a la presencia de grandes cantidades de aminoácidos hidrofóbicos tales como la leucina, la prolina, la alanina, y la fenilalanina, razón por la cual es soluble en etanol acuoso y en los solventes orgánicos polares como el propilenglicol y ácido acético (Fu *et al.*, 1999; Padua y Wang, 2002). Asimismo, es soluble en agua siempre y cuando el pH se encuentre por arriba de 11. La zeína es soluble en SDS y en altas concentraciones de urea. Las preparaciones comerciales de zeína presentan un punto isoeléctrico a pH 6.2. Es biodegradable, pero resistente al ataque de algunos microorganismos, además no es degradada por proteasas del tracto gastrointestinal y no es absorbida en el estómago. Presenta propiedades termoplásticas, flexibilidad y adhesión que pueden ser cambiadas por la adición de agentes plastificantes tales como grasas o ésteres.

Posee excelentes propiedades antioxidantes, presenta una fuerte capacidad de adhesión y es capaz de formar microcápsulas (Fu *et al.*, 1999).

3.4.1.2 Constitución y estructura

La zeína es una mezcla de varios grupos de proteínas y con base en su solubilidad y secuencias puede ser separada en 4 fracciones proteicas: α -zeína, β -zeína, γ -zeína (Padua y Wang, 2002) y zeína- δ (Fu *et al.*, 1999). Las preparaciones comerciales contienen principalmente α -zeína (Fu *et al.*, 1999). Constituye del 75 al 85% del total de las proteínas de la zeína y se encuentra integrada por 2 grupos de proteínas: Z19 y Z22, las cuales se encuentran conformadas por 210 y 245 aminoácidos cuyos pesos moleculares son 23-24 y 26-27 kDa, respectivamente (Padua y Wang, 2002).

Se ha sugerido que la zeína presenta 2 regiones: Una región hidrofóbica hidrocarbonada, integrada por residuos tales como la isoleucina, prolina y alanina que domina la parte final de la molécula y otra ligeramente polar abundante en ácido glutámico y tirosina. Esta dualidad podría explicar su afinidad por solventes de naturaleza similar tales como el etanol. Por otra parte, debido a que presenta algunos residuos polares tales como los grupos fenólicos iónicos de la tirosina, la zeína puede ser disuelta en algunos ácidos orgánicos incluyendo ácido acético, propiónico, y láctico, así como en amoníaco. Ésta razón es la misma por la cual la zeína también es soluble en agua a pH entre 11.3 y 12.7 y en soluciones concentradas de urea (Fu *et al.*, 1999).

3.4.1.2 Aplicaciones

La zeína recibió la denominación de sustancia “Generalmente reconocida como segura” (GRAS) por la Food Drug Administration (FDA), desde 1985. Comercialmente, ha sido empleada en forma de recubrimientos por industria farmacéutica para liberar de manera controlada ingredientes activos, así como para

enmascarar el sabor amargo de medicamentos suministrados oralmente (Weller *et al.*, 1998). En la industria alimentaria ha sido utilizada como barrera al oxígeno y lípidos, en dulces y productos de confitería (Padua y Wang, 2002) tales como palomitas de maíz, tomates, pavo cocido y cascarones de huevo (Fu *et al.*, 1999). Debido a sus características poliméricas y biodegradables presenta un gran potencial para ser empleada en el mercado de la comida rápida (Fu *et al.*, 1999) ya que su empleo en forma de recubrimientos ha sido útil para reducir la cantidad de aceite y la pérdida de humedad en productos fritos (Mallikarjunan *et al.*, 1997).

3.4.2 Películas de aislado de proteínas del suero de leche

El aislado de proteínas de suero de leche es un concentrado de proteínas que contiene cerca del 90% de proteínas del suero de leche (Khwaldia *et al.*, 2004). Con la adición de un agente plastificante (glicerol, sorbitol, etcétera), las proteínas del aislado de suero de leche producen películas comestibles, transparentes, blandas, flexibles y solubles en agua con excelentes propiedades mecánicas y de barrera al oxígeno, aromas, y aceites a humedades relativas bajas (Khwaldia *et al.*, 2004; Pérez-Gago y Krochta, 2002). Cuando la formación de las películas incluye la desnaturalización de las proteínas a través de la aplicación de calor, estas películas son también insolubles en agua y mejoran sus propiedades mecánicas. No obstante, debido a su naturaleza hidrofílica son barreras pobres frente a la humedad. A pesar de ello, la permeabilidad al vapor de agua puede disminuirse mediante la adición de lípidos (Pérez-Gago y Krochta, 2002).

3.4.2.1 Naturaleza de las proteínas del suero

Las proteínas del suero son aquéllas que permanecen solubles después de la coagulación de la caseína a pH 4.6 (Khwaldia *et al.*, 2004) durante la manufactura de queso o caseína. Representan el 20% de las proteínas totales de la leche. Son proteínas de naturaleza globular y termosensibles. Se encuentran integradas por

una mezcla de 5 grupos proteínas incluyendo la α -lactoalbúminas, β -lactoglobulinas, seroalbúmina bovina, inmunoglobulinas, lactoglobulinas y proteosa-peptonas (Khwaldia *et al.*, 2004; Pérez-Gago y Krochta, 2002).

La β -lactoglobulina comprende aproximadamente el 57% de las proteínas presentes en el suero. Se encuentra compuesta por 162 aminoácidos y posee un peso molecular de 18 300 Da. Es una molécula sensible al calor y al pH. A pH entre 5.1 y 7.5 la molécula existe en forma de un dímero, el cual se disocia a pH menor de 3 y por arriba de 8. A pH entre 3.5 y 5.2 el dímero se tetrameriza (Pérez-Gago y Krochta, 2002). Por arriba de 65°C, la estructura globular de la β -lactoglobulina se abre y expone sus grupos sulfhidrilo e hidrofóbicos; asimismo induce la oxidación de los grupos sulfhidrilo libres, intercambio de enlaces hidrofóbicos y sulfhidrilo. Estas reacciones pueden ser usadas para formar películas insolubles en agua (Kahwaldia *et al.*, 2004).

La α -lactoalbúmina comprende el 19% de las proteínas del suero. Es una proteína globular que contiene 123 aminoácidos, un peso molecular de 14 000 Da y 4 enlaces disulfuro. Esta proteína sufre cambios conformacionales a pH 4, relacionados con la pérdida de calcio. A pH entre 4 y 5 se encuentra de 2 formas con diferente estabilidad térmica. A pH 6.5 y a una temperatura de 62°C inicia su desdoblamiento, pero con enfriamiento, la molécula puede volver a su estructura nativa siempre y cuando los enlaces disulfuro no hayan sido dañados por el calentamiento (Pérez-Gago y Krochta, 2002).

La seroalbúmina bovina es una proteína globular que contiene 582 aminoácidos y un peso molecular de 66 000 Da. Representa el 7% de las proteínas del suero y contiene 17 enlaces disulfuro. Puede unirse a diferentes moléculas incluyendo ácidos grasos libres, otros lípidos y responsables del sabor, que estabilizan a la molécula contra la desnaturalización térmica (Pérez-Gago y Krochta, 2002).

Con respecto a las inmunoglobulinas y proteosopeptonas, se tiene que las primeras son una familia heterogénea de glicoproteínas de 150-1000 kDa con actividad de anticuerpos. La Inmunoglobulina más abundante es la inmunoglobulina

G, la cual comprende el 80% y se componen de 4 cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. Se desnaturaliza a temperaturas más altas que la β -lactoglobulina o la α -lactoalbúmina, pero son inestables en presencia de otras proteínas relacionadas con la actividad de grupos tiol. Finalmente, las proteosopeptonas son segmentos de la proteólisis de la β -caseína que contiene grupos superficialmente activos de fosfoglucopeptidos (Pérez-Gago y Krochta, 2002).

3.4.2.2. Aplicaciones

Las películas y recubrimientos de aislado de suero de leche han sido empleados para evitar la entrada de oxígeno y la rancidez de cacahuates tostados, pollo y salmón congelado (Pérez-Gago y Krochta, 2002)

3.5 Bacteriocinas de las bacterias lácticas

Las bacteriocinas son polipéptidos activos, sintetizados vía ribosomal por bacterias lácticas. Se caracterizan por presentar un efecto antagónico contra especies de microorganismos taxonómicamente relacionadas, ya sea patógenos y/o causantes de deterioro (Cotter *et al.*, 2005). Dentro de los géneros de bacterias lácticas productores de bacteriocinas se encuentran *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* (McMullen y Stiles, 1996).

El término “colicina” se asignó en 1925 a proteínas antibacterianas de alto peso molecular producidas por varias bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Ray *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005). Más tarde el término bacteriocina fue empleado para designar a los péptidos antimicrobianos producidos por bacterias lácticas. En 1953 la empresa inglesa Aplin & Barret en Dorset, Inglaterra lanzó al mercado un concentrado de nisina conocido como Nisaplin® (Delves-Broughton, 1990). En 1969, la nisina fue valorada como segura para su uso en alimentos por la *Food and Agriculture Organization /World Health Organization*. En 1983 fue incorporada en la lista de aditivos para alimentos de la Unión Europea (Cotter *et al.* 2005) y en 1988

fue aprobada por la *Food Drug Administration* (FDA) para ser usada en quesos fundidos pasteurizados (Chen y Hoover, 2003). En el 2001, su empleo ya había sido aprobado en 40 países, incluyendo México (Cleveland *et al.*, 2001).

3.5.1 Características generales

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas son péptidos pequeños que contienen entre 20 y 60 aminoácidos. Son moléculas catiónicas, hidrofóbicas o anfifílicas (Chen y Hoover, 2003). Presentan estructuras α -hélice o bien β -plegada y pueden ser ricas en tirosina o histidina, además de presentar puentes disulfuro, tioéter o grupos tiol libres (Ray *et al.*, 2001). Presentan puntos isoelectrónicos en un intervalo de pH 8.6 a 10.4 (**Tabla 3.4**).

Por otra parte, la actividad antibacteriana de las bacteriocinas es mayor a valores de pH ácidos. Estos compuestos son destruidos a pH por arriba de 10. Su carga neta varía con el pH. Debido a su naturaleza hidrofóbica presentan tendencia a agregarse, especialmente cuando se almacenan a altas concentraciones o durante periodos largos de tiempo. Son relativamente estables al calor, pero parcialmente destruidas por arriba de los 100°C, no se afectan por tratamientos con ácidos orgánicos (Ray *et al.*, 2001). Debido a su naturaleza proteica, se inactivan por proteasas incluyendo aquéllas de origen pancreático tales como la tripsina y α -quimotripsina, así como las de origen gástrico como la pepsina, de ahí que se inactiven durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidos como compuestos activos (Ray *et al.*, 2001). Con respecto al espectro de inhibición, su actividad está dirigida hacia especies Gram-positivas bajas en guanina y citosina. No obstante, pueden presentar actividad contra microorganismos Gram-negativos siempre y cuando haya sido dañada la integridad de su membrana (Cotter *et al.* 2005).

Tabla 3.4. Características de algunas bacteriocinas de bacterias lácticas (Ray *et al.*, 2001)

Bacteriocina	No. aminoácidos	PM (KDa)	pI	Cargas positiva a pH			
				4	5	6	7
Nisina A	34	3.5	10.1	5	5	3	3
Lacticina 481	27	3.8	NA	3	2	0	0
Lactocina S	37	3.9	NA	3	2	0	0
Pediocina AcH	44	4.6	9.6	6	6	3	3
Enterocina A	47	4.8	8.9	5	5	4	4
Divercina V41	43	4.5	8.6	3	3	3	3
Leucocina A	37	3.9	9.5	5	4	2	2
Sakacina A	41	4.3	10.0	4	3	3	3
Sakacina P	43	4.4	8.8	4	4	2	2
Carnobacteriocina B2	48	5.0	10.4	5	4	4	4
Lactococina B	47	5.3	9.1	4	3	2	2
Carnobacteriocina A	53	5.1	9.3	1	1	1	1
Lactococina A	55	5.8	8.6	4	4	1	1

*NA= no disponible.

3.5.2 Clasificación

Anteriormente, las bacteriocina se clasificaban en 3 o 4 grupos con base en su espectro de inhibición, mecanismo de acción, naturaleza proteica, estructura química, tamaño y resistencia a la temperatura y presencia de receptores sobre la superficie de la célula para la adhesión (McMullen y Stiles, 1996; Chen y Hoover, 2003). Sin embargo, recientemente Cotter *et al.* (2005) (**Tabla 3.5**) han propuesto una nueva clasificación que divide a las bacteriocinas en dos distintas categorías: las que contienen lantibióticos (clase I), y las que no contienen lantibióticos (clase II). En esta nueva clasificación se ha sugerido el nombre de “*bacteriolisinas*” para los péptidos antimicrobianos anteriormente clasificadas dentro de la clase III y que se caracterizan por poseer un peso molecular >30 kDa y que además son termolábiles. Otra característica de esta clasificación es que no se incluye a aquellos péptidos que

podrían clasificarse dentro de la clase IV, debido a que su existencia no ha sido totalmente demostrada.

Tabla 3.5. Esquema de clasificación de bacteriocinas sugerido por Cotter *et al*, (2005)

Clasificación		Observaciones	Ejemplos
Clase	Subclase Características		
Clase I			
Que contienen lacionina	11 subclases han sido propuestas	Incluye uno o dos péptidos lantibióticos	Un solo péptido: nisina, mersacidina, lacticina 481
Bacteriocinas/lantibióticos			Dos péptidos: lacticina 3147, citolisina.
Clase II	Ila: tipo pediocina Ilb: dos péptidos Ilc: cíclicas, formalmente clase V Ild: péptidos lineales no tipo pediocina	Clase heteróloga de péptidos pequeños	Clase IIa: pediocina PA1, Leucocina A Clase IIb: Lactacina F Clase IIc: enterocina AS48, reuterina 6
Bacteriolisinas ⁺		Proteínas grandes y termolábiles, muchas veces hidrolasas	Clase IId: lactococina A, divergicina A, Enterolisina A, Lisostafina
Proteínas no bacteriolíticas			

*Clase IV de bacteriocinas sin fracción proteica no son incluidas porque no han sido demostradas.

*Sugiere que éstas no son generalmente consideradas como bacteriocinas

3.5.2 Modo de acción

Las bacteriocinas poseen actividad bactericida y bacteriolítica y ejercen su acción contra bacterias Gram-positivas, las cuales pierden su viabilidad rápidamente incluso a concentraciones tan bajas como 0.01µg/mL (Ray *et al.*, 2001). Estas concentraciones pueden variar con la composición de lípidos en la membrana de la célula sensible y con el pH del medio (Cleveland *et al.*, 2001). Su actividad antibacteriana se atribuye a la desestabilización de las funciones de la membrana citoplásmica (Ray *et al.*, 2001). Particularmente los lantibióticos, inhiben a las células sensibles o blanco a través de la formación de poros en la membrana lo cual afecta al potencial transmembrana y/o el gradiente de pH (Cleveland *et al.*, 2001). Esto

afecta la permeabilidad ocasionando que moléculas pequeñas salgan del citoplasma y que el ATP no puede ser sintetizado (Ray *et al.*, 2001).

Las bacteriocinas de la clase I pueden inducir la formación de poros de acuerdo con el modelo de cuña, y las bacteriocinas clase II pueden funcionar creando poros tipo barril orientando péptidos paralelos a la superficie de la membrana (Chen y Hoover, 2003). Por su parte, los péptidos clase II tienen una estructura anfifílica y helicoidal, lo cual permite a éstas insertarse dentro de la membrana de la célula sensible, ocasionando la muerte celular (Holtz y Stahl, 1995; Cotter *et al.*, 2005).

Por otra parte, dado que las bacteriocinas son moléculas cargadas positivamente que poseen secciones hidrofóbicas, se ha observado que interacciones electrostáticas establecidas con los grupos fosfato, los cuales actúan como receptores primarios para las bacteriocinas, cargados negativamente sobre la célula sensible contribuyan para la unión inicial con las membranas para la iniciación de formación de poros (Cleveland *et al.*, 2001; Chen y Hoover, 2003). Asimismo, se cree que es probable que la porción hidrofóbica insertada dentro de la membrana forme poros (Cleveland *et al.*, 2001).

Finalmente, es importante hacer notar que los microorganismos productores de bacteriocinas también poseen genes que codifican para mecanismos de inmunidad, los cuales distinguen entre el microorganismo productor y el no productor (Cotter *et al.*, 2005). Esta inmunidad que presentan las bacterias bacteriocinogénicas contra sus propias bacteriocinas es un fenómeno que distingue a las bacteriocinas de los antibióticos (Cleveland *et al.*, 2001).

3.6 Pediocina

El término “pediocinas” se da a los péptidos antimicrobianos sintetizados vía ribosomal por bacterias lácticas del género *Pediococcus*, incluyendo especies tales como *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* y *P. parvulus*, las cuales se caracterizan por ser Gram-positivas, sin motilidad, facultativas y homolácticas. Algunas bacterias del género *Pediococcus*, aisladas de productos cárnicos, lácteos y vegetales, pueden

producir la misma pediocina, tal es el caso de la pediocina más estudiada y a la que nos referiremos a lo largo de este capítulo, es decir, la pediocina PA-1/AcH (Ray, 2000).

3.6.1 Estructura

La pediocina PA-1/AcH es una molécula de 44 aminoácidos con un peso molecular de 4628 Da. Carente de residuos de prolina, fenilalanina, leucina, ácido glutámico y arginina. Debido a la presencia de 4 lisinas y 3 histidinas es una molécula catiónica con pI 9.6; su carga neta varía con el pH del medio. Es una molécula hidrofóbica ya que presenta una gran proporción de aminoácidos no polares. Se cree que presenta 2 módulos funcionales, es decir una mitad N-terminal de carácter hidrofílico y la otra mitad C-terminal de naturaleza hidrofóbica o anfifílica. Asimismo, presenta 2 enlaces disulfuro (Martinez-Magro, 2000; Ray y Miller, 2000).

3.6.2 Propiedades fisicoquímicas

Las características fisicoquímicas de la pediocina son similares a las de otras bacteriocinas sintetizadas vía ribosomal de bacterias Gram-positivas, particularmente de aquellas llamadas como “bacteriocinas tipo pediocina” o “de la familia de las pediocinas” (Ray y Miller, 2002). Algunas de las características de la pediocina PA-1/AcH se muestran en la **Tabla 3.6**.

3.6.3 Solubilidad

La pediocina es soluble en soluciones acuosas diluidas. Sin embargo, debido a su naturaleza hidrofóbica las moléculas tienden a formar agregados, sobre todo si se encuentran en alta concentración y especialmente a valores de pH por arriba de 6.0 (Ray y Miller, 2002). Este fenómeno es más evidente en preparaciones semi-purificadas (Martinez *et al*, 2000a).

3.6.4 Factores que afectan la actividad de la pediocina

La pediocina resiste tratamientos térmicos de 80°C durante 60 minutos y de 100°C durante 10 minutos (Martinez *et al*, 2000a). Sin embargo, se desnaturaliza a 121°C durante 15 minutos, debido a la interacción con algunos componentes del medio y a la oxidación de las moléculas de metionina a sulfóxido de metionina ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$) El grado de inactivación dependerá de factores como el pH (Ray y Miller, 2002).

La actividad de la pediocina se ve afectada por la presencia de enzimas tales como quimotripsina, tripsina, ficina, papaína y proteasas:IV, IX, X, XIV y XIX. En general no son sensibles a las lipasas, amilasas, RNAasas (Ray y Miller, 2002), fosfolipasa C, catalasa, lisozima y DNAasas (Martinez *et al*, 2000^a). Asimismo, muestra gran estabilidad en un intervalo de pH de 3 a 9. También se ha observado que retiene totalmente su actividad después del tratamientos químicos con acetona (100%), cloroformo (80%), alcohol etílico (80%), hexano (80%), acetonitrilo (70%), EDTA (19 mM), SDS (1%) y TRIS (0.6M). En contraste, su actividad se ve reducida en presencia de 10% de formaldehído. Cationes tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Na^+ , no reducen la actividad de la pediocina. No obstante, los aniones como Cl^- , $(\text{PO}_4)^{3-}$ reducen su actividad bactericida (Ray y Miller, 2002) (**Tabla 3.6**).

Otro de los factores que podría afectar la actividad de la pediocina PA-1/AcH es la presencia de otras bacteriocinas. La eficacia de la pediocina PA-1/AcH puede ser aumentada cuando se usa en combinación de la nisina. Asimismo, se ha observado que la pediocina en combinación con nisina A pueden tener efecto sinergista y bactericida contra cepas estresadas de bacterias Gram positivas y Gram negativas patógenas y causantes de deterioro comúnmente presentes en alimentos. Otros compuestos que han mostrado incrementar la actividad antimicrobiana de la pediocina son el ácido láctico, el EDTA y la lisozima (Ray y Miller, 2002).

Tabla 3.6 Características fisicoquímicas de la pediocina PA-1/AcH (Ray, 2000)

Masa molecular: 4.6 kDa

Composición de aminoácidos

Punto isoeléctrico:	9.6	No polares:	25%
			Ausentes: Leu, Pro, Phe
Cargas:	pH>6 = 3+	Polares:	56.8%
	pH<6=6+	Ácidos :	2.3%
			Ausente: Glu
		Básicos:	15.9
			Ausente: Arg
		Cisteínas:	4
		Metionina:	1
Sensibilidad a enzimas	Enzimas que la hidrolizan: Quimiotripsina: 2,3,18,33 Tripsina/Tripsina K:1,11, 20,43 Termolisina: 6,15,24,25 Staph-V8:17	Estabilidad en solventes orgánicos:	Retiene 100% de su actividad en acetona (100%), cloroformo: 40%, isopropanol (80%), alcohol etílico (80%), hexano (80%), acetonitrilo (70%), EDTA (10 mM), SDS (1%) Tris (0.6M).
	Enzimas que no la hidrolizan: Tripsina R Trombina	Estabilidad frente a iones:	No reducen su actividad: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , P^{+} . Reducen su actividad Cl^{-} y $(\text{PO}_4)^{3-}$.
Sensibilidad a la temperatura:	Estables a 80°C/ 60 min. Parcialmente inactivadas a 121°C/ 15 min.	Estabilidad frente a presión hidrostática:	Resiste 345 Mpa (50 kPsi) por 30 min a 25°C
Tiempo y temperatura de almacenamiento	Retiene toda su actividad a -20°C por más de 6 meses en estado líquido o sólido.		

3.6.5 Estabilidad durante el almacenamiento

La actividad de la pediocina en medio de cultivo o parcialmente purificada en estado sólido o líquido es retenida totalmente durante 6 meses a -20°C (Ray y Miller, 2002) y en refrigeración (0-8°C) durante 12 semanas. Sin embargo, a 25°C la

actividad permanece estable durante las primeras 6 semanas y pero después de 12 semanas disminuye 50% (Martinez *et al.*, 2000a). En contraste, la pediocina liofilizada y empacada al vacío es relativamente más estable a temperatura ambiente. La pérdida de actividad en presencia de aire se asocia a la oxidación de la metionina (Ray y Miller, 2002).

3.6.7 Espectro de inhibición

La pediocina PA-1/AcH presenta un espectro de inhibición amplio contra bacterias Gram positivas, ya sea patógenos o causantes de deterioro, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringes*, *Cl. botulinum*, y varias especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Lactococcus*, al igual que bacterias Gram negativas incluyendo *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Serratia liquefaciens* y *Pseudomonas* sp. cuya permeabilidad de la membrana ha sido dañada por congelación, calentamiento suave, exposición a ácido acético o EDTA (Martinez *et al.*, 2000; Ray y Miller, 2002).

3.6.8 Aplicaciones y limitaciones

Aunque la pediocina PA-1/AcH es producida por microorganismos GRAS, y después de la nisina es la bacteriocina más estudiada, la FDA aún no le ha otorgado el estatus GRAS (Ray y Miller, 2002). No obstante, presenta un gran potencial para ser empleada como conservador en alimentos, especialmente en productos cárnicos (Cleveland *et al.*, 2001), pues a diferencia de la nisina A, que es menos soluble y activa cuando es expuesta a valores de pH cercanos a la neutralidad presentes en carne y productos cárnicos (Rollema *et al.*, 1995), la pediocina presenta una gran estabilidad en un amplio intervalo de valores de pH (Ray y Miller, 2002), además de presentar actividad antilistérica. En este contexto, se han realizado varios estudios en los cuales la pediocina ha sido efectiva en el control de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos, carne de vacuno, salchichas, extractos de carne y productos

cárnicos, así como en productos lácteos (Martinez *et al.*, 2000). Asimismo, el empleo de la pediocina producida por *Pediococcoccus parvulus* ha sido sugerido para el control de bacterias causantes de deterioro y patógenas en vegetales (Bennik *et al.*, 1997).

Uno de los factores que podrían limitar el empleo de la pediocina es su inactivación frente a enzimas proteolíticas presentes en los alimentos o ingredientes crudos necesarios para producir productos procesados. Sin embargo, este problema puede ser resuelto ya sea por la adición de altas concentraciones de bacteriocina, o por el empleo de pediocina encapsulada. Por otra parte, dado que se trata de una molécula hidrofóbica, ésta podrían acumularse en la interfase lipido-agua en un producto rico en grasa (Ray y Miller, 2002).

4. Hipótesis

Si la pediocina MXVK133 es un agente natural y estable en un amplio intervalo de pH y temperatura, entonces ésta puede ser incorporada en películas y recubrimientos comestibles de origen proteico conservando su actividad antimicrobiana, la cual dependerá de la facilidad con la que dicho compuesto migre hacia el medio de prueba; fenómeno que a su vez estará regido por el tipo de interacciones establecido entre la bacteriocina y los componentes de la matriz proteica así como de la estructura de las mismas y el pH del medio de prueba.

9. Perspectivas

Hasta aquí, los resultados mostrados en el cuerpo de esta tesis giraron en torno la incorporación de la pediocina como agente antibacteriano natural en películas y recubrimientos de zeína de maíz y APSL y los factores que afectan la migración y la actividad antimicrobiana de la pediocina contenida en ellos. Sin embargo, otro de los factores que se deben tomar en cuenta para la elaboración de películas y/o recubrimientos es el efecto que tienen los agentes antimicrobianos sobre las propiedades mecánicas y de barrera de las películas.

De acuerdo a lo antes expuesto, es preciso verificar que la actividad antimicrobiana de las películas no se vea disminuida por la adición de tales sustancias que podrían emplearse para mejorar las propiedades de barrera y mecánicas de las películas y recubrimientos elaborados a partir de APSL y zeína. Es por ello que en el Anexo I se presentan algunos resultados preliminares sobre el efecto que tiene la adición de pediocina sobre las propiedades mecánicas y de barrera frente a la humedad de las películas. Asimismo, se muestran algunos resultados sobre el efecto de la adición de cera de candelilla a películas de aislado de proteína de suero de leche sobre la permeabilidad al vapor de agua, propiedades mecánicas (resistencia a la tensión, porcentaje de elongación) y actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua*.

5. *Objetivos*

5.1 Objetivo general

Incorporar a la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133 en matrices proteicas de: a) zeína de maíz (soluble en etanol) o aislado de proteína de suero de leche (soluble en agua), y evaluar si la actividad antimicrobiana, grado de migración en medio líquido y la eficacia antimicrobiana de éstas es afectada por la naturaleza de las interacciones establecidas entre la pediocina y los materiales formadores de películas, pH del medio, así como por la estructura microscópica de las películas.

5.2 Objetivos particulares

- 5.2.1 Obtener un extracto de la pediocina producida por *P. parvulus* MXVK133.
- 5.2.2 Incorporar pediocina en películas de aislado de proteína de suero de leche y zeína y evaluar la actividad antimicrobiana de dichas películas contra *Listeria innocua* y contra 4 cepas de *Listeria monocytogenes*.
- 5.2.3 Determinar el efecto de la concentración de pediocina sobre la actividad antimicrobiana de las películas.

- 5.2.4 Determinar cuál es la concentración mínima de pediocina requerida para producir películas con actividad antimicrobiana.
- 5.2.5 Determinar en qué medida la migración de la pediocina en agua destilada, así como la eficacia de ésta en el control del crecimiento de *L. innocua* *in vitro* y en sistema cárnico son afectados tanto por la naturaleza de los materiales formadores de películas como por la estructura microscópica de las películas.
- 5.2.6 Determinar qué efecto tiene del pH del medio sobre el grado de migración de la pediocina contenida en películas de APSL y zeína de maíz.

6. Metodología

6.1 Materiales empleados para la elaboración de películas y/o recubrimientos

Se seleccionaron para este estudio 2 materiales formadores de películas con diferentes características hidrofóbicas: a) aislado de proteína de suero de leche (BiPro, Davisco Foods Intl. Inc., Le Sueur, Minn. E.U.A) y zeína de maíz (ZM) F-4000 grado regular (Freeman Industries, Tuckahoe, N.Y., E.U.A). Se utilizaron glicerol y etanol como agente plastificante y solvente, respectivamente (J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J., E.U.A.).

6.2 Microorganismos y medios de cultivo

Para el crecimiento de *Pediococcus Parvulus* MXVK133 (proporcionado por el Dr. Victor Kuri, de la Universidad de Plymouth), se empleó el medio caldo caseína glucosa (CGB). Por razones de seguridad, se empleó *Listeria innocua* ATCC33090 como microorganismo indicador en la mayor parte de los experimentos, ya que se trata de una cepa no patógena. Para su crecimiento se utilizó caldo de soya y tripticaseína (TSB), adicionado con 0.6% de extracto de levadura (Bioxon, Becton Dickinson, Edo Méx., México). Asimismo, se emplearon las cepas de *Listeria monocytogenes*: ScottA, LM911204/47 (LM47), LMB92000/48 (LM48), y LM82, las tres primeras proporcionadas por el Dr. F.M. Iniesta, de la Universidad de Murcia, y la última por el Dr. J.M. Uruburo, de la Universidad de Valencia, España. Para el crecimiento de dichas cepas se empleó caldo infusión cerebro corazón (Bioxon, Becton Dickinson, México).

Las cepas se conservaron en viales con 20% de glicerol a -80°C , en un ultracongelador Revco modelo ULTI386-7-AI14 (Revco, Acheville, E.U.A.). Antes de su utilización las cepas se reactivaron mediante 2 resiembras durante 18 horas, a

37°C. El conteo de *L. innocua* se realizó en agar selectivo *Listeria* “PALCAM” (Merck, Darmstadt, Alemania).

6.3 Producción, aislamiento y purificación de la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133

Pediococcus parvulus MXVK133, microorganismo aislado a partir de “chorizo tipo mexicano”, aislada por Victor Kuri (1998), se utilizó para producir la pediocina empleada a lo largo de esta tesis. La producción, extracción y purificación se realizó mediante el método de adsorción-desorción reportado por Yang *et al.* (1992), con ligeras modificaciones (Hernández-López, 2002). Para ello, a un litro de cultivo de *P. parvulus* en fase estacionaria temprana (12 horas) crecido en medio CGB se le ajustó el pH a 5.5. Después de aplicar un tratamiento térmico de 70°C durante 30 minutos para inactivar tanto a las células como a las proteasas presentes, el cultivo se mantuvo con agitación constante por un periodo de 4 horas a 4°C para favorecer la adsorción de la bacteriocina sobre las propias células de *P. parvulus*. A continuación, las células se colectaron por centrifugación a 15,000 x *g* durante 15 minutos a 4°C empleando para ello una centrífuga Beckman (Beckman J2-M1, Palo Alto California, E.U.A.). Una vez eliminado el sobrenadante, las células se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos 5 mM a pH 6.5 y posteriormente se resuspendieron en una solución de NaCl 100 mM a pH 2 (ajustado con ácido fosfórico al 5%) y se mantuvieron en agitación durante 10 horas, para permitir una máxima desorción de la bacteriocina. Posteriormente, las células se removieron nuevamente por centrifugación y el extracto libre de células obtenido se esterilizó con una membrana de microfiltración PVDF (di-floruro de polivinilideno, Millipore, Irlanda), con un tamaño de poro de 0.22 µm. El filtrado obtenido se dializó contra agua destilada durante aproximadamente 24 h, y con varios recambios hasta eliminar completamente las sales, utilizando un tubo de diálisis con tamaño de corte de 1000 kDa (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, E.U.A.). Finalmente, el extracto

obtenido se deshidrató empleando una liofilizadora Labconco modelo 77510 (Labconco Corporation., Kansas City, Missouri, E.U.A.).

6.3.1 Cuantificación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de la bacteriocina producida por *P. parvulus* MXVK133 se evaluó mediante el método de difusión de pozos de agar reportado por Bhunia *et al.* (1988) con ligeras modificaciones. Para ello, sobre una capa de 10 mL de agar TSB (1.5% de agar, adicionado con 0.5% de extracto de levadura se colocó una capa de agar suave (0.8% agar) de 10 mL del mismo medio, previamente inoculado con un cultivo fresco de *L. innocua* (10^5 - 10^6 UFC/mL). Una vez solidificada la capa de agar suave, se hicieron pozos de aproximadamente 6 mm de diámetro, los cuales posteriormente se llenaron con 30 μ L de diluciones seriadas realizadas de dos en dos del extracto semi-purificado de la bacteriocina. A continuación, las cajas se mantuvieron a 4°C durante 4 h para permitir la difusión de la bacteriocina en el agar, y posteriormente se incubaron por un periodo de 24 h a 37°C. La actividad de la bacteriocina, expresada en unidades arbitrarias (UA/mL), se calculó como el inverso de la más grande dilución que produjo un halo de inhibición de al menos 2 mm de diámetro, sobre la capa de agar suave que contenía al microorganismo sensible.

6.4 Elaboración de las soluciones formadoras de películas (SFP)

Se seleccionaron 2 materiales formadores de películas con diferentes características hidrofóbicas para el estudio: a) aislado de proteína de suero de leche, soluble en agua y b) zeína de maíz, soluble en etanol.

Las películas de zeína de maíz (ZM) se prepararon con base en el método descrito por Hoffman *et al.* (2001) con ligeras modificaciones. Para ello, 6.75 g de ZM se disolvieron en 40.6 mL de etanol al 98% con agitación lenta. Posteriormente, se adicionaron 1.9 g de glicerol como agente plastificante. La mezcla se llevó a

ebullición y se mantuvo así durante 5 minutos para reducir la formación de burbujas durante el vertido en placa. El pH final de la solución formadora de películas fue 6.75, a temperatura ambiente.

Las películas de aislado de proteína de suero de leche (APSL) se elaboraron disolviendo 7 g de dicho compuesto en 93 mL de agua destilada. Una vez disuelto el APSL, el pH se ajustó a 8.0 con NaOH 1.0 N, para favorecer la formación de las películas (Khwaldia *et al.*, 2004). A continuación, la mezcla se llevó a 90°C durante 30 minutos (Ko *et al.*, 2001). Posteriormente, se adicionó glicerol (3.5 g), como agente plastificante y finalmente la mezcla se homogenizó a 12,000 rpm durante 1 minuto empleando un biohomogenizador M133/1281-0 (Biospect Products Inc, Bartlesville, Suiza). Estas condiciones fueron previamente estandarizadas para asegurar la máxima estabilidad la bacteriocina.

6.5 Preparación de películas con actividad antimicrobiana

Se adicionaron diferentes niveles de pediocina, previamente disueltos en 500 µL de una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM a pH 7.0 a 10 mL de las distintas soluciones formadoras de películas (SFP) hasta obtener la concentración de bacteriocina deseada para cada experimento (0, 50, 100, 208, 416, 833, 1 666, 3 333, 6 666, 8 333, 16 666, 33 333, o 50 000 UA/mL de SFP). Posteriormente, volúmenes de 2.5 mL de dichas soluciones se vertieron en cajas Petri (50 mm de diámetro x 10 mm de profundidad) y se colocaron en una campana de flujo laminar durante 18-24 horas a temperatura ambiente para permitir el secado y la formación de las películas. Las muestras control se elaboraron sin la adición de bacteriocina. Una vez formadas las películas éstas se despegaron cuidadosamente, se cortaron en secciones circulares de 6 mm de diámetro (24.27 mm²) y se almacenaron a 4°C hasta su uso. El espesor de las mismas se determinó empleando un micrómetro digital modelo 293-815 (Mitutoyo, Japón). El espesor de las películas se reportó como el promedio de 10 mediciones tomadas al azar en diferentes secciones de las películas.

6.6 Determinación de la actividad antimicrobiana de las películas por el método de difusión de agar

La determinación de la actividad antimicrobiana de las películas con y sin pediocina, se realizó mediante el método de difusión en agar con algunas modificaciones. Para ello, se colocaron secciones circulares de películas (obtenidas como se mencionó en 6.5) sobre una capa de agar suave previamente inoculado con *Listeria innocua* (preparado como en 6.3.1). A continuación, las cajas se mantuvieron a 4°C durante 4 horas para permitir la difusión de la bacteriocina contenida en las películas. Después de 24 horas de incubación a 37°C, las zonas de inhibición se midieron empleando un escalímetro. El área de inhibición se calculó restando el área de la película del área total de inhibición. La diferencia se reportó como área de inhibición (mm²), tal y como lo determinaron Padgett *et al.* (1998).

6.7 Actividad antibacteriana de películas de zeína y APSL adicionadas con pediocina contra algunas cepas de *Listeria monocytogenes*

La actividad antibacteriana de las películas que contenían 16,666 UA de la pediocina (actividad probada contra *L. innocua*)/mL SFP también se probó contra las siguientes cepas de *L. monocytogenes*: Scot A, 47, 48 y 82, por medio del método de difusión de agar (igual que en 6.6). Se empleó caldo infusión cerebro corazón (BHI) tanto para el crecimiento de los microorganismos como para la realización de las pruebas de difusión. Las áreas de inhibición contra las distintas cepas se determinaron de la misma forma que se indicó en 6.6.

6.8 Estudios sobre la migración de la pediocina contenida en películas de APSL y zeína en medio acuoso

Una parte fundamental para la acción antimicrobiana de los compuestos incorporados en materiales de empaque es la migración de éstos hacia la superficie de los alimentos. Por otra parte, debido a que en un futuro los recubrimientos con la

bacteriocina en estudio pudieran emplearse para asegurar la calidad microbiológica no sólo de alimentos sólidos, sino líquidos, se realizó el estudio de la migración de la bacteriocina contenida en las películas hacia un sistema líquido simple como agua. Posteriormente se estudió el efecto del pH sobre el grado de migración de la bacteriocina.

6.8.1 Migración en agua

Las películas empleadas en esta sección se elaboraron a partir de soluciones formadoras de películas que contenían 16 666, 33 333 y 50 000 UA/mL SFP. La migración de la bacteriocina contenida se evaluó sumergiendo secciones circulares de películas de 6 mm de diámetro de ZM y APSL en tubos que contenían 1 mL de agua destilada. Los tubos se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm a 10°C, empleando para ello una incubadora con agitación orbital modelo G24 (New Brunswick Scientific, Inc., Nueva Jersey, E.U.A.). La concentración de bacteriocina liberada hacia el agua durante el tiempo se determinó mediante la técnica de difusión en agar. Las áreas de inhibición generadas por las soluciones se midieron y la concentración de bacteriocina se calculó empleando la ecuación de regresión obtenida a partir de la curva estándar de áreas de inhibición vs log de la concentración de bacteriocina (Dawson *et al.*, 2003) elaborada como a continuación se señala:

6.8.2 Elaboración de la curva patrón

La curva estándar de áreas de inhibición vs logaritmo de la concentración de la bacteriocina se elaboró preparando una solución patrón. Diez miligramos de extracto liofilizado de bacteriocina se disolvieron en 1 mL de agua destilada. A partir de ésta solución, se prepararon diluciones (0.004-5 mg/mL) a las cuales se les determinó la actividad antimicrobiana mediante la técnica de difusión de agar. Para ello, 30 µL de las distintas diluciones de bacteriocina se colocaron en pozos

elaborados sobre una capa de agar suave previamente inoculado con *L. innocua* de la misma forma como se indicó en 6.3.1. Después llevada a cabo la difusión en el agar durante 4 h a 4°C, las cajas se incubaron durante 24 horas a 37°C. La actividad antimicrobiana de las distintas diluciones se determinó midiendo las zonas de inhibición generadas contra *L. innocua*. La curva estándar se obtuvo trazando una gráfica de áreas inhibición (mm²) contra el logaritmo de la concentración de bacteriocina, y la ecuación de regresión obtenida se empleó para calcular la concentración de bacteriocina liberada hacia el agua durante el tiempo.

6.8.3 Efecto del pH sobre la migración

Para estudiar el efecto del pH sobre la difusión de la bacteriocina en medio acuoso, secciones de películas de 6 mm de diámetro elaboradas a partir de soluciones formadoras de películas adicionadas con 25 000 UA de bacteriocina/mL SFP se sumergieron en microtubos que contenían 1 mL de soluciones amortiguadoras de buffer de citratos 10 mM para pH 4 y 5, o fosfatos para pH 6 y 7. La determinación de la concentración de bacteriocina liberada de las películas hacia el medio de prueba durante el tiempo, se determinó de igual manera que en 6.8.1 y 6.8.2.

6.9 Efecto del pH de las SFP de APSL sobre la actividad antimicrobiana en medio semi-sólido

Con el objeto de determinar si las interacciones electrostáticas establecidas entre el APSL y la bacteriocina eran las responsables de una menor difusión de la pediocina contenida en las películas de APSL en comparación con la observada por las películas de zeína, se llevó a cabo la migración a varios valores de pH. Para ello, las películas se elaboraron empleando básicamente las mismas proporciones y métodos señalados en 6.4, sólo que en este caso, el pH de las SFP se ajustó a valores de pH de 2 a 9 antes de aplicar tratamiento térmico de 90°C durante 30

minutos. A continuación, se adicionaron 25, 000 UA de bacteriocina VKMX133/mL de SFP. La actividad antimicrobiana de las películas se determinó por difusión en agar, como se describió en la sección 6.6.

6.10 Evaluación de la efectividad de las películas para reducir una población de *L. innocua* en suspensión

Pensando en el que la aplicación de las películas y/o recubrimientos podría lograrse no sólo para el control de microorganismos sobre la superficie de alimentos sólidos, sino que además podrían emplearse para el control microorganismos en alimentos líquidos tales como la leche o jugos, se llevó a cabo la evaluación de la efectividad de distintas concentraciones de bacteriocina contenida en películas de ZM y APSL para controlar una población específica de *Listeria innocua*. Para ello, 10 mL un cultivo de 12 h de *L. innocua* se centrifugó a 1 500 x g por 15 minutos. El sobrenadante se desechó y las células se lavaron dos veces con 10 mL de agua peptonada al 0.1% (Padgett *et al.*, 2000). Posteriormente, las células se colectaron nuevamente por centrifugación y se resuspendieron en 99 mL de agua peptonada (0.1%) para obtener finalmente una suspensión que contenía 10^8 UFC/mL *L. innocua*. Posteriormente, secciones circulares de película de 6 mm de diámetro se sumergieron en tubos que contenían alícuotas 1 mL de la suspensión celular de *L. innocua*. Los tubos se mantuvieron con agitación constante a 100 rpm por 24 h a 10°C, para simular condiciones de abuso de la temperatura. Finalmente, la cuenta viable de *Listeria* se determinó por medio de cuenta en placa empleando placas de agar selectivo para *Listeria* (PALCAM) las cuales se incubaron a 35-37°C durante 48 h. Las muestras control se elaboraron empleando películas que no contenían bacteriocina.

6.11 Análisis de la estructura de las películas por microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis estructura de las películas de ZM y APSL, se analizó mediante microscopía electrónica de barrido en películas elaboradas a partir de SFP que contenían 16 666 UA/mL de pediocina, como en muestras que no contenían dicho compuesto. Secciones de película de 10 x 15 mm se fijaron durante 24 h a 4°C con una solución de glutaraldehído (Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri., E.U.A.) al 5%, disuelto en una solución amortiguadora de fosfatos (20 mM, pH 7.4). A continuación, las muestras se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos 20 mM a pH 7.4 hasta quedar libres del olor a glutaraldehído, y posteriormente se trataron con tetraóxido de osmio (Sigma Chemical Co., San Luis Missouri., E.U.A.) al 2% durante 2 h. Posteriormente, se secaron hasta punto crítico empleando CO₂ (73 atm, 31°C), en un secador Samdri-780B (Tousimis, Research Co., Rockville, E.U.A.). Las muestras fijadas y secadas fueron recubiertas con una capa de oro de 25 nm de espesor empleando un evaporador al vacío (Bal-Tec, Liechtenstein). Finalmente, la superficie así como cortes transversales se observaron y analizaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-5900 LV (Tokio, Japón).

6.12. Efecto de la concentración de bacteriocina en el control de *Listeria innocua* en un sistema cárnico.

Muestras de salchichas de aproximadamente 10 g de se inocularon por inmersión durante 5 minutos en una suspensión celular que contenía 10⁸ UFC de *L. innocua* (preparada como s indica en 6.11). Consecutivamente, las muestras se mantuvieron en una campana de flujo laminar durante 15 minutos para permitir su secado y a continuación se sumergieron durante 5 minutos en soluciones formadoras de películas de zeína de maíz o de aislado de proteína de suero de leche, las cuales contenían 0, 1 500, 6 000 o 12 000 UA de bacteriocina/ mL SFP. Posteriormente, las muestras se colocaron en la campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir el secado de los diferentes

recubrimientos sobre la superficie de las salchichas. Luego, las muestras se empacaron al vacío y se almacenaron por 30 días a 10°C, para simular condiciones de abuso de temperatura. La población de *Listeria* se determinó durante el almacenamiento empleando para ello agar selectivo para *Listeria* (PALCAM), como se indica en la sección 6.1.

6.13 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces, y los datos obtenidos se analizaron empleando análisis de varianza (ANOVA). La comparación de medias se realizó por el método de Duncan empleando para ellos en el programa estadístico SPSS para Windows (SPSS 8.0 Inc., Chicago, Illinois., E.U.A). El nivel de significancia establecida fue de $p \leq 0.05$.

7. Análisis y discusión de resultados

7.1 Producción y actividad de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133 en las diferentes etapas

Uno de los pasos fundamentales para la realización de esta investigación fue la producción y purificación parcial de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXKV133 por el método de adsorción-desorción sobre células productoras (Yang *et al.*, 1992). Los autores de este método sugieren que su empleo podría ser útil para recuperar por arriba del 98% de la bacteriocina total producida por bacterias lácticas. En este caso, después de 2 extracciones solamente se logró recuperar el 19.5% de la actividad inicial (**Tabla 7.1**).

Tabla 7.1 Actividad de la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133 durante las diferentes etapas de extracción por el método de adsorción-desorción

Etapas de extracción	Actividad ^a (%)
Extracto antes de adsorción	1.33×10^6 (100%)
Extracto después de adsorción	3.33×10^5 (25 %)
Después de desorción de células	3.33×10^5 (25%)
Retenido en las células después de desorción ^b	6.66×10^5 (50 %)
Extracto liofilizado ^c	2.59×10^5 (19.5%)
UA/g de materia seca	3.33×10^6

^a Los porcentajes se calcularon tomado como 100% la actividad del cultivo inicial. *Listeria innocua* se empleó como microorganismo sensible.

^b Actividad total con relación a 1 litro de medio de cultivo, sobrenadantes y células del medio de cultivo.

^c El extracto semi-purificado y liofilizado se disolvió en agua.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede inferir que gran parte de la bacteriocina podría haberse retenido en las células de *Pediococcus parvulus* ($\approx 50\%$) y otra parte importante en el extracto libre de células (25%), así como en la membrana de diálisis ($\approx 5.5\%$). No obstante, se logró obtener un extracto en forma concentrada y con una actividad de 3.33×10^6 UA/mg (**Figura 7.1**), y con la ventaja de ser libre de sales, lo cual resultaba de gran importancia ya que la presencia de éstas podría afectar la formación de las películas al adicionarse el extracto.

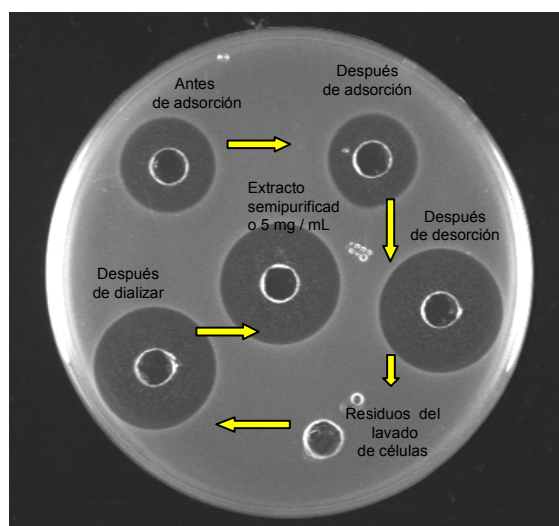


Figura 7.1. Halos de inhibición generados contra *L. innocua* por la pediocina producida por *P. parvulus* en las diferentes etapas de obtención

7.2 Descripción visual de las películas

El aislado de proteína de suero de leche (ASPL) dio origen a películas transparentes mientras que la zeína originó películas opacas y de color amarillo. Las películas de APSL presentaron una mayor flexibilidad que las películas de zeína; sin embargo, en ambos casos, la adición de pediocina produjo películas ligeramente más opacas y menos flexibles, sobre todo cuando se adicionaron niveles de bacteriocina por arriba de 16,666 UA/mL de solución formadora de película (SFP)



Figura 7.2. Películas elaboradas a partir de aislado de proteína de suero de leche (APSL) y zeína de maíz. Foto A: Izquierda, APSL; derecha, zeína. Foto B, APSL.

7.3 Actividad antilisteria de películas de APSL y zeína adicionadas con pediocina

En la **Figura 7.3**, se muestra la actividad de películas de APSL y zeína adicionadas con 16666 UA/ mL SFP de pediocina contra varias cepas de *L. monocytogenes* (extremos) y *L. innocua* (centro). Se observa que ambas películas mostraron inhibición contra las cepas de *L. monocytogenes* Scott A, ML48, LM82 y *L. innocua* pero no contra *L. monocytogenes* cepa LM47. En este contexto, se sabe que algunas especies Gram-positivas y cepas pueden ser insensibles a la pediocina. En tales bacterias aunque la pediocina puede adsorberse sobre la pared celular, usualmente se adsorben en menor cantidad que en el caso de las cepas sensibles debido al bajo nivel de moléculas aniónicas en la pared celular del microorganismo de interés. Otra razón podría ser la presencia de una baja proporción de fosfolípidos en la superficie de la membrana (Ray y Miller, 2000). Adicionalmente, el desarrollo de células mutantes ocasionado por alteraciones en la pared celular, incluyendo cambios en la composición de los ácidos grasos de la membrana (Chi-Zang, et al., 2003).

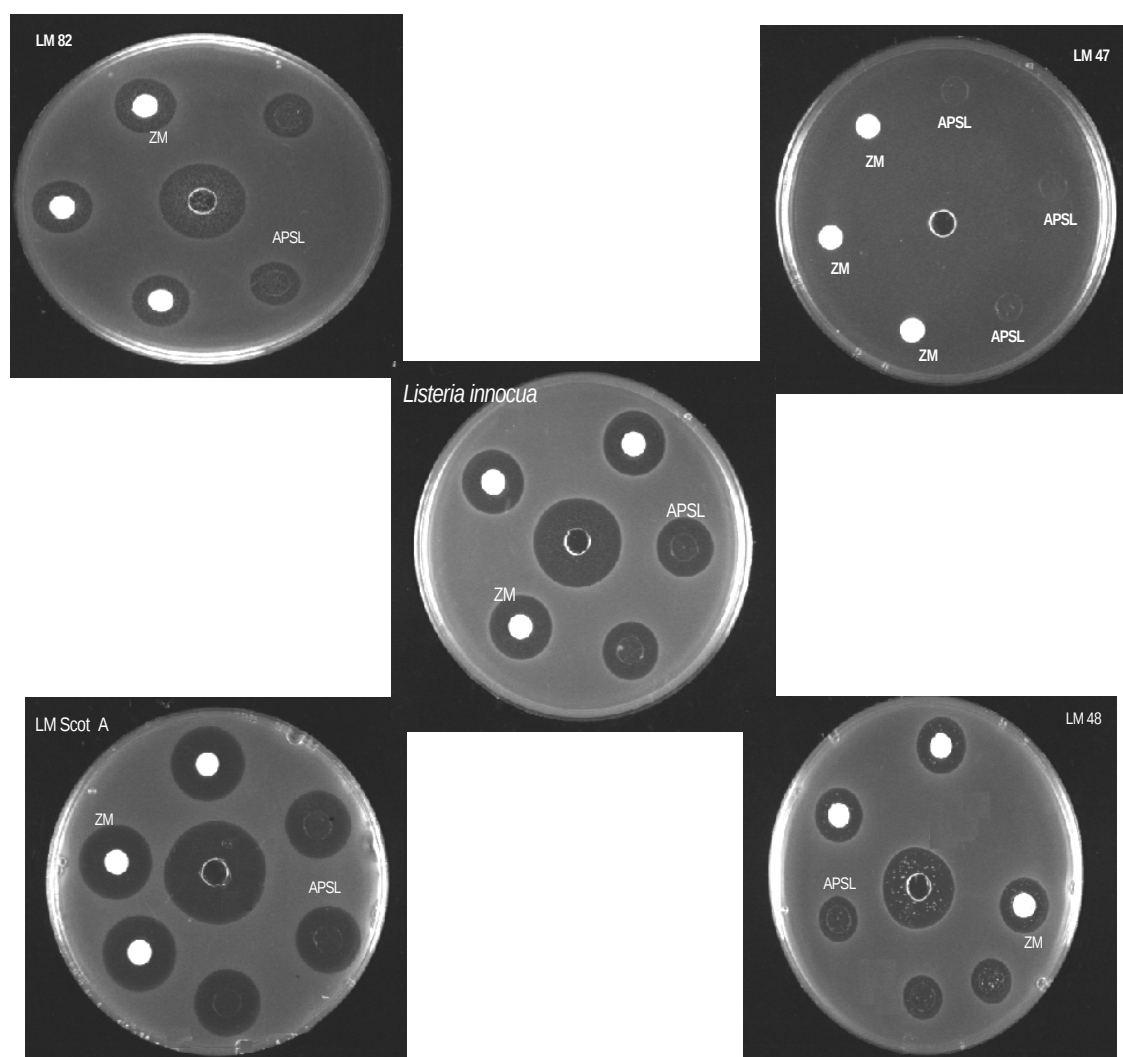


Figura 7.3. Actividad antilisteria de películas de aislado de proteína de suero de leche (APSL) y zeína de maíz (ZM) con 16 666 UA pediocina/mL SFP. *Listeria monocytogenes* LM82, LM47, Scot A LM Scot A y LM48; y *L. innocua* (centro), Pozo central: 30 μ L solución de bacteriocina concentración 16666 UA/mL.

Resulta de gran importancia el hecho de que las películas adicionadas con pediocina hayan mostrado inhibición contra algunas cepas de *Listeria monocytogenes*, ya que se trata de un microorganismo patógeno que puede causar listeriosis, la cual se presenta ya sea como meningitis o como infecciones

intrauterinas en mujeres embarazadas. En este último caso, puede presentar síntomas muy leves al inicio pero usualmente termina en aborto o nacimiento prematuro que en ocasiones causa la muerte del neonato (20-40%) (Cañas-Urbina *et al.*, 2000).

Por otra parte, mientras que México la contaminación de alimentos con *L. monocytogenes* no se considera que tenga un impacto social importante (Cañas-Urbina *et al.*, 2000), sí debe ser tomado en cuenta por las industrias que exportan alimentos a los Estados Unidos. En este contexto, un reporte del 2002 reportó que la listeriosis fue la responsable de cerca de 2500 casos, lo cual trajo consigo una pérdida monetaria a ese país de 200 millones de dólares (Zu *et al.*, 2005). Los reportes provenientes de éste país (Zu *et al.*, 2005) indican claramente que los productos cárnicos curados y no curados frecuentemente se contaminan con *Listeria monocytogenes* durante etapa post-proceso, especialmente los alimentos listos para consumirse debido a que: a) tienen larga duración, b) pueden proliferar durante el almacenamiento a temperaturas de refrigeración y en presencia de sales de cura, y c) porque *Listeria* spp puede generar resistencia múltiple debido a la adquisición de un replicón proveniente del género *Staphylococcus* (Zu *et al.*, 2005).

Por todo lo anterior, resulta de suma trascendencia que las películas adicionadas con la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133 hayan presentado actividad contra un microorganismo de naturaleza ubicua como lo es *L. monocytogenes*, pues les da un gran potencial para su aplicación en alimentos. Esto es de gran importancia económica para las industrias exportadoras sobre todo en estos momentos en los cuales el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) ha establecido una política de “cero tolerancia” para *Listeria monocytogenes* en productos listos para consumirse (Zu *et al.*, 2005).

Por otra parte, se observó que el tipo o naturaleza del material de película en general, afectó la actividad antimicrobiana. Se observó que las películas de zeína de maíz formaron halos de inhibición significativamente mayores ($p \leq 0.05$) que los generados por películas de APSL con la misma concentración de bacteriocina. En cuanto al grado de inhibición, éste fue diferente para cada cepa. Las mayores áreas

de inhibición se produjeron sobre *L. monocytogenes* Scott A seguidas por *L. innocua*, *L. monocytogenes* LM48 y *L. monocytogenes* LM82 (**Tabla 7.2**).

Finalmente, con base en los peligros antes señalados que podría implicar el trabajar con un microorganismo patógeno tal como *L. monocytogenes*, a partir de este momento y por razones de seguridad, los experimentos se realizaron empleando como microorganismo indicador a *Listeria innocua* ATCC33090, una cepa no patógena, la cual, al igual que *L. monocytogenes* cepas Scott A, LM82 y LM48, presentó sensibilidad frente a la pediocina incorporada en películas de zeína y de APSL.

Tabla 7. 2. Actividad antilisteria de películas de aislado de proteína de suero de leche (APSL) y zeína adicionadas con 16 666 UA /mL SFP de pediocina

Microorganismo	Clave	¹ Áreas de inhibición (mm ²)	
		Material de película APSL	Zeína
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090	<i>Listeria innocua</i>	128.82 ^b (±4.60)	171.11 ^b (±8.55)
<i>Listeria monocytogenes</i> LMB92000/48	LM48	70.25 ^a (±23.74)	116.54 ^b (±18.23)
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	LM Scot A	187.65^c (±7.59)	241.74^c (±2.86)
<i>Listeria monocytogenes</i> 82	LM82	68.49 ^a (±6.92)	107.02 ^b (±2.05)
<i>Listeria monocytogenes</i> LM911204/47	LM47	³ NI	NI

¹-Áreas de inhibición generadas alrededor de las películas.

²-Promedios de áreas de inhibición con diferente letra en la misma columna, son significativamente diferentes (p<0.05, n=3). Promedios de 3 experimentos por separado.

³NI=No- inhibición, no se produjeron zonas de inhibición.

7.4 Efecto de la concentración de bacteriocina en las películas

7.4.1 Efecto sobre el espesor

En general, las películas de zeína presentaron espesores promedio notablemente mayores que las películas APSL (Tabla 7.3).

Tabla 7. 3. Efecto de la concentración pediocina en películas de zeína de maíz y aislado de proteína de suero de leche sobre el espesor y las áreas de inhibición contra *Listeria innocua*.

Concentración de pediocina (AU/mL SFP)	Materiales formadores de películas			
	Zeína de maíz		Aislado de proteína de suero de leche	
	Espesor (mm)	Área de inhibición ^A (mm ²)	Espesor (mm)	Área de inhibición (mm ²)
0	0.186 ± 0.040 ^a	NI ^B	0.091 ± 0.021 ^a	NI
416	0.189 ± 0.015	NI	0.095 ± 0.018 ^{ab}	NI
833	0.193 ± 0.050 ^a	13.55 ² ± 6.80 ^a	0.093 ± 0.015 ^{ab}	NI
1666	0.181 ± 0.009 ^a	43.06 ± 11.66 ^a	0.094 ± 0.010 ^{abc}	ILV ^C
3333	0.188 ± 0.007 ^a	73.89 ± 10.42 ^b	0.101 ± 0.027 ^{abcd}	28.79 ± 15.71 ^a
5000	0.195 ± 0.016 ^a	106.61 ± 12.24 ^c	0.111 ± 0.030 ^{bcd}	45.16 ± 14.62 ^a
6666	0.196 ± 0.010 ^a	136.46 ± 27.20 ^c	0.113 ± 0.024 ^{bcd}	49.54 ± 31.71 ^a
8333	0.195 ± 0.014 ^a	176.51 ± 14.96 ^d	0.114 ± 0.015 ^{cd}	34.81 ± 25.38 ^a
16666	0.183 ± 0.015 ^a	212.65 ± 32.64 ^e	0.119 ± 0.020 ^{de}	85.93 ± 6.00 ^b
33333	0.176 ± 0.021 ^a	255.38 ± 8.72 ^f	0.136 ± 0.013 ^{ef}	118.85 ± 13.15 ^b
50000	0.194 ± 0.019 ^a	297 ± 16.10 ^g	0.145 ± 0.017 ^f	118.72 ± 6.68 ^b

^A-Promedios de áreas de inhibición generadas alrededor de las películas.

^{a-g}-Promedios de áreas de inhibición con diferente letra en la misma columna, son significativamente diferentes (p≤0.05).

^BNI= No se produjeron zonas claras de inhibición.

³ILV= Inhibición ligeramente visible.

⁴SFP= Solución formadora de películas.

Con respecto a los espesores de las películas de zeína, éstos no se incrementaron significativamente con la adición de diferentes concentraciones de bacteriocina, en tanto que las películas de APSL mostraron una relación más compleja. Se observó que películas de APSL con concentraciones de bacteriocina por debajo de 5000 UA/mL no presentaron diferencia significativa en sus espesores

($p>0.05$) con respecto al control. Sin embargo, películas con más de 5 000 UA/mL presentaron espesores significativamente mayores que el control. De igual manera, no hubo diferencia significativa entre las películas que contenían entre 5000 UA/mL y 16666 UA/mL. Tampoco se encontró diferencia entre las películas que contenían 33333 y 50000 UA/mL.

7.4.2 Efecto sobre la actividad antimicrobiana

Las películas control (sin pediocina) de zeína y APSL no produjeron zonas de inhibición contra *Listeria innocua* (**Figura 7.4, Tabla 7.3**). Asimismo, de acuerdo con los niveles de bacteriocina empleados en este experimento, se observó es necesario adicionar al menos 833 y 3 333 UA/ mL SFP de bacteriocina a las SFP de zeína y APSL respectivamente, para producir películas con actividad antimicrobiana contra *L. innocua*, en medio semisólido (**Figura 7.4, Tabla 7.3**). En términos generales, las áreas de inhibición de las películas de zeína se incrementaron significativamente ($p<0.05$) a mayor concentración de bacteriocina. Sin embargo, la relación no fue lineal ya que la actividad de las películas de APSL como de zeína mostraron una relación logarítmica con la concentración de pediocina (**Figura 7.6a**). Sin embargo, en ambos casos se observó una relación lineal a concentraciones de pediocina entre 833 y 8333 UA/mL SFP para las películas de zeína ($r^2=0.9929$; **Figura 7.6b**, izquierda); y entre 3333-6666 UA/mL SFP para las películas de APSL ($r^2=0.9353$; **Figura 7.6b**, derecha). Este comportamiento lineal de dosis-respuesta a concentraciones bajas de bacteriocinas tales como la nisina también fue observado por Leung *et al.*, (2003) para la nisina incorporada en películas sintéticas. Con respecto a la pediocina producida por *P. parvulus* MXVK133, estudios preliminares mostraron que la curva dosis-respuesta para la pediocina presentaba una relación lineal a bajas concentraciones (Hernández-López, 2002). Finalmente, el hecho de que la actividad antimicrobiana de la pediocina no se incrementara de manera lineal por arriba de 8333 UA/mL tal vez podría deberse al fenómeno de agregación el cual se presenta en soluciones concentradas de bacteriocinas (Ray y Miller, 2001).

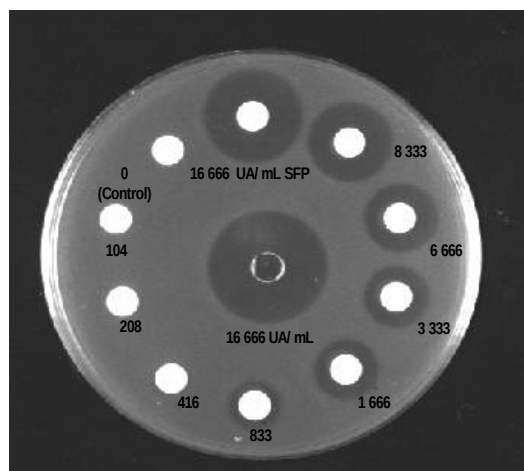


Figura 7.4. Efecto de la concentración de pediocina en películas de zeína de maíz sobre la actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua*. (Halo del centro: 30 µL de pediocina 16666 UA/mL).

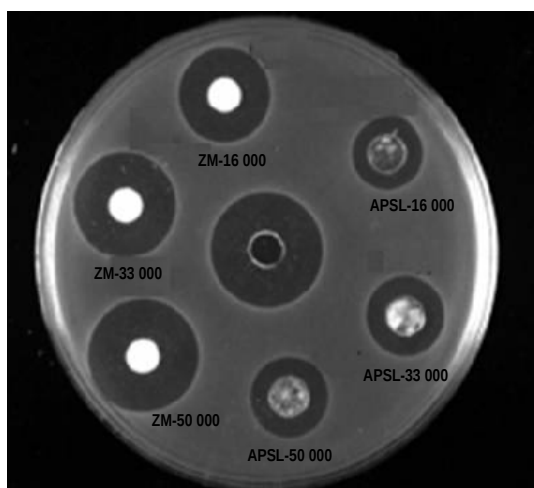
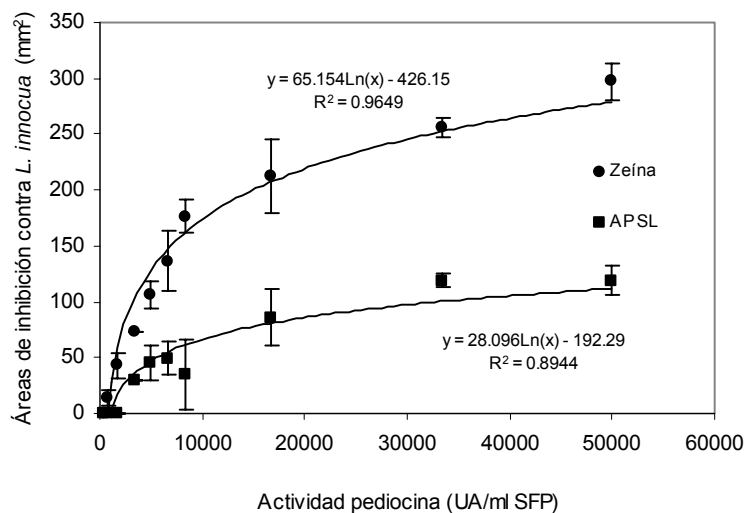


Figura 7.5. Actividad antimicrobiana contra *Listeria* de películas de zeína de maíz (ZM) y aislado de proteína de suero de leche (APSL) con 16666, 33333 y 50000 UA/mL SFP de pediocina. (Halo del centro: 30 mL de pediocina 16666 UA/mL)

a)



b)

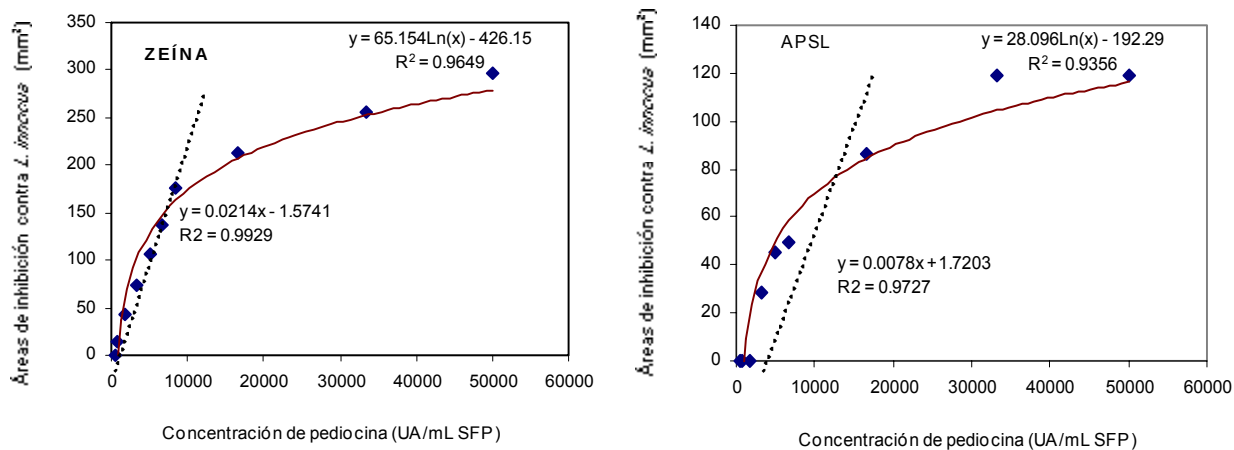


Figura 7.6. Zonas inhibición generadas contra *L. innocua* por películas de aislado de proteína de suero de leche y zeína adicionadas con diferentes concentraciones de pediocina (Las barras (Figura a) representan la desviación estándar. En la figura b) líneas continuas representan el ajuste a modelo logarítmico en tanto que las líneas discontinuas representan el ajuste de una porción de las curvas a un modelo lineal).

El que en general, las películas de zeína produjeran zonas de inhibición contra *L. innocua* significativamente mayores que las películas de aislado de proteína de suero de leche, sugiere el establecimiento de diferentes tipos de interacciones entre la bacteriocina y los diferentes materiales formadores de películas.

Algunas cepas de *Pediococcus parvulus* pueden producir cepas con idéntica secuencia de aminoácidos que la pediocina PA-1/AcH (Bennick *et.al.*, 1997; Ray y Miller 2000). Los resultados sobre la caracterización parcial de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133 sugieren que se trata de una bacteriocina de la clase II de las pediocinas (Schneider *et al.*, 2005) y, que al igual que otras bacteriocinas de las bacterias lácticas, debe tratarse de un péptido hidrofóbico de naturaleza catiónica (Ray *et al.*, 2001), el cual de acuerdo con Schneider *et al.* (2005) presenta un punto isoeléctrico de 8.65.

Por otra parte, la zeína presenta una alta proporción de aminoácidos no polares y una marcada falta de aminoácidos no iónicos (Fu *et al.*, 1999). La solución formadora de películas de zeína control presentó un pH de 6.57, y la adición creciente de bacteriocina disminuyó el pH de las soluciones formadoras de películas, el cual fue de 6.13, 5.36 y 5.33 en de las películas que contenían 16666, 33333 y 50000 UA/mL de SFP, respectivamente. Por lo tanto, es probable que se hayan establecido interacciones débiles de tipo hidrofóbico entre la bacteriocina y los aminoácidos no polares de la zeína lo cual favoreció la liberación de la pediocina en una concentración suficiente para generar halos de inhibición de tamaño considerable.

Por su parte, el aislado de proteína de suero de leche (APSL) se encuentra compuesto por diferentes grupos de proteínas globulares que en su estado nativo son solubles en agua. Sin embargo, el calor empleado durante el proceso de formación películas, promueve la desnaturalización y el desdoblamiento de las mismas. Asimismo, se exponen tanto grupos hidrofóbicos como sulfhidrilos lo cual induce la oxidación de los grupos sulfhidrilos libres, así como la formación de enlaces disulfuro y enlaces hidrofóbicos. Estas reacciones en su conjunto dieron como resultado que las películas de APSL sean insolubles en agua (Khwaldia *et al.*, 2004).

Las proteínas del aislado de suero poseen una marcada naturaleza aniónica. Sin embargo, ello depende en gran medida del pH, ya que a valores de entre 4 y 5, las proteínas que lo integran alcanzan su punto isoeléctrico y por lo tanto, la carga neta de las mismas es de cero (Ko *et al.*, 2001). De igual manera, a valores de pH por arriba del pI la carga neta será negativa, mientras que a valores por debajo de este punto será positiva. En este experimento, el pH de las soluciones formadoras de películas de APSL se ajustó a 8.0, no obstante, la adición de la pediocina en concentraciones crecientes produjo una ligera disminución del mismo a valores de 6.66, 6.45 y 6.32 para las SFP con 16 666, 33 333, y 50 000 UA/mL, respectivamente, dando como resultado que la carga neta de las proteínas sea negativa. Por otra parte, sabiendo que el pI de pediocina es de 8.65, entonces es muy probable que a estos valores de pH la bacteriocina se haya encontrado cargada positivamente. De ahí que probablemente interacciones electrostáticas fuertes establecidas entre el APSL y la bacteriocina, hayan sido las responsables de mantener a la bacteriocina unida firmemente a las proteínas del APSL, lo cual dio como resultado una menor liberación de la misma hacia el medio de prueba.

7.5 Migración de la pediocina en agua

Con respecto a la migración de la bacteriocina contenida en las películas, se observó que ésta puede ser afectada por la naturaleza de los materiales formadores de películas, así como por las interacciones establecidas entre éstos y el compuesto antibacteriano adicionado. Aunque para la realización de este estudio se emplearon películas con altas concentraciones de bacteriocina (16666, 3333 y 50000 UA/mL SFP), la migración de ésta hacia el agua logró ser detectada únicamente para películas de zeína. En este caso, como ya se explicó en el inciso 7.4, posiblemente la mayor parte de la bacteriocina se mantuvo fuertemente unida a las películas de APSL, mediante el establecimiento de interacciones electrostáticas. De ahí que, aún cuando bajos niveles de bacteriocina se hayan liberado al agua, es posible que

éstos hayan sufrido un efecto de dilución, tal y como lo observaron Grower *et al.* (2004) en experimentos en donde la nisina se incorporó a materiales de empaque.

La cantidad inicial de pediocina presente en las películas de zeína y el porcentaje liberado en agua destilada durante un periodo de 48 h a 10°C se muestra en la **Tabla 7.4**. Para una mejor descripción y análisis de la migración de la bacteriocina contenida en las películas de zeína se asignaran los códigos: C-16, C-33 y C-55 para las SFP de zeína adicionadas con 16 666, 33 333 y 50 000 UA de bacteriocina /mL.

Tabla 7.4. Porcentaje de pediocina liberada de películas de zeína en agua destilada a 10°C durante 48 h.

Concentración de bacteriocina UA/ mL SFP (UA/ mm ² película)	Clave película	Tiempo de migración (horas)						
		0.5	1	2	4	8	24	48
16 666 (20.20)	CZ-16	15.27 ^{1,2,3, Aa} (± 7.44 ^{Aa})	13.16 ^{Aa} (± 5.04)	12.67 ^{Aa} (± 6.70)	14.08 ^{Aa} (± 3.59)	11.24 ^{Aa} (± 5.04)	12.58 ^{Aa} (± 6.72)	10.00 ^{Aa} (± 3.19)
33 333 (46.65)	CZ-33	46.63 (± 9.43) ^{Bb}	40.00 ^{ABa} (± 28.98)	50.97 ^{Bb} (± 24.83)	60.73 ^{Bb} (± 12.61)	57.12 ^{Bb} (± 17.35)	38.10 ^{ABb} (± 10.48)	19.03 ^{Aa} (± 9.84)
50 000 (65.15)	CZ-50	33.70 ^{Ab} (± 19.11)	82.83 ^{Bb} (± 28.44)	90.34 ^{Bc} (± 33.81)	91.17 ^{Bc} (± 22.76)	46.74 ^{Ab} (± 10.07)	41.45 ^{Ab} (± 11.90)	38.37 ^{Ab} (± 15.00)

¹ Promedio ± desviación estándar (n=5)

² La concentración de bacteriocina liberada se calculó a partir de curva de Log concentración de bacteriocina vs áreas le inhibición contra *L. innocua*

³ El porcentaje de pediocina liberada se calculó restando de bacteriocina inicial la bacteriocina liberada.

^{A-B} Promedios en un mismo renglón (a diferentes tiempos) seguidos por diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes. Comparación de medias Duncan (p≤0.05).

^{a-c} Promedios en una misma columna seguidos por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes. Comparación de medias Duncan (p≤0.05)

En contraste con lo observado en las películas de APSL, la bacteriocina contenida en películas de zeína migró en suficiente cantidad para ser cuantificada

mediante el método empleado. Esta mayor liberación probablemente se debió al establecimiento de interacciones hidrofóbicas débiles entre la zeína y la bacteriocina.

De acuerdo con la literatura, factores tales como el tipo de proteína, método de formado (Dawson *et al.*, 2003), naturaleza de los materiales y temperatura (Teerakarn *et al.*, 2002), así como el tipo de interacciones establecidas entre los materiales de película y los compuestos antibacterianos adicionados (Cha *et al.*, 2003) entre otros, pueden afectar de manera significativa la migración de estos últimos en medio líquido. Con respecto a la naturaleza y tipo de interacciones establecidas entre los compuestos antibacterianos tales como la nisina y los materiales formadores de películas, Cha *et al.* (2003) observaron que la liberación de nisina era menor cuando se incorporaba en películas de una mezcla κ -carragenina/celulosa que de quitosano/metilcelulosa a pH 7.0. Los autores atribuyen este comportamiento al establecimiento de fuertes interacciones electrostáticas entre la κ -carragenina y la nisina. Teerakarn *et al.* (2002), al incorporar nisina en películas de zeína y de gluten, observaron que las películas de zeína presentaron una menor difusión de nisina en agua y una mayor retención de dicho compuesto. Estos autores explicaron que tal comportamiento se debe a la hidrofobicidad de la zeína en comparación con el gluten. Todo esto basado en el hecho de que debido a su hidrofobicidad, la nisina presenta tendencia a agregarse, formar grandes complejos y adherirse a superficies hidrofóbica, como en este caso lo sería la zeína.

Al analizar las películas C-16, se advierte que gran parte de la bacteriocina (entre 85-90%) se mantuvo unida a la matriz proteica de zeína. Asimismo, se observa que entre el 11 y 15% de la bacteriocina inicial contenida en las películas CZ-16 migró prácticamente después de media hora de que éstas se pusieron en contacto con el agua, ya que no se observó diferencia significativa ($p>0.05$) entre el porcentaje de bacteriocina liberada después de éste tiempo y aún después de 48 h (**Tabla 7.4**). Estos resultados sugieren que la cantidad de pediocina disponible para migrar hacia el agua lo hizo prácticamente durante los primeros minutos de que la película se puso en contacto con el solvente. De igual manera se observa que la

actividad de la bacteriocina en solución se mantuvo prácticamente constante durante el tiempo que duró el estudio.

Por otra parte, al analizar migración de la bacteriocina de las películas elaboradas con una mayor concentración de dicho compuesto, C-33 y C-50, se observa que éstas presentaron un patrón de migración diferente y más complejo que el mostrado por las películas C-16. Normalmente se esperaría que, al igual que como sucedió con las películas C-16, que el compuesto incorporado migrara hacia el medio de prueba hasta alcanzar un punto de equilibrio en el cual la concentración de la bacteriocina “disponible” en película como en la solución de prueba fueran las mismas. Sin embargo, las películas C-33 y C-50 mostraron un incremento en la migración de la bacteriocina durante las primeras 4 horas, seguido por una disminución continua. Estos resultados sugieren que la actividad de la bacteriocina liberada dependió de los niveles iniciales de la misma en las películas. Sin embargo, dado que el porcentaje de bacteriocina liberada se calculó de manera indirecta a través la determinación de la actividad de la bacteriocina en solución y, ésta a su vez se calculó empleando la curva, es probable que esa disminución en el porcentaje de bacteriocina liberada fue ocasionada por una pérdida “aparente” en la actividad como resultado de la agregación, de la pediocina debido a una concentración alta en solución (Ray *et al.*, 2001).

En la literatura existen pocos reportes sobre la migración de bacteriocinas incorporadas en matrices proteicas. En este sentido, Dawson *et al.* (2003), quienes incorporaron nisina en películas de zeína, encontraron que la actividad de la bacteriocina liberada en agua, de películas elaboradas tanto por vertido en placa como por el método de extrusión o prensado en caliente se mantenía prácticamente constante después de un periodo de 96 h.

7.6 Efecto del pH medio sobre la migración de la pediocina contenida en películas

La baja actividad inhibitoria mostrada por las películas de APSL contra *L. innocua*, ya sea en medio semi-sólido o en suspensión, así como la baja o prácticamente nula migración de la bacteriocina, se explicaron con base al establecimiento de interacciones electrostáticas entre esta última y el APSL. Si esto era cierto, entonces la migración de la bacteriocina debería estar regida tanto por pH de las soluciones formadoras de películas, como del medio en el que se llevó a cabo la migración; debido a que el establecimiento de este tipo de interacciones depende en gran medida del pH. De ahí que, en primera instancia, se decidió estudiar el efecto del pH de medio sobre el grado de migración de la bacteriocina en películas de zeína y de APSL con 25 000 UA/mL SFP. En las **Tablas 7. 5** y **7.6** se observa que el pH del medio fue un factor determinante en la migración de la bacteriocina contenida en películas de zeína como APSL.

Tabla 7. 5 Efecto del pH del medio sobre la liberación de pediocina incorporada en películas de zeína*.

pH	% de pediocina liberada									Promedio
	Tiempo (horas)									
	0.25	0.5	1	2	4	8	10	12	24	
4	6.60 ^b (±1.38)	5.94 ^{ab} (±0.84)	5.94 ^{ab} (±0.83)	4.69 ^{ab} (±0.38)	5.11 ^{ab} (±1.69)	3.65 ^a (±2.00)	4.87 ^{ab} (±1.67)	10.20^c (±1.87)	6.80 ^b (±0)	5.98 ^C (±1.70)
5	2.90 ^{ab} (±0.45)	3.11 ^{ab} (±1.53)	1.90 ^a (±0.54)	5.72 ^{ab} (±1.78)	4.28 ^{ab} (±0.32)	6.61^b (±5.03)	3.60 ^{ab} (±0.52)	4.58 ^{ab} (±1.98)	4.80 ^{ab} (±1.91)	4.16 ^B (±1.36)
6	1.2 ^{ac} (±0.29)	1.35 ^{abc} (±0.86)	0.92 ^a (±0.14)	2.88 ^{cde} (±1.39)	2.66 ^{cd} (±0.33)	1.46 ^{ab} (±0.16)	2.33 ^{bc} (±0)	3.60 ^{de} (±0.52)	4.31^{de} (±0.71)	2.39 ^A (±1.80)
7	2.33 ^{a bc} (±0)	1.8 ^{ab} (±0.80)	1.58 ^a (±0.70)	1.21 ^a (±0.08)	4.19 ^d (±1.61)	1.45 ^a (±0)	3.08 ^{bcd} (±0.79)	3.38 ^{cd} (±0.90)	3.86^d (±0.32)	2.55 ^A (±1.87)

* Concentración de pediocina en las películas SFP 25 000 UA/mL de solución formadora de películas.

¹ Calculada a partir de la ecuación de la curva de "log concentración de bacteriocina vs áreas de inhibición generadas contra *L. innocua*".

² No se produjo inhibición alguna contra *L. innocua*.

^{a-d} Promedios en un mismo renglón (a diferentes tiempos) seguidos por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes. Comparación de medias Duncan ($p \leq 0.05$, $n=3$).

En la **Tabla 7.5**, se presentan los porcentajes de liberación, de la bacteriocina contenida en películas de zeína, a varios valores de pH. El mayor porcentaje de migración ocurrió a pH 4 (5.98%), el cual fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el observado a pH 5 (4.15%). Los menores niveles de migración se observaron a pH 6 (2.39%) y 7 (2.55%), los cuales no presentaron diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ellos, pero sí con los valores obtenidos a pH 4 y 5. En la **Figura 7.7** también se observa que en general la migración de la pediocina fue significativamente mayor a pH 4.

La diferencia observada en el grado de migración a diferentes valores de pH de la pediocina contenida en películas de zeína, podría explicarse de la siguiente manera. La zeína, cuyo pI es de 6.2, se caracteriza por poseer una alta proporción de aminoácidos no polares, así como por su excepcional falta de grupos iónicos. Aunado a lo anterior, dicha molécula presenta una porción hidrocarbonada hidrofóbica y otra débilmente polar y rica en grupos hidroxilos, etoxilos y ceto, lo cual explica su capacidad para disolverse en solventes que poseen características polares y no polares (Fu *et al.*, 1999). Por otra parte, la pediocina, posee una naturaleza catiónica y al mismo tiempo hidrofóbica. Como resultado de ello, es posible el establecimiento tanto interacciones electrostáticas como hidrofóbicas, con el predominio de éstas últimas, entre dichas moléculas. Dado que es posible la existencia de interacciones electrostáticas, las variaciones en el pH podrían ser las responsables de los diferentes grados de migración observados.

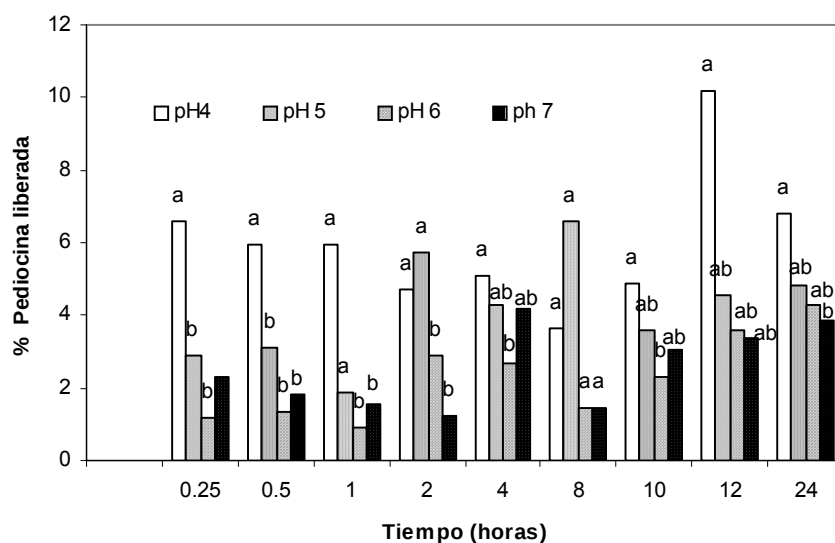


Figura 7.7. Efecto del pH sobre el porcentaje de migración de la pediocina incorporada en películas de zeína.

Los menores porcentajes de migración observados a valores de pH 6 y 7 podrían deberse al establecimiento de interacciones electrostáticas entre la bacteriocina, la cual a esos valores de pH presenta predominantemente una carga neta positiva pues se encuentra por debajo de su pI (8.65), y la zeína, la cual al encontrarse a un pH por arriba de 6.2 (pI) presenta una mayor proporción de cargas negativas (**Figura 7.8**). Por otra parte, el hecho de que la mayor migración haya sido observada a pH 4 y 5 obedece a un mecanismo similar, sólo que en este caso, el número de cargas positivas para la zeína y la bacteriocina se incrementó con la disminución del pH. Esto probablemente originó un incremento en las fuerzas de repulsión, lo cual favoreció la migración de la bacteriocina hacia el medio de prueba, siendo mayor el grado de migración a pH 4.

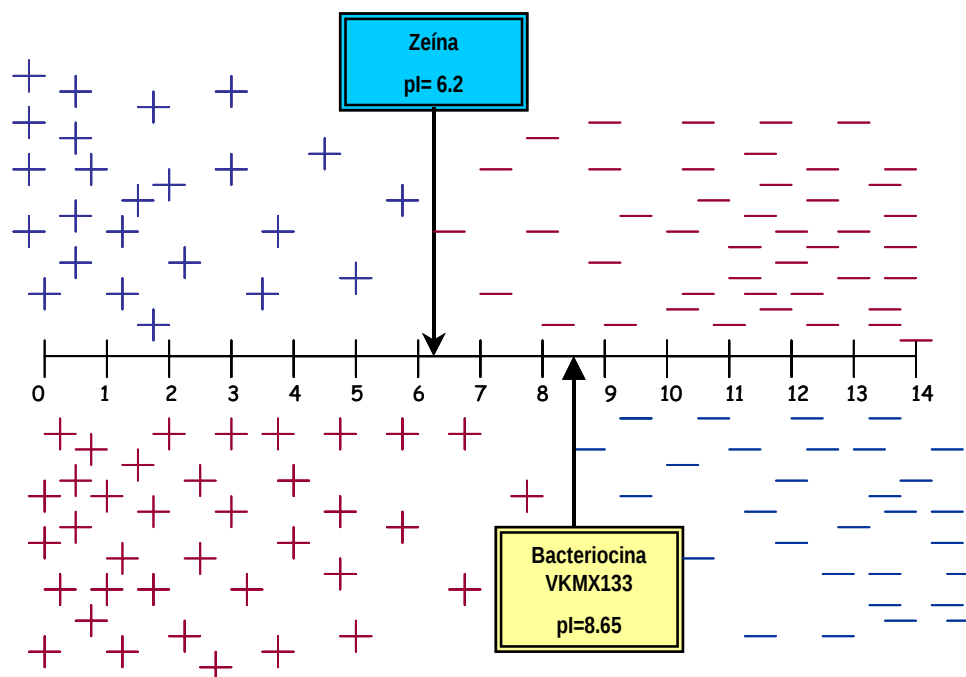


Figura 7.8. Cambios en el número de cargas en la zeína de maíz y en la pediocina a diferentes valores de pH

Por otra parte, se observa en general que los niveles de migración de la bacteriocina, independientemente del pH, no rebasaron en promedio el 5% de la concentración de bacteriocina inicial. Lo cual resulta lógico ya que dada la naturaleza hidrofóbica de las bacteriocinas, estas tienden formar grandes complejos y adherirse superficies hidrofóbicas (Joosten y Núñez, 1995, citado por Teerakarn *et. al.*, 2002). Un fenómeno similar fue observado por Teerakarn *et. al.* (2002) al incorporar nisina en películas de zeína.

El efecto del pH sobre la migración de la bacteriocina contenida en películas de APSL, se muestra en la **Tabla 7.6**. Se observa que a pH de 6 y 7 el grado de migración de la bacteriocina no pudo determinarse por el método empleado. Sin embargo, a pH 5 la concentración de la bacteriocina liberada logró ser detectada después de 4 horas en solución de prueba, observándose una migración gradual durante las 24 horas

Tabla 7.6. Efecto del pH del medio de desorción sobre la liberación de pediocina incorporada en películas de aislado de proteína de suero de leche (APSL)*

pH	% Pediocina ¹ liberada								
	Tiempo de migración (horas)								
	0.25	0.5	1	2	4	8	12	24	72
4	1.23 ^a (± 0.06)	2.55 ^a (± 0.09)	4.01 ^a (± 0.16)	4.86 ^{ab} (± 0.62)	7.9 ^{bc} (± 0.34)	10.94 ^c (± 1.91)	9.99 ^c (± 0.45)	26.51 ^e (± 4.37)	22.26 ^d (± 3.93)
5	NI ²	NI	NI	NI	0.91 ^{ab} (± 0.09)	1.53 ^{bc} (± 0.52)	2.19 ^c (± 0.56)	3.05 ^d (± 0.49)	0.69 ^a (± 0.00)
6	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
7	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

* Concentración de pediocina en las películas SFP 25 000 UA/mL de solución formadora de películas.

¹ Calculada a partir de la ecuación de la curva de Log concentración de bacteriocina vs áreas de inhibición generadas contra *L. innocua*.

²NI=No se produjo inhibición alguna contra *L. innocua*.

^{a-d} Promedios en un mismo renglón (a diferentes tiempos) seguidos por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes. Comparación de medias Duncan ($p \leq 0.05$, $n=3$).

El hecho de que a pH 6 y 7 no se haya detectado migración de la bacteriocina mientras que a pH 4 y 5 comprueba la hipótesis planteada en un principio. Es decir, que las interacciones electrostáticas establecidas entre la bacteriocina y el APSL fueron las responsables de una mayor o menor liberación de la bacteriocina, según el pH del medio de prueba. Estas diferencias en el grado de migración de la bacteriocina a diferentes valores de pH se explican con base en las interacciones electrostáticas se explican a continuación.

El pI de las proteínas del APSL se encuentra en un intervalo entre 4 y 5 de pH (Ko *et al.* (2001), por lo tanto, a valores de pH por arriba de dicho intervalo se espera que la carga predominante de las proteínas es negativa, mientras que a valores menores ésta será predominantemente positiva. Y, como se observa en la **Figura 7.9**, en el APSL a pH 6 y 7 predominan las cargas negativas en tanto que en la bacteriocina prevalecen las cargas positivas. De ahí que haya sido factible el establecimiento de interacciones electrostáticas entre ambos compuestos

ocasionando una menor migración de la bacteriocina. Por otra parte, el pI de las proteínas del APSL se encuentra en un rango de pH que va de 4 a 5. A estos valores, la carga neta de las proteínas es prácticamente cero, por lo que el establecimiento de interacciones electrostáticas sea mínimo, favoreciendo la migración de la bacteriocina en cantidades considerables e incluso mayores (26.51 % a pH 4, después de 24 h) que las presentadas por las películas de zeína (6.4% a pH 4, después de 24 h).

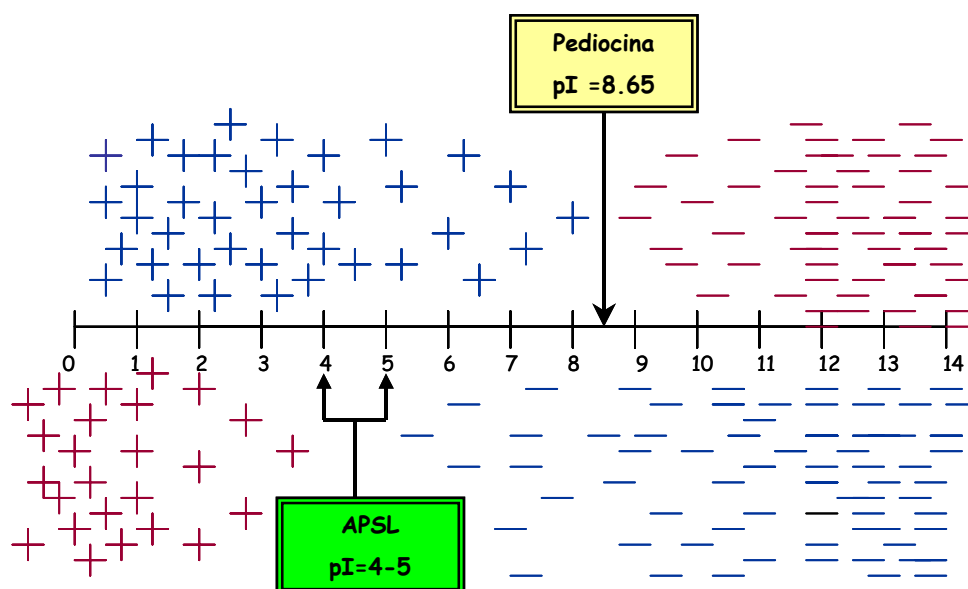


Figura 7. 9. Cambios en el número de cargas de las proteínas del APSL y la pediocina a diferentes valores de pH.

Si se analiza el porcentaje de migración de la bacteriocina a pH 4, se observa que ésta ocurrió 30 minutos después de que las películas se pusieron en contacto con las soluciones de prueba, en tanto que a pH 5 la migración se detectó después de 4 h. No obstante, una vez iniciada la migración ésta fue gradual en ambos casos

observándose un máximo a las 24 horas, y una reducción significativa ($p < 0.05$) a las 72 horas. Esta disminución “aparente” en el grado de migración de la bacteriocina podría haber sido en realidad una pérdida en la actividad de bacteriocina. Esta pérdida de la actividad de la pediocina en solución a valores de pH menores de 6 después de 72 h, ya había sido observada por Hernández-López (2002) quien explicó que podría haber sido ocasionada por la oxidación de los residuos de metionina presentes en su estructura de la bacteriocina

7.7 Efecto del pH de las soluciones formadoras de películas de APSL sobre la actividad antimicrobiana contra *L. innocua* en medio semisólido

Tal y como lo observaron Ko *et al.* (2001), otro de los factores que podría afectar la efectividad antimicrobiana de las películas de APSL a las cuales se les ha adicionado bacteriocinas, nisina en su caso, es el pH de la solución formadora de películas. En este caso, 16666 UA bacteriocina/mL se adicionaron a SPF con diferente pH (2-9) y la actividad antimicrobiana de películas se determinó en medio semisólido midiendo las áreas de inhibición contra *L. innocua*. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 7.7**. Valores de pH entre 4 y 5 afectaron negativamente la formación de las películas debido a la coagulación de las proteínas. Aunque como lo observaron Ko *et al.*, (2001), la formación de las películas de APSL adicionadas con bacteriocinas a valores de pH por arriba y por debajo de pl de las proteínas del APSL podría llevarse a cabo sin ningún problema, en nuestro caso, la adición del extracto purificado afectó de manera negativa la formación de las películas pues su adición a SFP a pH de 2, 3 y 6, provocó la coagulación de las proteínas ocasionada por el pH del extracto de bacteriocina empleado el cual presentaba un valor de pH cercano a 5. Por otra parte, la formación de las películas se llevó a cabo sin ningún problema en las soluciones formadoras de películas en donde el pH se ajustó a valores de 7, 8, y 9. Las áreas de inhibición generadas

contra *L. innocua* se afectaron significativamente ($p < 0.05$) por los valores de pH de las SFP, a las cuales se adicionó el extracto de bacteriocina. Las mayores áreas de inhibición se presentaron a pH de 9 (149.72 mm^2), seguido por pH 8 (122.75 mm^2) y pH 7 (110.94 mm^2) (Tabla 7.7 y Figura 10).

Tabla 7.7. Efecto del pH de las soluciones formadoras de películas de APSL adicionadas con pediocina sobre la actividad antimicrobiana contra *L. innocua* en medio semisólido.

pH de la solución formadora de películas	Formación de películas ¹	Áreas de inhibición contra <i>L. innocua</i> ² (mm^2)
2	-	ND ³
3	-	ND
4	-	ND
5	-	ND
6	-	ND
7	+	110.94 ± 3.26^a
8	+	122.7515 ± 10.82^b
9	+	149.52 ± 6.19^c

¹ (-) La formación de las películas no se efectuó debido a coagulación de proteínas antes o después de adicionar la bacteriocina MXVK133; (+): La formación de películas se realizó satisfactoriamente.

² Calculadas alrededor de las películas. Valores seguidos de diferentes letras son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$).

³ ND= No determinada

⁴ Promedio áreas de inhibición ($n=4$)

El comportamiento arriba señalado resulta un tanto contradictorio ya que el pH de la bacteriocina se encuentra a un pH de 8.65 y, por lo tanto, se esperaba que la actividad antimicrobiana fuera menor en las películas formadas a partir de SFP con pH entre 8 y 9. Sin embargo, si se tiene en cuenta que se partió de un extracto semipurificado, cuyo pH se encontraba alrededor de 5, entonces resulta lógico suponer que éste disminuyó el pH de la SFP a valores por debajo de 8.65. Si esto es cierto, entonces resulta lógico pensar que las mayores áreas de inhibición se hayan

producido a valores de pH más altos como resultado de una menor proporción de interacciones electrostáticas y un aumento de las fuerzas de repulsión entre la bacteriocina y las proteínas del APSL, como se explicó en la sección 7.7 (**Figura 7.9**).

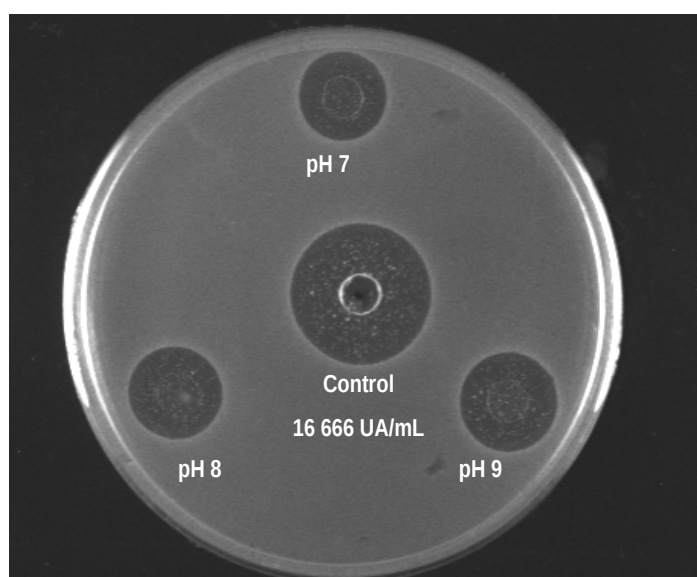


Figura 7.9. Áreas de inhibición formadas contra *L. innocua* por películas de APSL elaboradas a partir de SFP con pH 7,8 y 9 , y adicionadas con 16666 UA de pediocina/mL SFP. Nota: Halo del centro (control) formado por 30 μ L de una solución de bacteriocina de 16666 UA/mL

7.8 Eficacia de la pediocina incorporada en películas en el control de la población de *L. innocua* en suspensión.

Al igual que como sucedió en medio semisólido, las películas de APSL presentaron un efecto menos efectivo en el control de *L. innocua* en suspensión, que las películas de zeína con la misma concentración de bacteriocina. Las películas de APSL que contenían 50, 000 UA/mL de SFP únicamente mantuvieron la población de *L. innocua* a niveles por debajo de las películas control (**Figura 7.11**).

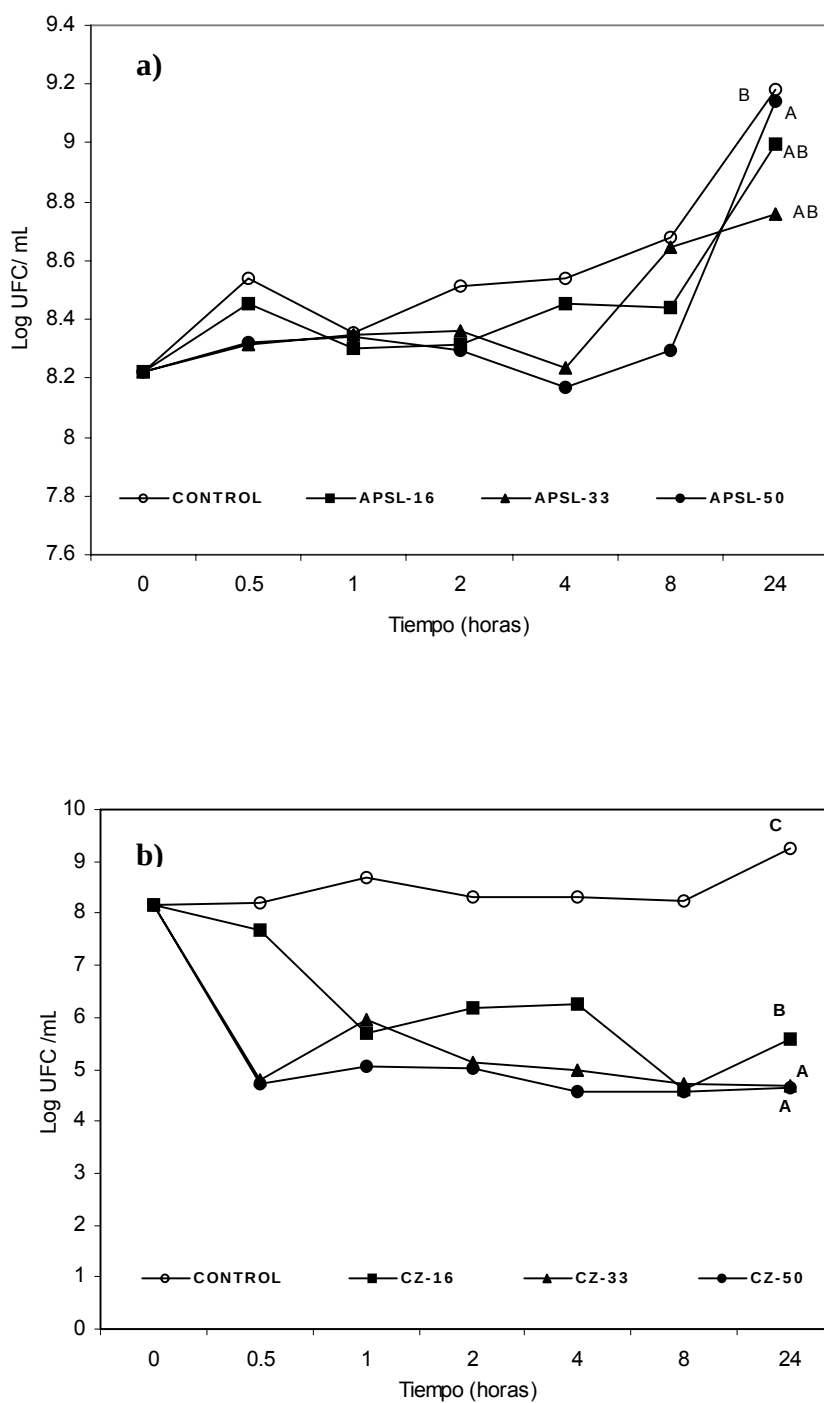


Figura 7.11. Efecto de la concentración de pediocina en películas de: a) zeína y b) APSL en el control de *L. innocua* en suspensión. Curvas con diferente letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Mientras tanto, las películas de zeína, independientemente de la concentración de bacteriocina adicionada (16666, 33333 o 50000 UA/mL SFP), produjeron una reducción significativa ($p < 0.05$) en la población de *L. innocua* con respecto al control. Estos resultados ratifican que la naturaleza de las interacciones establecidas entre los materiales formadores de películas y los compuestos antibacterianos incorporados determinan tanto la migración, como la actividad antimicrobiana de los mismos ya sea en medio sólido o en suspensión. Coma *et al.* (2001) y Sebtí y Coma (2002) encontraron que la actividad de la nisina incorporada en películas de hidroxipropilmetilcelulosa se redujo cuando se adicionó ácido esteárico a la formulación de las películas a pH entre 6 y 7. Ellos sugirieron que tal reducción podría haber sido ocasionada por el establecimiento de interacciones electrostáticas establecidas entre la nisina y el ácido esteárico. Más tarde, Sebtí *et al.* (2003a), encontraron que la actividad antimicrobiana de la nisina incorporada en películas de hidroxipropilmetilcelulosa se incrementaba con la naturaleza hidrofóbica de la matriz polimérica. Por su parte Leung *et al.* (2003) encontraron que la actividad antimicrobiana de la nisina era mayor cuando se colocaba como recubrimiento sobre películas poliméricas sintéticas con valores mayores de hidrofobicidad. Finalmente, Ko *et al.* (2001) reportan que la nisina incorporada en películas con altos valores de hidrofobicidad, en condiciones ácidas, ejercen un mayor efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes*.

Con base en este experimento y al experimento de migración, se deduce que la migración de pediocina y su actividad antimicrobiana son fenómenos que se encuentran asociados, es decir, a mayor difusión, mayor actividad antimicrobiana. Al igual que el experimento anterior, la menor acción antibacteriana de la pediocina incorporada en películas de APSL se podría atribuir al establecimiento de interacciones electrostáticas entre las películas de APSL y la bacteriocina.

Si se analiza el efecto de la bacteriocina contenida en las películas de zeína, se tiene que las películas CZ-33 y CZ-50 redujeron en aproximadamente en 3 ciclos logarítmicos. Los niveles iniciales de *L. innocua* después de 2 y 4 h, respectivamente, que estuvieron en contacto. Los niveles de *L. innocua* observados

después de 24 horas por la presencia de las películas CZ-33 y CZ-50 no fueron significativamente diferentes entre sí, pero fueron significativamente menores que los observados con las películas CZ-16, las cuales a su vez mantuvieron la población de *L. innocua* a niveles menores que el control. Esto sugiere que la adición de altas concentraciones de bacteriocina a las películas no necesariamente restringe el crecimiento de *L. innocua*, probablemente debido al fenómeno de agregación, como ya se mencionó anteriormente o tal vez debido a la generación de células resistentes. En este sentido, en otros estudios realizados con nisina, se encontró que concentraciones altas de dicha bacteriocina no necesariamente mejoraron el control de *L. monocytogenes*, sino que además podrían inducir la aparición de células resistentes (Mazzotta y Montville, 1997; Chi-Zhang *et al.*, 2003). En este sentido, se ha observado que la resistencia de las células de *L. monocytogenes* frente a la nisina se encuentra correlacionado con un cambio en la composición de los lípidos de la membrana (Chi-Zhang *et al.*, 2003).

La eficacia antimicrobiana de nisina incorporada en películas de zeína ha sido probada satisfactoriamente contra una población de microorganismos en medio líquido (Padgett *et al.*, 2000). Asimismo, se ha encontrado que la migración de las sustancias antimicrobianas incorporadas en películas es un factor importante para el control de los microorganismos en los alimentos (Choi *et al.*, 2001). Este fenómeno puede estar gobernado por la velocidad de migración y por la naturaleza intrínseca del medio en el cual ocurre la migración (Kim *et al.*, 2000).

7.9 Análisis de estructura por microscopía electrónica de barrido

Las micrografías de microscopía electrónica de barrido de la superficie y sección transversal de películas de zeína y de APSL con 16 666 UA/mL SFP (**Figura 7.12**) y sin bacteriocina mostraron diferencias notables en la estructura frente a la adición de bacteriocina. En términos generales, las películas de zeína mostraron una estructura áspera, heterogénea y caracterizada por la presencia de numerosos poros, lo cual coincide con lo observado por Padgett *et al.* (1998). Con respecto a la

sección transversal ésta fue menos estructurada y más abierta que las películas de APSL (**Figura 7.12 b**). Es probable que las características estructurales de las películas de zeína junto con el establecimiento de interacciones electrostáticas débiles entre la pediocina y las películas de zeína hayan contribuido de manera sinérgica para y favorecer una mayor migración de la bacteriocina tanto en medio sólido como en medio líquido, dando como resultado una mayor efectividad en el control de *L. innocua* en suspensión, como se discute más adelante.

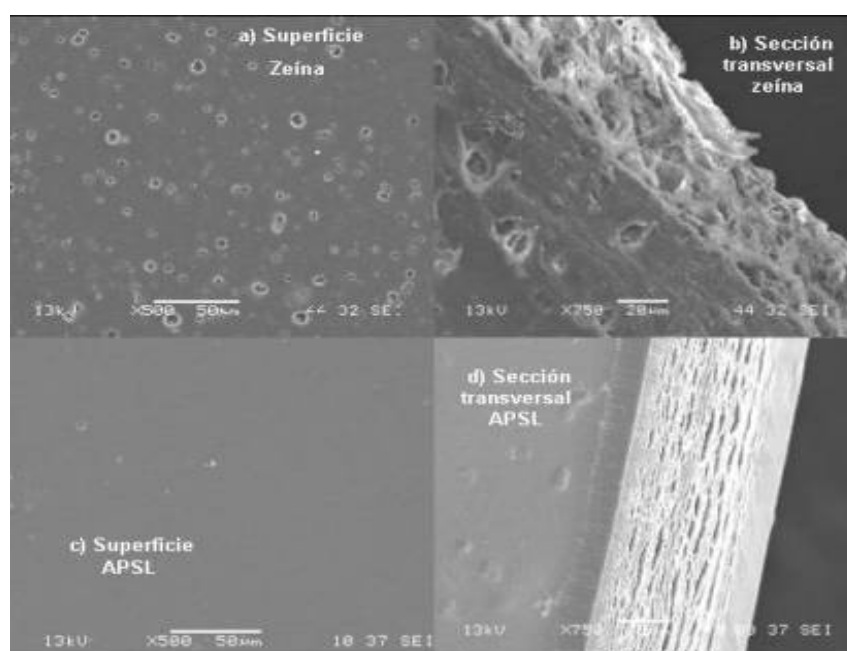


Figura 7.12. Microscopía electrónica de barrido de la superficie y sección transversal de películas de zeína (a & b) y de APSL (c & d) con 16 666 UA/mL SFP

Las películas de APSL presentaron una superficie lisa y prácticamente desprovista de poros (**Figura 7.11 c**), en tanto que la sección transversal presentó una microestructura más uniforme y en capas más ordenadas y compactas que la

de las películas de zeína (**Figura 7.12b**). Estas características en conjunción con las fuerzas de unión entre las proteínas del APSL y la bacteriocina, probablemente fueron las responsables de una menor liberación de la bacteriocina en comparación con la observada por las películas de zeína. Por lo tanto, la estructura de las películas podrían alterar la migración de las sustancias antimicrobianas incorporadas en las películas.

7.10 Aplicación de recubrimientos de zeína y APSL con actividad antibacteriana para el control de *L. innocua* en un sistema cárnico

La incorporación de bacteriocinas en materiales formadores de películas y su posterior evaluación antimicrobiana en sistemas controlados *in vitro* puede resultar exitosa; sin embargo, la aplicación en un sistema cárnico real, al igual que como se ha reportado que sucede cuando se adiciona directamente podría afectar la actividad de las mismas debido a la presencia de grasas, proteasas y otros componentes de los alimentos. Adicionalmente, se podría agregar con base en lo observado en los experimentos de desorción, tanto en medio semi-sólido como en líquido, la efectividad de los recubrimientos también podría verse afectada por el tipo y grado de interacción establecida entre la bacteriocina y el material formador de recubrimientos, así como por el pH del alimento al cual se apliquen.

En las **Figuras 7.13 y 7.14** se presenta el crecimiento de *L. innocua* en salchichas recubiertas con APSL y zeína, respectivamente, con varios niveles de bacteriocina (0, 1 500, 6 000 y 12 000 UA/mL SFP). Asimismo, en la **Figura 7.15** se muestran las zonas de inhibición generadas contra *L. innocua* en medio semisólido generadas por secciones de salchicha recubiertas con recubrimientos de zeína de maíz y APSL adicionados con pediocina. En general, se observó que la aplicación de recubrimientos de zeína y APSL adicionados con pediocina ayudó a mantener los niveles de *L. innocua* a valores menores que los observados en los recubrimientos control, independientemente de la concentración de bacteriocina presente en ellos (**Figura 7.13 y 7.14**). No obstante, el grado de inhibición mostrado fue diferente,

dependiendo del material empleado como recubrimiento. En general, se observa que en las muestras en donde el APSL se empleó como recubrimiento, la población de *L. innocua* se incrementó durante el tiempo de almacenamiento, independientemente de la concentración de bacteriocina presente en el mismo. Contrariamente, en la **Figura 7.14** se observa que los recubrimientos de zeína con bacteriocina no sólo se mantuvieron los niveles de *L. innocua* por debajo del control, sino que además a partir del día 12 los redujeron significativamente ($p<0.05$) (**Tabla 7.8**) y los mantuvieron prácticamente constantes hasta el día 30 de almacenamiento.

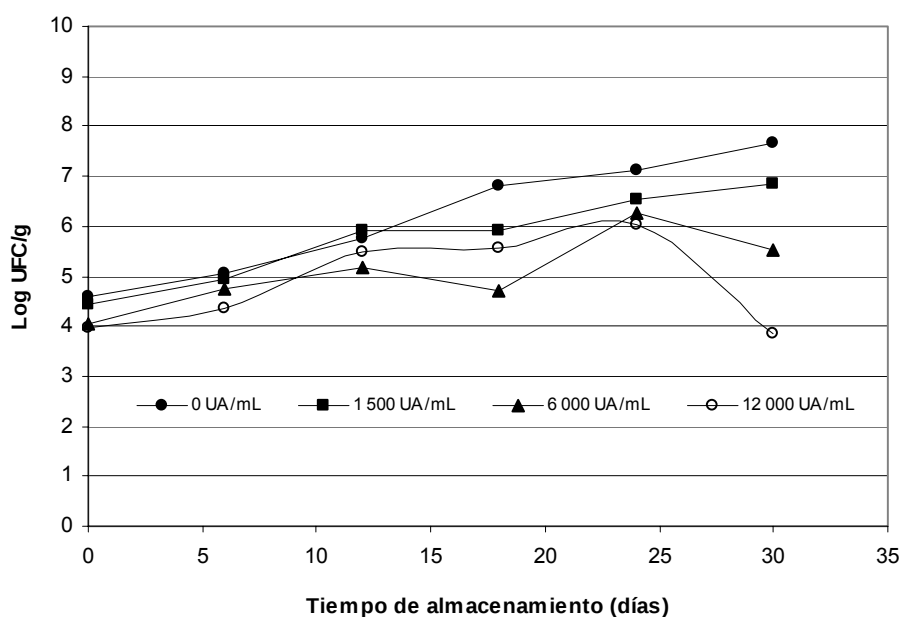


Figura 7.13. Efecto de la concentración de la pediocina presente en recubrimientos de APSL aplicados en el control de *Listeria innocua* en salchichas almacenadas a 10°C

De acuerdo con lo observado en los experimentos de migración de la bacteriocina contenida en las diferentes películas hacia un medio líquido y semisólido se puede asegurar que la poca efectividad mostrada por los recubrimientos de APSL en el control de *L. innocua* en el producto utilizado, sin duda podría estar asociada a una

menor liberación de las bacteriocina. Por otra parte, el hecho de que la población de *L. innocua* se haya incrementado en las muestras con recubrimientos de APSL podría deberse a una utilización de las proteínas del APSL por parte de *L. innocua*. Esto no sucedió con recubrimientos de zeína, porque difícilmente pueden ser utilizada para el crecimiento de microorganismos (Fu *et al.*, 1999). Este comportamiento, fue muy similar al presentado cuando secciones de películas de APSL y zeína con diferentes concentraciones de bacteriocinas se sumergieron en suspensiones de *L. innocua* (ver gráficas en figura 7.11).

Tabla 7.8 Control de *Listeria* por recubrimientos de APSL con diferentes concentraciones de bacteriocina aplicados sobre salchichas almacenadas a 10°C

Día de almacenamiento	UFC/g de salchicha			
	Concentración (UA pediocina/mL recubrimiento)			
	0	1 500	6 000	12 000
0	4.60 ^{aA} (±0.34)	4.44 ^{aA} (±0.12)	4.05 ^{aA} (±0.47)	3.97 ^{aA} (±0.38)
6	5.05 ^{aB} (±0.18)	4.94 ^{aB} (±0.39)	4.75 ^{bA} (±0.25)	4.35 ^{aAB} (±0.06)
12	5.78 ^{bB} (±0.29)	5.93 ^{bB} (±0.30)	5.16 ^{bAB} (±0.08)	5.50 ^{bA} (±0.31)
18	6.82 ^{cC} (±0.41)	5.91 ^{bB} (±0.28)	4.70 ^{bA} (±0.08)	5.58 ^{bB} (±0.24)
24	7.11 ^{cC} (±0.04)	6.52 ^{cB} (±0.22)	6.27 ^{cAB} (±0.09)	6.01 ^{bA} (±0.30)
30	7.68 ^{dC} (±0.03)	6.87 ^C (±0.45)	5.51 ^{cB} (±0.55)	3.84 ^{Aa} (±0.86)
Promedio	6.17 ^B	5.77 ^B	5.08 ^A	4.87 ^A

^{a-c-} Promedios con letras minúsculas en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$, $n=3$).

^{a-c-} Promedios seguidos de las mismas letras mayúsculas en el mismo renglón son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$, $n=3$).

Analizando el grado de inhibición generado por la aplicación de los recubrimientos empleados en este estudio, las salchichas recubiertas con APSL presentaron una reducción inicial en la población de *L. innocua*, proporcional a la concentración de bacteriocina. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$) (Tabla 7.8). Por otra parte, a pesar de que en todos los casos se observó un incremento en la población de *L. innocua*, en general los recubrimientos con 12000 UA/mL mantuvieron los niveles del microorganismo en estudio a valores significativamente menores ($p < 0.05$) que el control (0 UA/mL), 1500 y 6000 UA/mL a los diferentes tiempos. Al analizar estadísticamente los niveles promedio de *L. innocua* obtenidos durante los 30 días, se tiene que los recubrimientos que contenían 6000 y 12000 UA/mL fueron significativamente ($p < 0.05$) menores (5.00 y 4.87 UFC/g, respectivamente) que los observados con los recubrimientos control y con 1 500 UA/mL (6.17 y 5.77 UFC/g, respectivamente). Asimismo, no hubo diferencia significativa entre el control de crecimiento de *L. innocua* entre los recubrimientos control y 1500 UA/mL, pero sí entre éstos y los que contenían 6000 y 12000 UA/mL.

Los cambios en la población de *L. innocua* en salchichas al aplicar los recubrimientos de zeína con y sin bacteriocina, se muestran en la Figura 7.14 y Tabla 7.9 Al igual que lo observado con los recubrimientos de APSL, la población inicial de *L. innocua* inicial fue menor a mayor concentración de bacteriocina; sin embargo esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$). Por otra parte, se observó que los recubrimientos con 12000 y 6000 UA/mL en general, mantuvieron los niveles de *L. innocua* sin cambios significativos ($p < 0.05$), durante 30 días de almacenamiento; no obstante, este hecho fue más evidente para los recubrimientos con 12000 UA/mL. Asimismo, se observa una reducción significativa ($p < 0.05$), con respecto al control en la población de *L. innocua* de salchichas con recubrimientos que contenían 1 500, 6000 y 12000 UA/mL y que a su vez mantuvieron la población de *L. innocua* en 1.22, 1.24 y 1.35 ciclos logarítmicos menores que el observado en el control. Hay que señalar que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre tales valores.

Otro aspecto importante es que se observó que a partir del día 24 y hasta el día 30 de almacenamiento, los niveles de *L. innocua* muestras con recubrimientos de

zeína con bacteriocina no presentaron diferencia significativa ($p>0.05$) con respecto al control. Esto sugiere la pérdida gradual de la actividad de la bacteriocina aunado al establecimiento y proliferación de otro tipo de bacterias. Finalmente, al analizar los valores promedio de la población de *L. innocua* en salchichas con recubrimientos adicionados con la bacteriocina obtenidos durante 30 días, se concluye que un recubrimiento con una concentración de bacteriocina de 1 500 UA/mL podría mantener los niveles de *L. innocua* a valores significativamente menores que un recubrimiento de zeína sin bacteriocina.

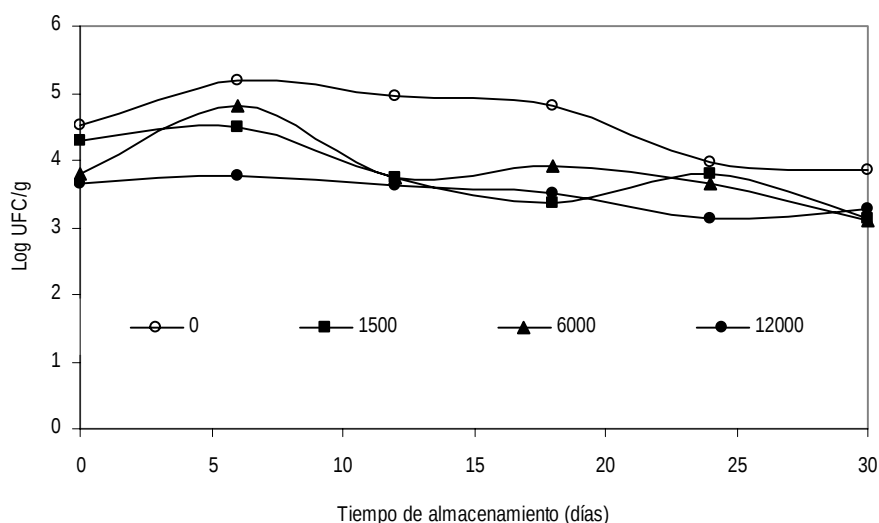


Figura 7.14. Efecto de la concentración de pediocina presente en recubrimientos de APSL aplicados en el control de *Listeria innocua* en salchichas almacenadas a 10°C

Tabla 7.9 Efecto de control de *Listeria* por recubrimientos de zeína con diferentes concentraciones de bacteriocina aplicados sobre salchichas almacenadas a 10°C

Día	Concentración (UA Bacteriocina /mL recubrimiento)			
	0	1 500	6 000	12 000
0	4.51 ^{abcA} (±0.38)	4.29 ^{cdA} (±0.25)	3.81 ^{abA} (±0.92)	3.64 ^{aA} (±0.53)
6	5.19 ^{cC} (±0.25)	4.49 ^{dB} (±0.22)	4.81 ^{bBC} (±0.21)	3.78 ^{aA} (±0.39)
12	4.97 ^{cB} (±0.92)	3.75 ^{bcA} (±0.50)	3.73 ^{abA} (±0.08)	3.62 ^{aA} (±0.18)
18	4.81 ^{bcC} (±0.52)	3.35 ^{aA} (±0.30)	3.92 ^{abB} (±0.24)	3.52 ^{aAB} (±0.12)
24	3.96 ^{abA} (±0.085)	3.78 ^{bcA} (±0.28)	3.64 ^{abA} (±0.98)	3.13 ^{aA} (±0.83)
30	3.86 ^{aA} (±0.93)	3.12 ^{aA} (±0.33)	3.64 ^{aA} (±0.76)	2.87 ^{aA} (±1.07)
Promedio	4.55 ^b (±0.65)	3.80 ^a (±0.56)	3.83 ^a (±0.75)	3.42 ^a (±0.62)

^{a-c-} Promedios con letras minúsculas en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$, $n=3$).

^{a-c-} Promedios seguidos de las mismas letras mayúsculas en el mismo renglón son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$, $n=3$).

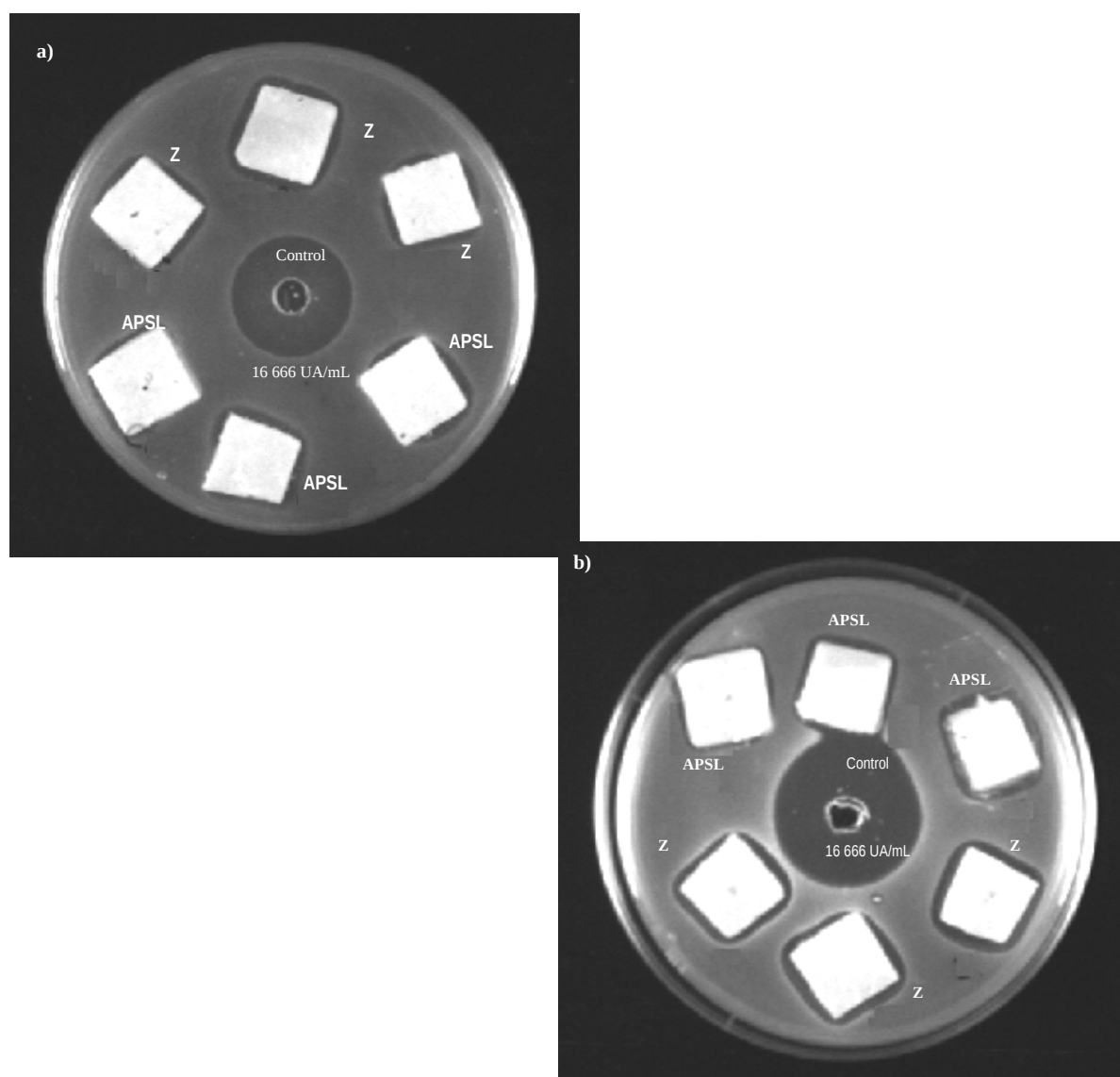


Figura 15. Actividad contra *L. innocua* a los 0 (a) y 5 (b) días de almacenamiento a 10 °C, de muestras de salchicha recubiertas con soluciones formadoras de películas de APSL y zeína de maíz (Z) adicionadas con 10,000 UA/mL de pediocina

8. Conclusiones

- a) La pediocina puede ser incorporada como agente antibacteriano en matrices proteicas formadoras de películas conservando su actividad antimicrobiana. Sin embargo, ésta dependerá del grado de migración, tipo de interacciones establecidas entre la película y la pediocina, así como de la estructura microscópica de las películas.
- b) La pediocina incorporada en matrices proteicas mostró una mayor eficacia en la reducción de un microorganismo de interés cuando predominaron las interacciones electrostáticas por sobre las interacciones hidrofóbicas entre la pediocina y los materiales formadores de películas.
- c) Las películas y recubrimientos de APSL pueden ser útiles para incrementar la seguridad alimentaria de los alimentos, sin embargo, su eficacia dependerá en gran medida del pH de los alimentos y de los sustratos sobre los cuales se apliquen.
- d) Las películas de zeína y aislado de proteína de suero de leche y recubrimientos adicionados con la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* VKMX133 pueden ser útiles para incrementar la vida de anaquel y la seguridad microbiológica de los alimentos comúnmente contaminados con *Listeria monocytogenes*.
- e) Es preciso realizar más estudios de aplicación de las películas y recubrimientos aquí desarrollados sobre más sistemas alimentarios.

10 Bibliografía

1. Ahvenainen R. 2000. Active and intelligent packaging. En Novel Food packaging techniques. Editor: Ahvenainen R., Editorial CRC Press, Boca Raton, Florida, E.U. pp:5-21.
2. Bennik, MHJ,. Smid EJ, Gorris LGM. 1997. Vegetable-associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. Appl Environ Microbiol 63:2074-76.
3. Bhunia AK, Johnson MC, Ray B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J Appl Bacteriol 70:25-30.
4. Cagri A, Ustunol Z, Osburn W, Ryser ET. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on hot dogs using antimicrobial whey protein-based edible casings. J Food Sci 68(1):291-299.
5. Cagri A, Ustunol Z, Ryser ET. 2001. Antimicrobial, mechanical and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. J Food Sci 66 (6):865-70.
6. Cagri A, Ustunol Z, Ryser ET. 2003. Inhibition of three pathogens on bologna and summer sausage using antimicrobial edible films. J Food Sci 67(6):3717-34.
7. Cañas- Urbina AO, Pérez-Alonso A, Morales H, Saucedo I, Fernández L, Castillo RM, Salgado-Cruz V. 2000. Bacterias más comunes en los productos cárnicos: características y métodos para su control. Alimentaria: Sep-oct, pp:40-51.
8. Cha DS, Chen J, Park HJ, Chinnan MS. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in tofu by use of a polyethylene film coated with a cellulosic solution containing nisin. Int J Food Sci Technol 38:499-503.
9. Cha DS, Chinnan MS. 2004. Biopolymer-based antimicrobial packaging: A Review. Crit Rev Food Sci Nutr 44:223-237.
10. Cha DS, Choi JH, Chinnan MS, Park HJ. 2002. Antimicrobial films based on Na-alginate and k-carrageenan. Lebensm.-Wiss. U.-Technol 35:715-719.
11. Cha DS, Cooksey K, Chinnan MS, Park HJ. 2003. Release of nisin from various heat pressed and cast films. Lebensm.-Wiss.U.-Technol 36:209-13.
12. Chen H, Hoover DG. 2003. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Rev Food Sci Food Safety 2:82-100.
13. Chi-Zhang Y, Yam KL, Chikindas ML. 2003. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly release into a broth system. Int J Food Microbiol 90(1):15-22.

14. Cho SY, Park JW, Rhee C. 2002. Properties of laminated films from whey powder and sodium caseinate mixtures and zein layers. *Lebensm.-Wiss. u.- Technol* 35:135-39.
15. Choi JO, Park JM, Park HJ, Lee DS. 2001. Migration of preservative from antimicrobial coating into water. *Food Sci Biotechnol* 10(3):327-30.
16. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71:1-20.
17. Coma V, Sebti I, Pardon P, Deschamps A, and Pichavant FH. 2001. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. *J Food Prot* 64 (4):470-5.
18. Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Rev.* 3:777-88.
19. Cutter CN, Siragusa GR. 1996. Reduction of *Brochothrix thermosphacta* on beef surfaces following immobilization of nisin in calcium alginate gels. *Lett. Appl. Microbiol* 23:9-12.
20. Cutter CN, Siragusa GR. 1997. Growth of *Brochothrix thermosphacta* in ground beef following treatments with nisin in calcium alginate gels. *Food Microbiol* 14:425-30.
21. Cutter CN, Willett JL, Siragusa GR. 2001. Improved antimicrobial activity of nisin-incorporated polymer films by formulation change and addition of food grade chelator. *Lett Appl Microbiol* 33:325-328.
22. Dawson PL, Carl GD, Acton JC, Han IY. 2002. Effect of lauric acid and nisin-impregnated soy-based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. *Poultry Sci* 81:721-726.
23. Dawson PL, Hirt DE, Rieck JR, Acton JC, Sotthibandhu A. 2003. Nisin release from films is affected by both protein type, and film-forming method. *Food Research Int* 36:959-68.
24. Delves-Broughton J. 1990. Nisin and its uses as food preservative. *Food Technol* 11:100-117.
25. Eswaranandam S, Hettiarachchy, Johnson MG. 2004. Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella garminara*. *J Food Sci FMS* 79-84.
26. Fu D, Weller CL, Wehling RL. 1999. Zein: Proteins, preparations, and applications. *Food Sci Biotechnol* 8(1):1-10.
27. Garti, N. y Reichman, D. 1993. Hydrocolloids as food emulsifiers and stabilizers. *Food Structure* 12, 411.
28. Gennadios A, Hanna MA, y Kurth LB. 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: A review. *Lebensm.-Wiss. u.- Technol* 30:337-350.
29. Grower JL, Cooksey K, Getty K. 2004. Release of nisin from methylcellulose-hydroxypropyl methylcellulose film formed on low-density polyethylene film. *J Food Sci* 64(4):M107-11.

-
30. Guerra NP, Macías CL, Agrasar AT, Castro LP. Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin® as biopreservative agent. *Lett Appl Microbiol* 40:106-110.
 31. Guilbert S, Gontard N, Gorris LGM. 1996. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *Lebensm.-Wiss. u.- Technol.*, 29:10.17.
 32. Han JH. 2000a. Antimicrobial food packaging. En *Novel Food packaging techniques*. Editor: Ahvenainen R., Editorial CRC Press, Boca Raton, Florida, E.U. pp: 50-70.
 33. Han JH. 2000b. Antimicrobial food packaging. *Food Technol* 54(3):56-65.
 34. Hernández-López JC. 2002. Caracterización parcial de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133. Tesis de Maestría, México D.F. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapapapa. 91 pp.
 35. Hoffman KL, Han IY, Dawson PL. 2000. Effect of lauric acid addition on the antimicrobial efficacy and water permeability of corn zein films coating nisin. *J Food Press* 24: 423-432.
 36. Hoffman KL, Han IY, Dawson PL. 2001. Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid, and EDTA. *J Food Prot* 64(6):885-89.
 37. Holz CM, Stahl U. 1995. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides in prokaryotic and eukaryotic organisms. *Food Microbiol* 9(3):85-117.
 38. Janes ME, Kooshesh S, Johnson MG. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* on the surface of refrigerated, ready-to-eat chicken coated with edible zein film coatings containing nisin and/or calcium propionate. *J Food Sci* 67(7):2754-2757.
 39. Kester JJ, Fennema OR. 1986. Edible films and coatings: A Review. *Food Technol* 40 (12): 47-59.
 40. Khwaldia K, Perez C, Banon S, Desobry S, Hardy J. 2004. Milk proteins for edible films and coatings, *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:239-51.
 41. Kim YM, Lee NK, Paik HD, Lee DS. 2000. Migration of bacteriocin from bacteriocin-coated film and its antimicrobial activity. *Food Sci Biotechnol* 9(5):325-9.
 42. Ko S, Janes ME, Hettiarachchy, NS, Johnson MG. 2001. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *J Food Sci* 66(7):1006-11.
 43. Krochta , J.M. y De Mulder-Johnson, C. (1997). Edible and biodegradable polymer films. *Food Technol* 51(2):61-74.
 44. Krochta JM. 2002. Proteins as Raw materials for films and coatings: definitions, current atatus and opportunities. En *Protein-based films and coatings*. Editor Gennadios A. Boca Raton, Florida, E.U., CRC Press, pp: 1-41.
 45. Kuri V . 1998. Regardless of the reatil conditions lactic acid bacteria and Salmonella from Mexican pork products:characterization and antagonism. Tesis Doctoral, Queen's University of Belfast, Irlanda del Norte, Reino Unido.

-
-
46. Leung PP, Yousef AE, Shellhammer TH. 2003. Antimicrobial properties of nisin-coated polymeric films as influenced by film type and coating conditions. *J Food Safety* 23:1-12.
 47. Lungu B, Johnson MG. 2005. Potassium sorbate does not increase control of *Listeria monocytogenes* when added to zein coatings with nisin on the surface of full fat turkey frankfurter pieces in a model system at 4 °C. *J Food Sci* 70(2): M95-9.
 48. Mallikarjunan P, Chinnan MS, Balasubramaniam VM, Phillips RD. 1997. Edible coatings for deep-fat frying of starch products. *Lebensm.-Wiss. u.- Technol* 30:709-14.
 49. Martínez, MMI, Horn N, Dodd H, y Rodríguez GJM, Martínez CJM. 2000a. Pediocina PA-1: Una bacteria con potencial bioconservante: 1. Propiedades fisicoquímicas, espectro antimicrobiano y modo de acción. *Alimentaria: Revista e higiene de los alimentos*, No. 314, pp: 75-84.
 50. Martínez, MMI, Horn N, Dodd H, y Rodríguez GJM, Martínez CJM. 2000a. Pediocina PA-1: Una bacteria con potencial bioconservante: 2. Relaciones estructura –función propiedades inmunológica, biosíntesis y aplicaciones en la industria alimentaria. *Alimentaria: Revista e higiene de los alimentos*. No. 314, pp: 85-94.
 51. Mauriello G, Ercolini D, La Storia A, Casaburi A, Villani F. 2004. Development of polythene films for food packaging activated with antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y. *J App Microbiol* 97:314-22.
 52. Mazzotta AS, Montville TJ. 1997. Nisin induced changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10 °C and 30° C. *J Appl Microbiol* 82:32-8
 53. McMullen, L.M. y Stiles, M.E. 1996. Potential use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in preservation of meats. *J Food Prot Supl.* 64-71.
 54. Miller KS, Krochta JM. 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends Food Sci and Technol* 8:228-37.
 55. Min S, Harris LJ, Krochta JM. 2005. *Listeria monocytogenes* inhibition by whey protein films and coatings incorporating the lactoperoxidase system. *J Food Sci* 70 (7): M317-24.
 56. Min S, Krochta JM. 2005. Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolisate, and lactoperoxidase systems. *J Food Sci* 70(2):M87-94.
 57. Ming X, Weber GH, Ayres GW, Sandine WE. 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *J Food Sci* 62(2):413-15.
 58. Natrajan N, Sheldon BW. 2000a. Inhibition of *Salmonella* on poultry skin using protein and polysaccharide-based films containing a nisin formulation. *J Food Prot*, 63 (9): 1268-72.
 59. Natrajan N, Sheldon BW. 2000b. Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella typhimurium* on fresh broiler skin. *J Food Prot*, 63(9): 1189-1196.

-
-
60. Ohlsson T. 1994. Minimal processing-preservation methods of the future: an overview. *Trends Food Sci Technol* 5: 341-344.
 61. Outtara B, Giroux M, Yefsah Y, Smoragiewcz W, Saucier L, Borsa J, Lacroix, M. 2002. Microbiological and biochemical characteristics of ground beef as affected by gamma irradiation, food additives and edible coating films. *Radiation Physics and Chemistry*, 63: 299-304.
 62. Ouatarra B, Simard RE, Piette G, Bejín A, Holler RA. 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *Int J Food Microbiol*, 62: 139-148.
 63. Padgett T, Han IY, Dawson PL. 1998. Incorporation of food-grade antimicrobial compound into biodegradable packaging films. *J Food Prot* 61(10):1330-35.
 64. Padgett T, Han IY, Dawson PL. 2000. Effect of lauric acid addition on the antimicrobial efficacy and water permeability of corn zein films containing nisin. *J Food Process Preserv* 24: 423-32.
 65. Padua GW, Wang Q. 2002. Formation and properties of corn zein films and coatings. En *Protein-based films and coatings*. Editor Gennadios A. Boca Raton, Florida, E.U., CRC Press, pp: 43-67.
 66. Pérez-Gago MB, Krochta JM. 2002. Formation and properties of whey protein films and coatings. En *Protein-based films and coatings*. Editor Gennadios A. Boca Raton, Florida, E.U., CRC Press, pp:159-180.
 67. Quintavalla S, Vicini L. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Sci* 62:373-380.
 68. Ray B, Miller KW. 2000. Pediocin. In: Naidu AS, editor. *Natural food antimicrobial systems*. New York: CRC Press. p 525-66.
 69. Ray B, Miller KW, Mahendra KJ. 2001. Bacteriocin of lactic acid bacteria: Current perspectives. *Indian J Microbiol* 41:1-21.
 70. Rollema HS, Kuipers OP, Both P, M de Vos W, Siezen RJ. 1995. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl Environ Microbiol* 61:2873-78.
 71. Scanell AGM, Hill C, Ross RP, Marx S, Hartmeir W, Arendt EK. 2000. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 y Nisaplin ®. *Int J Food Microbiol*, 60: 241-249.
 72. Schneider R, Fernández FJ, Aguilar MB, Guerrero-Legarreta I, Alpuche-Solís AG, Ponce-Alquicira E. 2005. Partial characterization of a class II Pediocin produced by *Pedococcus parvulus* MXVK133 strain isolated from meat (Mexican "chorizo"). *Food Control* (en prensa)

-
-
73. Sebti I, Carnet AR, Blanc D, Saurel R, Coma V. 2003b. Controlled diffusion of an antimicrobial peptide from a biopolymer film. *Trans IchemE* 81, Part A: 1099-1104.
 74. Sebti I, Coma V. 2002. Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. *Carbohydr Polym* 49(2):139-44.
 75. Sebti I., Delves-Broughton J., Coma V. 2003a. Physicochemical properties and bioactivity of nisin-containing crosslinked hydroxypropylmethylcellulose films. *J. Agric Food Chem* 51:6468-74.
 76. Sebti I, Ham-Pichavant F, Coma V. 2002. Edible bioactive fatty acid-cellulosic derivative composites used in food-packaging applications. *J Agric Food Chem* 50:4290-4294.
 77. Siragusa GR, Cutter CN, Willet JL. 1999. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiol* 16:1333-35.
 78. Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J food Sci* 68(2):408-419.
 79. Teerakarn A, Hirt D., Acton JC, Rieck JR, Dawson PL. 2002. Nisin diffusion in protein films: effects of film type and temperature. *J Food Sci* 67(8): 3019-25.
 80. Theivendran S, Hettiarachchy N, Johnson M. 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin combined with grape seed extract or green tea extract in soy protein film coated on turkey frankfurters. *J Food Sci* 71(2):M39-44.
 81. Weller CL, Gennadios A, Saraiva RA. 1998. Edible films from zein and grain sorghum wax or carnauba wax. *Lebensm.-Wiss. u.- Technol* 31:279-85.
 82. Wu Y, Rhim JW, Weller CL, Hamouz F, Cuppett SL, Schnepf M. 2002. Development and application of multicomponent edible coatings and films: A review. *Adv Food Nutr Research* 44:347-394.
 83. Wu Y, Rhim, JW, Weller CL, Hamouz F, Cuppett, Shnepf M. 2000. Moisture loss and lipid oxidation for precooked beef patties stored in edible coating and films. *J of Food Sci* 65(2): 300-04.
 84. Yam KL, Takhidov PY, Miltz J. 2005. Intelligent Packaging: Concepts and applications. *J Food Sci* 70(1):R1-10.
 85. Yang R, Johnson MC, Ray B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58 (10): 1335-59
 86. Zhu M, Du M, Cordray J, Ahn DA. 2005. Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-eat-meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 4:34-42.

Anexo 1

Pruebas preliminares para determinar el efecto de la concentración de pediocina y la adición de cera de candelilla sobre las propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas de las películas de zeína de maíz y aislado de proteína de suero de leche.

A1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la concentración de pediocina y cera de candelilla sobre las propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas de películas comestibles adicionadas con pediocina como agente antibacteriano.

A2. Metodología

A2.1 Elaboración de las películas

Las soluciones formadoras de películas (SFP) de zeína de maíz (ZM) y aislado de proteína de suero de leche (APSL) se prepararon con base lo descrito en la sección 6.4. Luego, diferentes concentraciones de bacteriocina (1 225, 2 500, 5 000 y 10 000 UA/mL) previamente disueltos en 500 µl de una solución amortiguadora de fosfatos 100 mM a pH 7.0 se adicionaron a soluciones formadoras de películas (SFP) de zeína y APSL. A continuación, 30 mL de SFP se vertieron de manera homogénea sobre placas niveladas de vidrio de 15 X 15 cm. Posteriormente, las placas se mantuvieron a temperatura ambiente (23°C) durante 18 horas para permitir el secado y formación de las películas. Las películas control se prepararon sin la adición de pediocina.

A2.1.1 Medición de espesores

El espesor de las películas se determinó igual que en 6.5.

A2.1.2 Acondicionamiento y preparación de muestras

Películas sin defectos se cortaron cuidadosamente en secciones de a) 15 X 6 mm y b) 40 mm de diámetro para ser empleadas en las pruebas mecánicas y en la determinación de la permeabilidad al vapor de agua, respectivamente. Posteriormente, las muestras se colocaron en cámaras con una humedad relativa del 50% a 23°C, durante al menos 72 horas antes de realizar las pruebas mecánicas y determinación de permeabilidad al vapor de agua.

A2.2 Determinación de las propiedades mecánicas

La determinación de la resistencia a la tensión y el porcentaje de elongación de las películas se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Post-cosecha de la Universidad Autónoma de Querétaro empleando para ello un texturómetro (TAHD, Stable Micro Systems).

A2.2.1 Resistencia a la tensión y porcentaje de elongación

Secciones de películas (150 x 6 mm), previamente acondicionadas, se colocaron en el texturómetro para ejecutar las pruebas de tensión, mismas que se realizaron en un intervalo de distancia de 40 mm a una velocidad de estiramiento de 2 mm/min. La resistencia a la de tensión en MPa se calculó dividiendo el pico de fuerza más grande desarrollada durante la prueba de tensión entre el área de la sección transversal de la película (Ko *et al.*, 2001), de acuerdo con la **ecuación 1**:

$$\text{Resistencia a la tensión (MPa)} = \frac{\text{Pico de fuerza desarrollado durante la prueba de tensión (N)}}{\text{Área de la sección transversal (m}^2\text{)}} \dots\dots\dots(\text{ecuación 1})$$

Mientras que, el porcentaje de elongación (%E) se calculó a partir la **ecuación 2**:

$$\%E = \frac{\text{Longitud final}}{\text{Longitud original de la muestra}} \times 100 \quad \dots\dots\dots \text{(Ecuación 2)}$$

A2.2.2 Resistencia a la punción o perforación

La resistencia a la perforación o punción de películas con diferentes concentraciones de bacteriocina, se determinó colocando secciones circulares de películas de zeína y APSL de 35 mm de diámetro sobre una cápsula de vidrio de 40 mm de diámetro y una altura de 16.8 mm. Las muestras se colocaron entre de dos empaques de plástico y posteriormente se aseguraron sobre la cápsula. Una vez colocadas las muestras, se llevó a cabo la prueba de punción en el modo de compresión empleando para ello una sonda con un diámetro de 3 mm, a una velocidad de penetración de 2 mm/s y una distancia de penetración de 8 mm. La fuerza (Newtons) en el punto de ruptura se registró y se expresó como la resistencia a la punción (Ko *et al.*, 2001).

A2.3 Permeabilidad aparente al vapor de agua

Este parámetro se determinó gravimétricamente de acuerdo con el método estándar de la ASTM E96-001^{ε1}. Para ello, 30 mm agua desionizada se colocaron en cápsulas de vidrio con un diámetro abierto de 40 mm, dejando un espacio vacío de 2.5 cm. Posteriormente, muestras de películas con un diámetro de 40 mm se colocaron en entre 2 empaques de plástico y se aseguraron empleando una tapa de rosca que poseía un diámetro abierto de 35 mm. Posteriormente, las cápsulas se colocaron en una cámara con humedad relativa del 43%, temperatura ambiente (23°C), y los pesos de las mismas se determinaron cada 30 minutos durante 7

horas (Ko *et al.*, 2001). Finalmente, la última determinación se realizó a las 24 h. La pendiente derivada de la curva de pérdida de peso vs tiempo se empleó para estimar la velocidad de transmisión del agua (**VTVA**) (**ecuación 3**). A continuación éste valor se empleó para calcular permeabilidad al vapor de agua con base en la **ecuación 3**.

$$VTVA = G/tA = (G/t)/A \dots \dots \dots \text{Ecuación (3)}$$

donde :

G/t= pendiente obtenida de la curva de pérdida de peso vs tiempo.

A= Superficie de área expuesta (m²)

VTVA= Velocidad de transmisión del vapor de agua

Posteriormente, la permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó empleando la siguiente ecuación (Sothornvit y Krochta, 2000):

$$PVA = \frac{VTVA * \text{espesor de las películas}}{(p_{A1} - p_{A2})} \dots \dots \dots \text{(Ecuación 4)}$$

Donde:

PVA= permeabilidad al vapor de agua

VTVA= Velocidad de transmisión del vapor de agua

p_{A1}= presión parcial de agua dentro de la cápsula

p_{A2}= presión parcial de agua fuera de la cápsula

A2.4 Determinación de la actividad antimicrobiana

La determinación de la actividad antimicrobiana se determinó de igual manera que en la sección **6.6**.

A2.5 Efecto de la concentración de cera de candelilla sobre las propiedades mecánicas y de barrera de las películas de aislado de proteína de suero de leche

Diferentes concentraciones de cera de candelilla (2.5, 5 y 10%, con base la cantidad de APSL) se adicionaron y disolvieron en las soluciones formadoras de películas de APSL 5 minutos antes de finalizar el tratamiento a 90°C. Posteriormente, se aplicó una homogenización a 21 500 rpm durante 3 minutos (Homogenizador Ultraturrax). Posteriormente, la formación y acondicionamiento de las películas se realizó como en 1.2. Una vez formadas las películas se determinó la resistencia tensil, el porcentaje de elongación, la permeabilidad al vapor de agua y la actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua*.

A3. Análisis y discusión de resultados

A3.1 Efecto de la concentración de pediocina en películas sobre la actividad antimicrobiana

En la Figura A1, se muestran las áreas de inhibición generadas por películas de aislado de proteína de suero de leche y zeína de maíz adicionadas con 2500, 5000 y 10, 000 UA pediocina /mL SFP y fueron empleadas para evaluar el efecto de la concentración de pediocina sobre las propiedades mecánicas y de barrera. Todas las películas que contenían pediocina produjeron zonas de inhibición contra *L. innocua*, mismas que se incrementaron significativamente (**$P \leq 0.05$, Tabla 1**) con la concentración de pediocina. Por el contrario, se observa que las películas control (sin pediocina) no generaron inhibición.

Nuevamente y al igual que en la sección 7.4 se observa que las películas de zeína produjeron mayores áreas de inhibición contra *Listeria innocua* que las películas de APSL (**Tabla A1, Figura A2**) con la misma concentración de pediocina ya que mientras que películas de zeína elaboradas a partir de soluciones

formadoras de películas adicionadas con 2 500, 5 000 y 10, 000 UA/mL produjeron zonas de inhibición de 91.37, 122.29 y 144.58 cm², respectivamente, películas de APSL con las mismas concentraciones de pediocina produjeron áreas de 11.78, 35.008 y 74.61 cm², respectivamente.

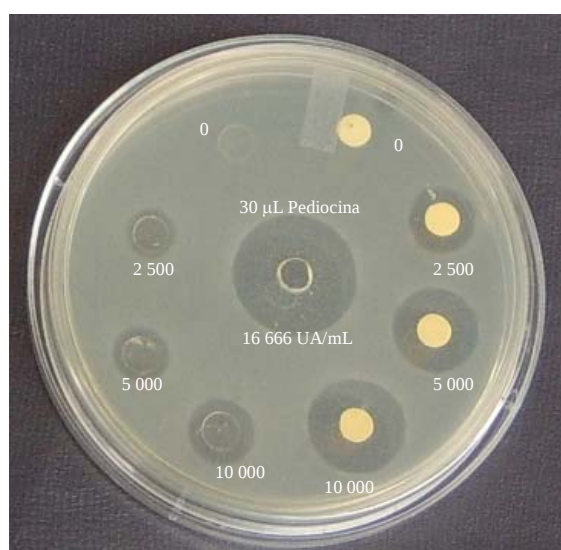
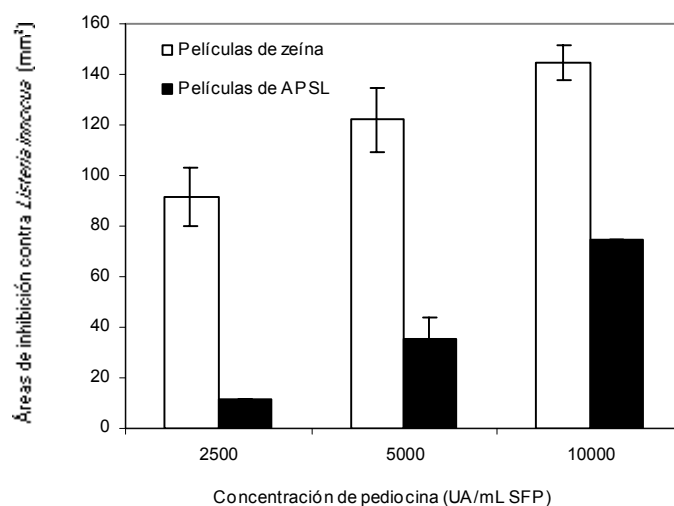


Figura A1. Zonas de inhibición contra *Listeria innocua* generadas por películas de aislado de proteína de suero de leche (izquierda, transparentes) y zeína de maíz (derecha, opacas) adicionadas con 0, 2 500, 5 000 y 10 000 UA de pediocina/mL de solución formadora de películas. Halo central: 33 µL de una solución de pediocina (16, 666UA/mL).

Figura A2. Efecto de la concentración de pediocina presente en películas de aislado de

proteína de suero de leche y zeína de sobre las áreas de inhibición contra *Listeria innocua*

Tabla A1. Efecto de la concentración de pediocina en películas de aislado de proteína de suero de leche y zeína sobre las áreas de inhibición sobre *Listeria innocua*

Concentración de pediocina (UA/mL solución formadora de películas)	Película	
	Zeína	Aislado de proteína de suero de leche
0	NI	NI
2 500	91.37 ^a ± 1.34 ¹	11.78 ^a ± 0
5 000	122.20 ^b ± 12.70	35.08 ^b ± 8.61
10 000	144.58 ^c ± 6.69	74.61 ^c ± 0

¹ Promedio áreas de inhibición ± desviación estándar (n=5)

^{a-c} Comparación de medias por Duncan (P≤0.05, n=5). Promedios en una misma columna seguidos por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes.

A3.2 Efecto de la concentración de pediocina sobre las propiedades microbiológicas, mecánicas y permeabilidad al vapor de agua de películas de zeína y APSL

Otro de los parámetros que se deben tomar en cuenta durante el desarrollo de empaques, películas y recubrimientos comestibles con actividad antimicrobiana es el efecto de la adición de los agentes antimicrobianos sobre las propiedades de barrera y mecánicas (Han, 2000; Quintavalla y Vicini, 2002). En este sentido, en general, integridad y formación de las películas elaboradas a partir de proteínas se debe a la asociación de las mismas a través de puentes de hidrógeno, iónicos, hidrofóbicos, y covalentes (Oh *et al.*, 2004). Sin embargo, éstas fuerzas podrían verse alteradas por la adición de compuestos antimicrobianos tales como ácidos orgánicos (Cagri *et al.*, 2001) y bacteriocinas (Ko *et al.*, 2001) dando como resultado cambios en las propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua (PVA).

En este caso, los cambios sobre el espesor, permeabilidad al vapor de agua, resistencia a la tensión, porcentaje de elongación y resistencia a la punción de las películas de APSL y zeína ocasionados por la adición de diferentes concentraciones de bacteriocina se resumen en las **Tablas A2 y A3** respectivamente.

A3.4 Efecto sobre la permeabilidad al vapor de agua (PVA)

En general, las películas y/o recubrimientos elaborados a partir de proteínas presentan buenas barreras frente al oxígeno. Sin embargo, debido a su naturaleza predominantemente hidrofílica, resultan ser pobres barreras frente a la humedad (Poh *et al.*, 2004). En este caso, las películas de zeína (**Tabla A3**) presentaron valores de PVA ligeramente menores que de APSL (**Tabla A2**), lo cual resulta lógico debido a la presencia de una gran proporción de aminoácidos hidrofóbicos tales como la leucina, prolina y alanina ($\cong 35\%$) en la composición de la zeína (Poh *et al.*, 2002; Fu *et al.*, 1999). Asimismo, se sabe que la zeína forma películas con alta TS y permeabilidades al vapor de agua bajas comparada con otras proteínas (Cho *et al.*,

2002). Por otra parte, teóricamente, debido a la naturaleza hidrofóbica de las bacteriocinas (Ray *et al.*, 2001), se esperaba que la adición de la bacteriocina mejorara las propiedades de barrera de las mismas. Sin embargo, mediante un análisis estadístico se determinó que, en este caso, las concentraciones de bacteriocina adicionadas (2 500, 5 000 y 10 000 UA/mL SFP) no afectaron de manera significativa ($P>0.05$) la permeabilidad al vapor de agua de las películas de zeína y APSL.

A3.5 Efecto sobre las propiedades mecánicas

Se dice que un material de empaque debe poseer una adecuada flexibilidad y resistencia a la tensión (Oh *et al.*, 2004). Una manera de determinar este tipo de características es mediante la realización de pruebas mecánicas y de ahí la determinación de parámetros tales como % de elongación, resistencia a la tensión y punción.

En general, debido a la diferencia en la composición química de las películas de zeína y APSL, las características mecánicas de películas elaboradas con estos materiales fueron diferentes. Por ejemplo, las películas de APSL presentaron valores de porcentaje de elongación, los cuales puede dar una idea sobre la flexibilidad (Oh *et al.*, 2004), por arriba del 15%, independientemente de la concentración de bacteriocina adicionada. En tanto que para las películas de zeína estos valores se encontraron entre 1 y 1.5%.

Con respecto a la fuerza tensil (FT) o resistencia a la tensión, la cual representa el máximo esfuerzo desarrollado en las secciones de películas (Ko *et al.*, 2001), se ha observado que la adición de agentes que favorecen el entrecruzamiento de las proteínas y otros compuestos, incluyendo ácidos orgánicos, producen películas con menores valores de FT y mayor % de elongación. Es decir, que las películas más flexibles, debido a que dichas moléculas se insertan entre las cadenas de proteínas para formar enlaces de hidrógeno entre los grupos amida de las proteínas reduciendo las interacciones entre las cadenas de proteína lo cual trae

consigo un incrementando la flexibilidad y movimiento (Cagri *et al.*, 2001). En este caso, las películas de zeína presentaron valores mayores de FT (0.8- 1 Mpa) que las películas de APSL (0.23-0.25 MPa). Lo cual sugiere que las películas de APSL son más flexibles que las películas de zeína. Con respecto a la adición de bacteriocina, en general se observa un incremento en los valores de FT con respecto al control para los 2 tipos de películas, con respecto al control. Esto podría haber sido ocasionado por un re-arreglo de enlaces hidrofóbicos o un incremento en las interacciones proteína-proteína (Ko *et al.*, 2001). Sin embargo, al realizar el análisis estadístico, no se encontró diferencia significativa entre las películas control y las que contenían bacteriocina.

Finalmente, la adición de bacteriocina no afectó significativamente la resistencia a la punción de las películas de APSL. Sin embargo, para las películas de zeína el comportamiento fue diferente ya que aunque los valores de resistencia a la punción con bacteriocina no fueron diferentes entre sí ($P>0.05$), éstos sí fueron significativamente mayores que los observados en el control; lo cual podría haber sido ocasionado un re-arreglo de enlaces hidrofóbicos o un incremento en las interacciones proteína-proteína debido a la adición de la bacteriocina.

Tabla A2 Efecto de la concentración de pediocina sobre las propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua de películas de aislado de proteína de suero de leche (APSL)

Concentración (UA/mL SFP)	Espesores (μm)	Permeabilidad al vapor de agua (g mm / m ² h kPa)	% Elongación	Resistencia a la tensión (RT) (MPa)	Resistencia a la punción (RP) (N)
0	121.034 ^a (±5.92)	1.351 ^a (±0.081)	17.37 ^a (±2.54)	0.231 ^a (±0.012)	3.71 ^a (±0.34)
2500	112.92 ^a (±5.84)	1.361 ^a (±0.121)	17.97 ^a (± 5.37)	0.27 ^a (±0.013)	3.53 ^a (±0.33)
5000	116.6 ^a (±5.86)	1.596 ^a (±0.076)	19.81 ^a (± 4.337)	0.26 ^a (±0.012)	3.80 ^a (±0.38)
10000	117.88 ^a (±7.1)	1.556 ^a (±0.111)	15.69 ^a (± 2.87)	0.23 ^a (±0.012)	3.53 ^a (±0.33)

Promedios en una misma columna seguidos por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes (P<0.05). Comparación de medias Duncan (P≤0.05, n=5).

Tabla A3 Efecto de la concentración de pediocina sobre las propiedades mecánicas y permeabilidad al vapor de agua de películas de zeína

Concentración (UA/mL SFP)	Espesores (μm)	Permeabilidad al vapor de agua (g mm / m ² h MPa)	% Elongación	Resistencia a la tensión (TS) (MPa)	Resistencia a la Punción (N)
0	170.2 ^a (±6.8)	0.982 ^a (±0.299)	1.08 (±0.35)	0.81 ^a (±0.18)	2.76 (±0.25) ^a
2500	175.56 ^a (±3.8)	0.906 ^a (±0.160)	1.37 (±0.22)	0.87 ^a (±0.17)	3.50 ^b (±0.34) ^b
5000	174.16 ^a (±0.1)	1.165 ^a (±0.066)	1.3 (±0.24)	0.85 ^a (±0.08)	3.74 ^b (±0.55) ^b
10000	172.88 ^a (±0.7)	1.016 ^a (±0.312)	1.1 (±0.28)	0.98 ^a (±0.12)	3.98 ^b (±0.20)

^{a-b} Promedios en una misma columna seguidos por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes (P<0.05). Comparación de medias Duncan (P≤0.05, n=5)

A3.6 Efecto de la concentración de cera de candelilla en sobre las propiedades mecánicas, de barrera y microbiológicas de películas de APSL

Aunque las películas y recubrimientos elaboradas a partir de proteínas podrían proporcionar buenas propiedades de barrera a los gases a humedades relativamente bajas (Cho *et al.*, 2002), debido a su carácter hidrofílico, presentan una alta permeabilidad de vapor de agua, 2 o 4 veces más que empaques plásticos tales como el polipropileno, polietileno, poliéster y el PVC (Gennadios *et al.*, 1997). De ahí que algunos autores hayan sugerido la adición de lípidos como una medida para disminuir la permeabilidad al vapor de agua de películas elaboradas a partir de proteínas (Pérez-Gago y Krochta, 1999). En este caso, en un intento por disminuir la permeabilidad al vapor de agua de las películas de APSL se prepararon películas de APSL con diferentes niveles de cera de candelilla (0,2.5,5 y 10%), y los resultados se muestran a continuación.

A3.6.1 Efecto de la concentración de cera de candelilla sobre las propiedades mecánicas y de barrera de películas de APSL

En la tabla 4 se puede observar que las concentración de 2.5, 5 y 10% de candelilla adicionadas a las soluciones formadoras de películas de aislado de proteína de suero de leche no fueron suficientes para afectar de manera significativa el porcentaje de elongación ni la resistencia tensil (RT) de las películas. Contrario a esto, se observó que la adición de cera de candelilla disminuyó de manera significativa la permeabilidad al vapor de agua, con respecto al control. Sin embargo, aunque en la **Tabla A4** se observa que permeabilidad al vapor de agua de las películas disminuyó en proporción a la concentración de cera de candelilla presente en las mismas. Sin embargo, el análisis estadístico demostró que las películas que contenían 2.5% de cera de candelilla no presentaron diferencia en la permeabilidad al vapor de agua (1.35 g mm/m². h. KPa) con comparada con el control (1.41 g

mm/m². h. kPa). Adicionalmente, se observó que las películas con 5 y 10% mostraron permeabilidades de vapor al agua (1.140 y 1.142 g.mm/m².h.kPa, respectivamente) significativamente menores ($P \leq 0.05$) que el control. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) en la permeabilidad al vapor de agua entre las películas que contenían ya sea 2.5%, 5 o 10% de cera de candelilla (**Figura 3**). De ahí que se sugiere realizar en un futuro estudios encaminados hacia encontrar condiciones bajo las cuales la permeabilidad de las películas de aislado de proteína de suero de leche mejoren significativamente su permeabilidad al vapor de agua, sin afectar de manera negativa las propiedades mecánicas de las películas.

Tabla A4. Efecto de la concentración de cera de candelilla sobre las propiedades mecánicas de películas de aislado de proteína de suero de leche adicionadas con 10, 000 UA de pediocina/mL de SFP.

Concentración de cera de candelilla (%)	Parámetro ^{1,2}		
	Permeabilidad al vapor de agua (g mm/m ² . h. kPa)	Porcentaje de elongación	Resistencia a la tensión (MPa)
0	1.41 ^a ($\pm 1.5 \times 10^{-5}$)	11.81 ^a ($\pm 1.3.57$)	0.2637 ^a ($\pm 1.5 \times 10^{-2}$)
2.5	1.35 ^{ab} ($\pm 1.95 \times 10^{-4}$)	11.63 ^a (± 1.65)	0.2559 ^a ($\pm 2.82 \times 10^{-2}$)
5	1.140 ^b ($\pm 2.7 \times 10^{-4}$)	12.45 ^a (± 2.74)	0.3081 ^a ($\pm 4.94 \times 10^{-2}$)
10	1.142 ^b ($\pm 1.41 \times 10^{-4}$)	13.48 ^a (± 12.48)	0.5944 ^a ($\pm 6.7 \times 10^{-1}$)

¹Promedios en una misma columna seguidos por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($P < 0.05$). Comparación de medias Duncan ($P \leq 0.05$, $n=5$).

² Los valores entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar ($n=5$).

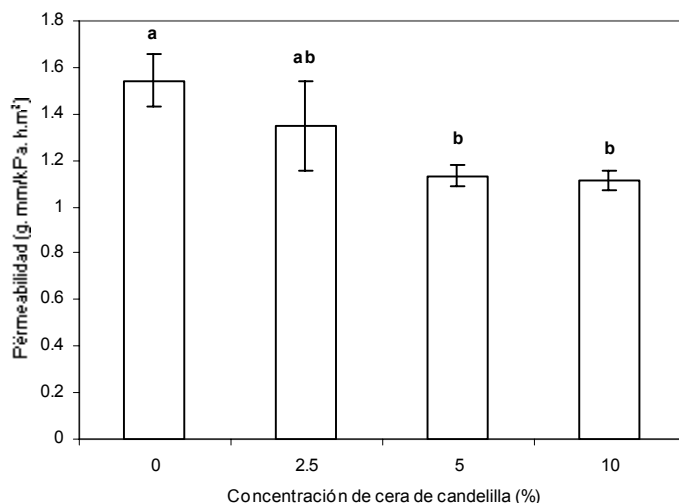


Figura A3. Efecto de la concentración de cera de candelilla sobre la permeabilidad de películas elaboradas a partir del aislado de proteína de suero de leche.

A.3.6.2 Efecto de la concentración de cera de candelilla sobre las propiedades antimicrobianas

Si bien la adición de compuestos de naturaleza hidrofóbica puede mejorar las propiedades de barrera de las películas elaboradas a partir de proteínas, también es cierto que la presencia de este tipo de compuestos también podría afectar la actividad antimicrobiana de los compuestos antimicrobianos adicionados a las películas. En la **Figura A4** se muestran el efecto de la concentración de cera de candelilla sobre la actividad antimicrobiana contra *L. innocua* de películas de aislado de proteína de suero de leche adicionadas con 10 000UA/mL de SFP. En general, no es muy evidente que la adición de cera de candelilla haya disminuido o incrementado la actividad antimicrobiana de las películas.

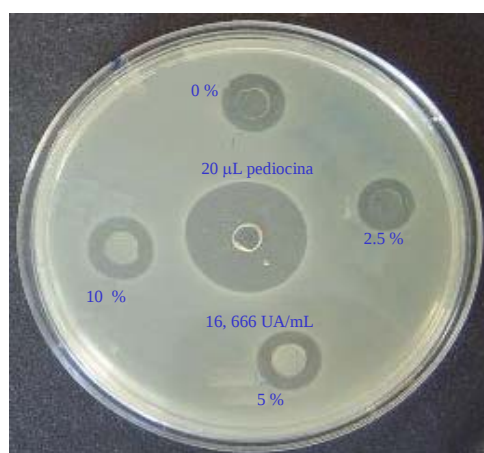


Figura A4. Efecto de la concentración de cera de candelilla sobre la actividad antimicrobiana de películas de APSL adicionadas con 10, 000UA/mL SFP. Halo central: 33 µL de una solución de pediocina (16, 666UA/mL).

Tabla A5. Efecto de la concentración de cera de candelilla en películas de aislado de proteína de suero de leche con 10, 000 UA/mL de pediocina sobre las áreas de inhibición generadas por *Listeria innocua*

Concentración de cera de candelilla (%)	Áreas de inhibición (mm ²) ¹
0	80.77 ^a ± 11.30
2.5	56.76 ^a ± 17.22
5	74.76 ^a ± 18.79
10	91.01 ^a ± 21.28

¹Promedios seguidos por diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes (P<0.05). Comparación de medias Duncan (P≤0.05, n=5).

En la **Tabla A5**, se presentan las áreas de inhibición contra *L. innocua* de películas de APSL adicionadas con 10 000 UA de pediocina/mL SFP, con diferentes concentraciones de cera de candelilla. Pese a que el análisis estadístico demostró de las áreas de inhibición generadas contra *L. innocua* no fueron afectadas de manera significativa ($P>0.05$) por la adición ya sea de 2.5, 5 o 10% de cera de candelilla. Esto sugiere la no-interacción entre la cera de candelilla y la pediocina, ocasionado por la presencia de un gran porcentaje de hidrocarburos ($\cong 50\%$) en la composición de la cera de candelilla. Pese a lo anterior, en general se observó un incremento en las áreas de inhibición contra *L. innocua* al incrementar la hidrofobicidad de las películas mediante la adición de cera de candelilla (**Figura A5**). En este sentido, coma *et al.* (2001) y Sebti y Coma (2002) encontraron que la actividad de la bacteriocina nisina incorporada en películas de hidroxipropilmetilcelulosa se redujo cuando se adicionó ácido esteárico a la formulación de las películas, y sugirieron que esta reducción podría haber sido ocasionada por el establecimiento de interacciones electrostáticas establecidas entre la nisina y el ácido esteárico. Más tarde, Sebti *et al.*, (2003) encontraron que la actividad antimicrobiana de la nisina incorporada en películas de hidroxipropilmetilcelulosa se incrementaba con la naturaleza hidrofóbica de la matriz polimérica. Por su parte Leung *et al.* (2003) encontraron que la actividad antimicrobiana de la nisina era mayor cuando se colocaba como recubrimiento sobre películas poliméricas sintéticas con valores mayores de hidrofobicidad. De ahí que suene coherente que la actividad antimicrobiana de las películas de APSL se haya incrementado como resultado en la hidrofobicidad de las películas de APSL debido a la presencia una mayor concentración de cera de candelilla, aunque falta realizar más estudios para sostener tal hipótesis pues hubo una gran variación en los resultados obtenidos (**Tabla A5, Figura A6**).

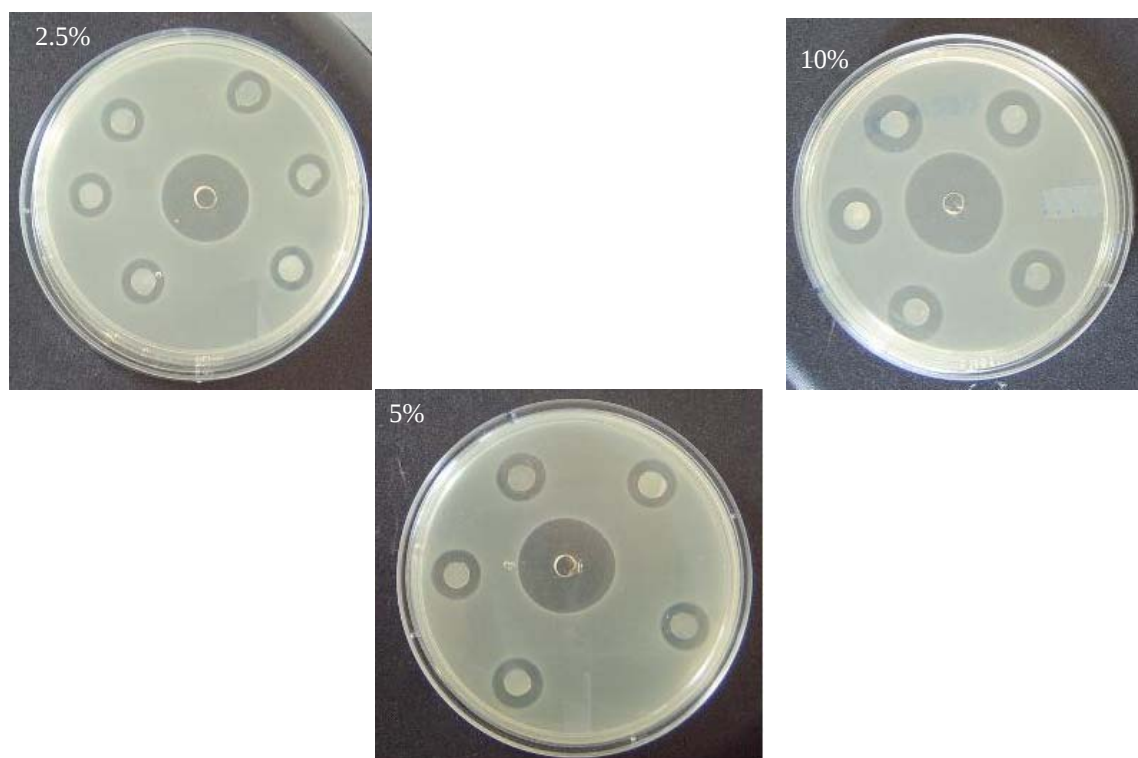


Figura A5. Actividad antimicrobiana contra *L. innocua* de películas de APSL adicionadas con 10, 000UA/mL SFP y con 2.5, 5, y 10% de cera de candelilla. Halo central: 30 µL de una solución de pediocina (16, 666UA/mL).

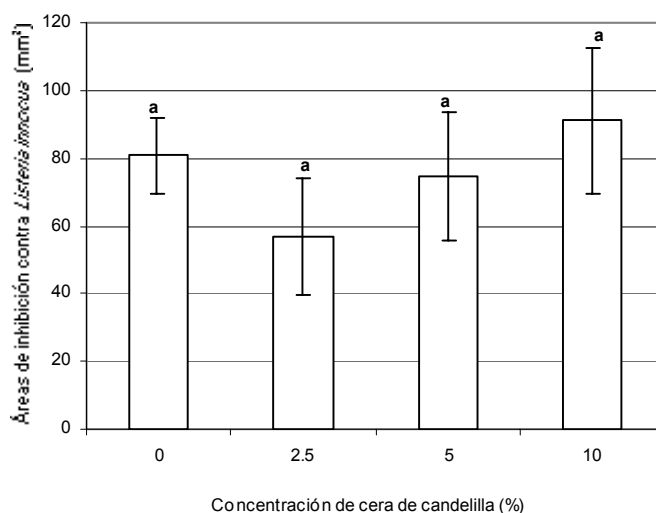


Figura A6. Efecto de la concentración de cera de candelilla sobre las áreas de inhibición generadas por películas de APSL adicionadas con 10 000UA/mL de pediocina

A4. Conclusiones

- ◆ Niveles de pediocina de 2 500, 5 000 o 10 000 UA/mL SFP pueden adicionarse a las soluciones formadoras de películas de aislado de proteínas de suero de leche y zeína de maíz para incrementar de manera significativa ($P < 0.05$) la actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* sin afectar de manera significativa ($P > 0.05$) el espesor, la resistencia tensil, el porcentaje

de elongación y la permeabilidad al vapor de agua de las películas de aislado de proteína de suero de leche y zeína de maíz.

- ♦ La adición de pediocina no afectó de manera significativa ($P < 0.05$) la resistencia a la punción de las películas de APSL pero sí a las películas de zeína.
- ♦ La adición de cera de candelilla puede ser una alternativa para disminuir la permeabilidad de vapor de agua de las películas de APSL sin comprometer la actividad antimicrobiana de la pediocina contenida en las mismas, así como las propiedades mecánicas. Sin embargo, más estudios deben ser realizados para comprobar ésta hipótesis.

A5. Bibliografía

1. ATSM. 2002. Standard test methods for water vapor transmission of materials: E96-00^{ε1}.
2. Oh JH, Wang B., Field P.D., Aglan H.A.. 2004. Characterization of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase. Int J Food Sci Technol 39:287-294.
3. Pérez-Gago MB, Krochta JM. 1999. Water vapor permeability of whey protein emulsion films as affected by pH. J Food Sci. 695-698.
4. Poh H., Dawson P., Acton J., Ogale A. 2004. Soy protein isolate/corn zein laminated films: transport and mechanical properties. J Food Sci 67(1):212-17

Anexo 2.: Producción científica

a) Artículos en revistas internacionales arbitradas:

1. **Quintero-Salazar B.**, Guerrero-Legarreta I., Vernon Carter EJ., Ponce-Alquicira E. 2005. Incorporation of the antilisterial bacteriocin-like substance from *Pediococcus parvulus* VKMX133 into film-forming protein matrices with different hydrophobicity. *J Food Sci* 70(9):M398-403.

b) Presentación de trabajos en congresos nacionales e internacionales:

1. **Quintero-Salazar B.**, Guerrero-Legarreta I., Vernon Carter E.J., Ponce-Alquicira E. 2005. Elaboración de películas biodegradables con actividad antilisteria y su aplicación en productos cárnicos. "V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos". Puerto Vallarta, Jalisco, del 4 al 7 de septiembre.
2. Ponce-Alquicira E, **Quintero-Salazar B**, Vernon Carter EJ, Guerrero-Legarreta. 2005. Antimicrobial activity of bacteriocins in hydrophilic and hydrophobic protein films. *International Food Technology (IFT) Annual Meeting*. Nueva Orleans, Louisiana, del 15 al 20 de Julio.
3. **Quintero-Salazar B.**, Guerrero-Legarreta I., Vernon Carter EJ., Ponce-Alquicira E. 2004. Release of pediocin from corn zein films and its antibacterial activity on *Listeria innocua*. *International Food Technology (IFT) Annual Meeting*. Las Vegas, Nevada, del 12 al 16 de Julio.

4. **Quintero-Salazar B.**, Guerrero-Legarreta I., Vernon Carter EJ., Ponce-Alquicira E. 2004. Migración de pediocina incorporada en películas biodegradables con diferentes características hidrofóbicas. 2004. "25 Encuentro Nacional de la Asociación Mexicana de Ingeniería Química (AMIDIQ)". Puerto Vallarta, Jalisco, del 4 al 7 de mayo.
5. **Quintero-Salazar B.**, Guerrero-Legarreta I., Vernon Carter E.J., Ponce-Alquicira E. 2004. Release of pediocin from corn zein films and its antibacterial activity on *Listeria innocua*. *International Food Technology (IFT) Annual Meeting*; Las Vegas, Nevada, del 12 al 16 de Julio.
6. **Quintero-Salazar B.**, Vernon Carter E.J., Guerrero-Legarreta I., Ponce-Alquicira E. 2003. Use of Pediocin of *Pediococcus parvulus* as an alternative to immobilize antimicrobials into biodegradable films. *International Food Technology (IFT) Annual Meeting*; Las Chicago, Illinois del 12 al 16 de Julio.

c) Trabajos aceptados para su futura presentación en congresos

1. Ponce-Alquicira E, **Quintero-Salazar B**, Vernon Carter EJ, Guerrero-Legarreta I. 2006. Antimicrobial activity of corn zein and whey protein isolate added with pediocin against several strains of *Listeria monocytogenes*. *International Food Technology (IFT) Annual Meeting*. Orlando Florida, del 24 al 28 de junio.
2. 1. Ponce-Alquicira E, **Quintero-Salazar B**, Vernon Carter EJ, Guerrero-Legarreta, Regalado González C. 2006. Effect of pediocin concentration on antimicrobial, mechanical, and barrier properties of corn zein and whey protein isolate films. *International Food Technology (IFT) Annual Meeting*. Orlando Florida, del 24 al 28 de junio.

Incorporation of the Antilisterial Bacteriocin-like Inhibitory Substance from *Pediococcus parvulus* VKMX133 into Film-forming Protein Matrices with Different Hydrophobicity

BACILIZA QUINTERO-SALAZAR, E. JAIME VERNON-CARTER, ISABEL GUERRERO-LEGARRETA, AND EDITH PONCE-ALQUICIRA

ABSTRACT: The antilisterial bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Pediococcus parvulus* VKMX133 was incorporated into protein film matrices of ethanol-soluble corn zein (CZ), and water-soluble whey protein isolate (WPI). Various BLIS concentrations were added to film-forming solutions (FFS), cast, dried, and cut in circular sections (28.27 mm²). Antimicrobial activity of films was evaluated by measuring inhibition zones against *Listeria innocua* ATCC 33090 on tryptic soy broth (TSB) agar. BLIS released from films into water at 10 °C was determined. Film effectiveness was evaluated by measuring the reduction of *L. innocua* population (10⁸ colony-forming units [CFU]/mL) in peptone water where film sections were immersed. Film topography was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The minimum BLIS concentration in FFS to generate films with antimicrobial activity was 833 and 3333 arbitrary units per milliliter (AU/mL) for CZ and WPI, respectively. BLIS released into water was detected only for CZ films. Antimicrobial CZ films were more effective in reducing *L. innocua* population than WPI films at the same BLIS concentrations. SEM showed that surface topography was porous for CZ and more closed and compact for WPI films. BLIS can be entrapped into film protein matrices to produce edible antimicrobial packaging. However, BLIS inhibitory action against *L. innocua* and release were dependent on film nature and topography, and probably on hydrophobic and electrostatic interactions arising between the protein matrices and BLIS. High concentration of bacteriocin in films does not necessarily improve their effectiveness against *L. innocua*.

Keywords: bacteriocin-like, *Pediococcus parvulus*, antilisterial, release, edible films

Introduction

Antimicrobial edible packaging is a research area that is increasing nowadays. It could prolong the shelf life and safety of foods by preventing the growth of both pathogenic and spoilage microorganisms as a result of the extension of their lag-phase and/or by the reduction of their growth rate (Han 2000; Quintavalla and Vicini 2002). In addition, antimicrobials can be gradually released on the food surface (Chen and Hoover 2003) and therefore, smaller amounts are needed to achieve the target shelf life. Also, loss of bacteriocin activity due to proteases and reactions with other food components would be prevented by this method (Hoffman and others 2001; Min and Krochta 2005).

Several compounds including organic acids (Cagri and others 2001; Eswaranandam and others 2004), lysozyme (Padgett and others 1998), lactoferrin, lactoperoxidase (Min and Krochta 2005), and bacteriocins (Ming and others 1997; Padgett and others 1998, 2000; Siragusa and others 1999; Scanell and others 2000; Ko and others 2001; Cha and others 2002; Grower and others 2004) have been incorporated as antimicrobials into film-forming materials. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria are cationic, hydrophobic,

and amphiphilic peptides, with antibacterial activity against many Gram-positive bacteria (Ray and others 2001; Chen and Hoover 2003). Among them, *Listeria monocytogenes* is a food-borne pathogen that grows even at refrigeration temperatures (Chi-Zhang and others 2003) commonly used to store milk, cheese, and ready-to-eat meat products (Bell and Kyriakides 1998; Grower and others 2004). This bacteria causes a food-borne infection with high mortality called listeriosis, affecting pregnant women, immunocompromised persons, and elderly persons (Sebti and others 2003; Bell and Kyriakides 1998).

Nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subs *lactis* (Cleveland and others 2001) has been incorporated into several film materials, and its antimicrobial activity has been tested against several microorganisms including *L. monocytogenes* (Ko and others 2001; Chi-Zhang and others 2003; Lungu and Johnson 2005). However, nisin A may be less soluble and thus less active when exposed to pH close to neutrality as in meat products (Rollemma and others 1995). Alternatively, pediocin PA-1 (AcH) produced by *Pediococcus acidilactici* presents antilisterial activity, and it is stable in a broad pH range, showing promising potential to be used in meat (Cleveland and others 2001). Nonetheless, there are few reports in which bacteriocins produced from *Pediococcus* have been incorporated into film materials (Ming and others 1997).

Whey protein isolate (WPI) produces transparent, flexible, colorless, and odorless films with excellent oxygen, aroma, and oil barrier properties (Min and Krochta 2005). Corn zein (CZ) is a hydrophobic protein, forming tough and glossy films with antioxidant

MS 20050297 Submitted 5/18/05, Revised 6/5/05, Accepted 7/28/05. Authors Quintero-Salazar, Guerrero-Legarreta, and Ponce-Alquicira are with Dept. de Biotecnología, Univ. Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, C. P. 09340, Mexico, D. F., Mexico. Author Vernon-Carter is with Dept. de Ingeniería Hidráulica. Univ. Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico, D. F., Mexico. Direct inquiries to author Ponce-Alquicira (E-mail: pae@xanum.uam.mx).

properties (Fu and others 1999). Both proteins can be used as matrices for bacteriocin incorporation in biodegradable packaging.

The objective of this work was to incorporate the class II antilisterial bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by *Pedococcus parvulus* VKMX 133 (Schneider and others 2005) into edible protein matrices made of hydrophobic ethanol-soluble corn zein (CZ) and hydrophilic water-soluble WPI. Films were evaluated for (1) antimicrobial activity at several BLIS concentrations to determine the minimal BLIS concentration to generate inhibition, (2) BLIS release into water at 10 °C, (3) the antibacterial effectiveness against *L. innocua* population, and (4) analysis of surface topography by scanning electron microscopy (SEM).

Materials and Methods

Materials for films

Films were made with WPI (Biopro, Davisco Foods Intl., Inc., Le Sueur, Minn., U.S.A.) or corn zein (CZ) (F-4000 regular grade, Freeman Industries, Tuckahoe, N.Y., U.S.A.). Glycerol, used as plasticizer, and ethanol were obtained from J.T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, N.J., U.S.A.).

Microorganisms and media

The BLIS producer *P. parvulus* VKMX133 was isolated from “chorizo,” a traditional Mexican fermented meat product, by Dr M. Collins’ research group (Queen’s Univ. of Belfast). It belongs to Class II antilisterial bacteriocins with the YGNGV consensus motif. It is stable at high temperatures and over a wide pH range (Schneider and others 2005). *P. parvulus* was grown in casein-glucose broth (CGB) media (Bhunia and others 1988) and incubated at 37 °C. *Listeria innocua* ATCC 33090 was used as an indicator strain to ensure safety issues as it is a nonpathogenic strain, although it is known to be effective against *L. monocytogenes* (Ponce-Alquicira and others 2005; Schneider and others 2005). *L. innocua* was grown in tryptic soy broth (TSB) (Difco, Detroit, Mich., U.S.A.) added with 0.6% yeast extract (Bioxon, Becton Dickinson, Edo, Mexico). Stocks were stored with 20% glycerol at –80 °C. *L. innocua* counts were performed by plating decimal dilutions on PALCAM-*Listeria*-Selective agar (Merck, Darmstadt, Germany).

Bacteriocin-like inhibitory substance extraction

Partially purified BLIS from *P. parvulus* VKMX133 was obtained using the absorption-desorption procedure of Yang and others (1992), with minor modifications. BLIS absorption was carried out at a pH value of 5.5. After centrifugation (1500 × g, for 15 min at 4 °C), cells were washed with 5 mM sodium phosphate (pH 6.5) and resuspended for desorption in NaCl (100 mM, pH 2). The extract free of cells was dialyzed using a 1000-kDa cut-off dialysis tubing (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.) against distilled water, and finally freeze-dried using a Labconco model 77510 freeze-drying system (Labconco Corp., Kansas, Mich., U.S.A.).

BLIS antimicrobial activity

The antimicrobial activity of BLIS was measured by the agar well diffusion test (Bhunia and others 1988), with some modifications, on TSB agar added with 0.6% of yeast extract. Hard TSB agar (1.5%) was used to support 10 mL of soft TBS agar (0.8%) previously inoculated with an overnight culture of *L. innocua* (10⁵ to 10⁶ colony-forming units [CFU]/mL). Wells of approximately 6 mm in diameter were made on the soft agar. Semi-purified freeze-dried BLIS was dissolved in sterile water and was 2-fold serially diluted; 30 µL of each dilution was placed into wells and kept at 4 °C for 4 h to allow BLIS diffusion. After 24 h of incubation at 37 °C, plates were examined for inhibition

zones. BLIS activity, expressed as arbitrary units per milliliter (AU/mL), was calculated as the reciprocal of the highest dilution of the BLIS that produced at least a 2-mm-dia zone of inhibition on the sensible lawn divided by the amount of sample (30 µL). BLIS presented an activity of 3333 AU/mg of freeze-dried BLIS extract.

Preparation of film-forming solutions

Film-forming solutions (FFS) were prepared as follows: CZ films were prepared by casting according to the method reported by Hoffman and others (2001). CZ (6.75 g) was dissolved in 40.6 mL of 95% ethanol with stirring. Glycerol (1.9 g) was added as plasticizer, and the mixture was heated slowly to a boil while stirring. Film solution was boiled during 5 min to reduce gas bubbles in the films during casting. The pH of CZ FFS was 6.57 at room temperature (pH meter φ 50 model M0355.0001, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Calif., U.S.A.). WPI films were prepared according to the method reported by Ko and others (2001) with some modifications. WPI (7 g) was dissolved in distilled water (93 mL); pH was adjusted to 8.0 with 1.0 N NaOH to enhance protein film formation (Khwalidia and others 2004) and heated at 90 °C during 30 min in a water bath. Glycerol (3.5 g) was added, and the solution was homogenized for 1 min at 12000 rpm using a biohomogenizer M133/1281-0 (Biospect Products Inc, Bartlesville, Switzerland). These conditions of elaboration were standardized to ensure maximum stability of the BLIS.

Preparation and casting of antimicrobial films

BLIS previously dissolved into phosphate buffer (pH = 7, 0.1 M) was added in various amounts to 10 mL of the FFS to obtain the desired BLIS concentration for each assay (0, 50, 100, 208, 416, 833, 1666, 3333, 6666, 8333, 16666, 33333, or 50000 AU/mL of FFS). Then, volumes of 2.5 mL were pipetted and spread into 50 × 10 mm Petri dishes and allowed to dry overnight in a laminar flow hood at room temperature. Control films were prepared without BLIS addition. After that, films were peeled and cut into circular film discs of 6 mm dia (24.27 mm²) and stored at 4 °C. All experiments were performed by using these film sections.

Film thickness

A digital micrometer (Model 293-815, Mitutoyo, Japan) was used to determine film thickness. Micrometer readings were taken randomly at 10 different sections of films and then averaged.

Antimicrobial activity assay for films

Antibacterial activity of films against *L. innocua* was analyzed by the agar diffusion test, but in this case, circular film sections (approximately 24.27 mm²) were placed on the surface of TSB-soft agar prepared as before. Plates were stored at 4 °C for 4 h to allow BLIS diffusion, and then incubated at 37 °C for 24 h. To calculate the inhibition area, plates were examined for zones of inhibition around the film sections; the area of the whole zone was calculated and then the film section area was subtracted. This difference was reported as the inhibition area (Padgett and others 1998).

BLIS release from films into water

BLIS released from films into water was determined by immersing circular film sections (28.27 mm²) into test tubes containing 1 mL of distilled water. To ensure observable measurable inhibition areas, high BLIS concentrations (16666, 33333, and 50000 AU/mL) were added to FFS for this assay. Tubes containing films were shaken continuously at 100 rpm and 10 °C using an orbital shaker (Model G24, New Brunswick Scientific, Inc., N.J., U.S.A.) during 48 h. The amount of the released BLIS from films into water over time was determined by the agar diffusion test. Inhibition diameters gener-

Table 1—Effect of bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) concentration on film thickness and inhibition areas against *Listeria innocua*^{a,b}

BLIS concentration (AU/mL)	CZ films		WPI films	
	Thickness (mm)	Inhibition area ^c (mm ²)	Thickness (mm)	Inhibition area (mm ²)
0	0.186 ± 0.040a	ND	0.091 ± 0.021a	ND
416	0.189 ± 0.015a	ND	0.095 ± 0.018ab	ND
833	0.193 ± 0.050a	13.55 ± 6.80a	0.093 ± 0.015ab	ND
1666	0.181 ± 0.009a	43.06 ± 11.66a	0.094 ± 0.010abc	ND
3333	0.188 ± 0.007a	73.89 ± 10.42b	0.101 ± 0.027abcd	28.79 ± 15.71a
5000	0.195 ± 0.016a	106.61 ± 12.24c	0.111 ± 0.030bcd	45.16 ± 14.62a
6666	0.196 ± 0.010a	136.46 ± 27.20c	0.113 ± 0.024bcd	49.54 ± 31.71a
8333	0.195 ± 0.014a	176.51 ± 14.96d	0.114 ± 0.015cd	34.81 ± 25.38a
16666	0.183 ± 0.015a	212.65 ± 32.64e	0.119 ± 0.020de	85.93 ± 6.00b
33333	0.176 ± 0.021a	255.38 ± 8.72f	0.136 ± 0.013ef	118.85 ± 13.15b
50000	0.194 ± 0.019a	297 ± 16.10g	0.145 ± 0.017f	118.72 ± 6.68b

^aMeans of inhibition areas with different letters in the same column are significantly different ($P \leq 0.05$).

^bAU = arbitrary units; CZ = corn zein films; ND = inhibition not detected; WPI = whey protein films.

^cInhibition areas were measured around the film sections.

ated by the test solutions were measured, and the BLIS concentration was calculated by interpolation in a BLIS standard curve.

Preparation of the BLIS standard curve

Standard curve was obtained by preparing a stock solution of 10 mg/mL BLIS diluted in sterile water. Solutions containing various BLIS concentrations (0.004 to 1 mg/mL) were prepared from the stock solution. Antimicrobial activity of solutions was determined by diffusion test by measuring the inhibition zone generated against *L. innocua* after incubation at 37 °C for 24 h. Standard curve was obtained by plotting inhibition areas (mm²) (Y-axis) and log BLIS concentration in AU/mL (X-axis). Regression analysis was used to calculate the BLIS released into water over time.

Determination of antimicrobial effectiveness of films to reduce *L. innocua* population

An overnight culture of *L. innocua* was centrifuged at 1500 × g for 15 min. Cells were washed twice with 10 mL of peptone water (0.1%) (Padgett and others 2000). The obtained pellet was re-suspended into 99 mL of peptone water to get a cellular suspension containing 10⁸ CFU/mL of *L. innocua*. Then, circular film sections were immersed into tubes containing 1 mL of the cellular suspension. Tubes were shaken continuously at 100 rpm at 10 °C during 24 h. Temperature was selected to simulate abuse in refrigeration conditions. Then, viable counts of *Listeria* were determined during 24 h on the PALCAM-*Listeria* selective agar plates, which were incubated at 35 °C.

Film outer topography and inner microstructure (SEM)

Film outer topography and cross-section microstructure of CZ and WPI films without BLIS and with 16666 AU BLIS/mL FFS were analyzed by using scanning electron microscopy (SEM). Film sections were cut (10 × 5 mm) and then fixed with 5% glutaraldehyde (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo., U.S.A.) in 20 mM phosphate buffer (Baker) pH 7.4, for 24 h at 4 °C. Afterward, samples were washed with 20 mM phosphate buffer, pH 7.4 until free of glutaraldehyde odor. Samples were treated with 2% osmium tetroxide (Sigma) for 2 h and then dried to critical point using carbon dioxide (CO₂ at 73 atm, 31 °C) in a Samdri-780 B dried (Tousimis Research Co., Rockville, Md., U.S.A.). Fixed and dried samples were coated with a 25-nm gold layer using a vacuum evaporator (Bal-Tec, Liechtenstein) and finally observed in a JEOL scanning electron microscope (JEOL JSM-5900 LV, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

All experiments were replicated at least 3 times. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and means were compared by Duncan's multiple range test using SPSS 8.0 for Windows (SPSS 8.0 Inc., Chicago, Ill., U.S.A.). Significance was established at $P \leq 0.05$.

Results and Discussion

Visual description of films

WPI films were transparent, whereas CZ films were yellow and opaque. Both WPI and CZ formed flexible films in the absence of BLIS, but films became less flexible and more opaque as BLIS was added in increasing concentrations. WPI films tended to stick to the Petri dishes when cast, being more difficult to retrieve as BLIS concentration increased.

Effect of BLIS concentration on thickness and antimicrobial activity of films

CZ and WPI film thicknesses are shown in Table 1. CZ films were noticeably thicker than WPI films. CZ film thickness did not increase significantly ($P > 0.05$) with increasing BLIS concentration, whereas WPI films thickness showed a more complex relationship with BLIS concentration. WPI films with BLIS concentrations below 5000 AU/mL were nonsignificantly different ($P > 0.05$) from control film. WPI films with BLIS concentrations of 5000 AU/mL or more were significantly different ($P \leq 0.05$) from control film, and films with BLIS concentrations of 33333 and 50000 AU/mL were the thickest and were not significantly different ($P > 0.05$) between themselves.

Inhibition areas generated by CZ and WPI films containing increasing concentrations of BLIS are (Table 1). CZ films generated higher inhibition areas than WPI films, regardless of BLIS concentration. The minimum necessary BLIS concentration in FFS to generate films with some inhibition effect against *L. innocua* on TSB-agar was 833 AU/mL for CZ and 3333 AU/mL for WPI films. In general terms, for CZ films, inhibition areas increased significantly ($P \leq 0.05$) as BLIS concentration increased. WPI films showed a low (3333 to 8333 AU/mL) and a high (16666 to 50000 AU/mL) BLIS concentration ranges that produced significantly different ($P \leq 0.05$) inhibition areas, but within each of these ranges the inhibition areas were not significantly different ($P > 0.05$).

Some strains of *P. parvulus* may produce bacteriocins with identical amino acid sequence as pediocin PA-1/AcH (Bennick and others 1997; Ray and Miller 2000). Results of the partial characterization of the bacteriocin produced by *P. parvulus* VKMX133 suggest that it is a

Table 2—Percent of the total bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) in Corn Zein (CZ) films that was released into water at 10 °C over time

BLIS conc. (UA/mL FFS) [UA/ mm ² film]	Film Code	Release time (h)						
		0.5	1	2	4	8	24	48
16 666 [20.20]	CZ-16	15.27 ± 7.44Aa	13.16 ± 5.04Aa	12.67 ± 6.70Aa	14.08 ± 3.59Aa	11.24 ± 5.04Aa	12.58 ± 6.72Aa	10.00 ± 3.19Aa
33 333 [46.65]	CZ-33	46.63 ± 9.43 Bb	40.00 ± 28.98ABa	50.97 ± 24.83Bb	60.73 ± 12.61Bb	57.12 ± 17.35Bb	38.10 ± 10.48ABb	19.03 ± 9.84Aa
50 000 [65.15]	CZ-50	33.70 ± 19.11Ab	82.83 ± 28.44Bb	90.34 ± 33.81Bc	91.17 ± 22.76Bc	46.74 ± 10.07Ab	41.45 ± 11.90Ab	38.37 ± 15.00Ab

A-B Means in each horizontal row followed by the same capital letter are not significantly different as determined by Duncan's Multiple Range test ($n = 5$, $P \leq 0.05$).

a-c Means in each vertical column followed by the same lower-case letter are not significantly different as determined by Duncan's Multiple Range test ($n = 5$, $P \leq 0.05$).

AU = arbitrary units; FFS = film-forming solutions.

bacteriocin very similar to class II pediocin (Schneider and others 2005), and like other bacteriocins of lactic acid bacteria, it is a cationic and hydrophobic peptide (Ray and others 2001) with an isoelectric point of 8.65 (Schneider and others 2005). On the other hand, CZ proteins contain a high proportion of nonpolar residues and are remarkably lacking in ionic groups (Fu and others 1999). The CZ control film had a pH of 6.57, and the addition of BLIS in increasing concentrations increasingly lowered the pH values of FFS, which were 6.13, 5.36, and 5.33 for CZ films containing 16666, 33333, and 50000 AU/mL FFS, respectively. Therefore, it is conceivable that predominantly weak hydrophobic interactions may be established between the alkyl chain groups in BLIS and the nonpolar amino acids in corn zein. This is probably the reason for the relative ease of BLIS release from the CZ film matrix. On the other hand, WPI comprises several globular proteins that in their native state are water soluble; however, the heat required during the film-formation process promotes denaturation and unfolding, exposing hydrophobic and sulfhydryl groups, and induces oxidation of free sulfhydryls, disulfide bond interchange, and hydrophobic bonding. These reactions can be used to form insoluble edible films (Khwalidia and others 2004).

WPI has a markedly anionic nature; at pH values between 4.0 and 5.0, the isoelectric point of the whey protein isolate is reached, and then the charge in the proteins is zero (Ko and others 2001). In this work, pH of the WPI FFS without BLIS had a pH of 8.0. The addition of BLIS in increasing concentrations produced increasingly lower pH values of FFS, which were 6.66, 6.45, and 6.32 for WPI films containing 16666, 33333, and 50000 AU/mL FFS, respectively. At these pH values, BLIS is charged positively; thus, it is probable that stronger electrostatic interactions arose between protein matrices and FFS as pH decreased. These bonds are probably responsible for maintaining BLIS firmly attached to WPI films, restricting BLIS release and therefore decreasing BLIS activity.

Bacteriocin like inhibitory substance release from films into water

Release of BLIS from WPI films into water was not detected at the concentrations used in this study. It is probable that BLIS was electrostatically bound to WPI films, so that very small quantities diffuse into water, and therefore BLIS was not detected due to a dilution effect as reported in films containing nisin by Grower and others (2004). Total BLIS load per tested CZ film and the percentage of the total BLIS that was released into water are presented in Table 2. Compared with WPI films, BLIS was released in higher amounts from CZ films, probably due to the combination of the weak hydrophobic bonds arising between BLIS and CZ, and to the greater affinity of BLIS for water. As Table 2 shows, between 11% and 15% of the total BLIS contained in CZ-16 films was released into water, and nonsignificant differences ($P > 0.05$) were observed

during the time interval tested. These results suggest that BLIS release took place almost instantaneously when films were put in contact with water and that bacteriocin maintained its activity over the studied time. CZ-33 and CZ-50 films showed a more complex release pattern; in general terms, films exhibited an increasing BLIS release up to 4 h, followed by a continuous decrease. These results point out that release depended on BLIS concentration; however, it is probable that the decrease in BLIS release observed after 4 h could be caused by an apparent BLIS activity loss due to aggregation, as reported by Ray and others (2001) in solutions containing high bacteriocin concentrations. Regarding bacteriocin release from protein matrixes, Sebt and others (2003) found that the antimicrobial activity of film proteins increases with the hydrophobic nature of the polymeric matrix. Dawson and others (2003) found that activity of nisin released from caste and heat-pressed films was more or less constant over a 96-h period.

Antimicrobial activity of bacteriocins incorporated into film materials can be affected by interactions with film components that may reduce bacteriocin release from films. Coma and others (2001) and Sebt and Coma (2002) found that the inhibitory activity against *L. innocua* and *Staphylococcus aureus* of hydroxypropylmethyl cellulose films containing nisin was reduced when stearic acid was added to films. They suggested that electrostatic interactions between nisin and stearic acid were responsible for this phenomenon. Leung and others (2003) found that nisin antimicrobial activity was higher when it was coating on the most hydrophobic polymeric films. Ko and others (2001) reported that using nisin edible films with high hydrophobicity values under an acid environment exerted greater inhibition effect against *L. monocytogenes*. However, Teerakarn and others (2002) and Dawson and others (2003) reported that nisin diffusivity was lower from cast CZ films than from cast wheat gluten (WG) films, and its higher retention in the CZ matrix could be explained by the greater hydrophobicity of CZ protein compared with WG protein. These seemingly contradictory results can probably be attributed to pH differences in the FFS or in the media where the release was evaluated, which influenced the nature of the electrostatic interactions. When pH is different from the isoelectric point, additional strong electrostatic interactions may arise to the predominant hydrophobic interactions, restricting bacteriocin release. In addition, Cha and others (2003) found that the release of nisin was lower from κ -carragenan/methylcellulose than from chitosan/methylcellulose films at pH 7. These authors suggested that the strong electrostatic interactions between κ -carragenan and nisin were responsible for the lower diffusion of nisin into the buffer solution.

Effectiveness of films on reduction of viable count of *Listeria innocua* population

Only the WPI-50 films showed significant lower *L. innocua* levels

than the control film (Figure 1a), whereas all of the CZ films (Figure 1b), irrespective of BLIS concentration, showed significant higher ($P < 0.05$) reductions in *L. innocua* population than the control film. CZ-33 and CZ-50 films maintained the viable counts of *L. innocua* at constant values after 2 h and 4 h, respectively, until 24 h. Low levels of *L. innocua* population over a 24-h time period were not significantly different between CZ-50 and CZ-33 films, but both were significantly different from CZ-16 films and the latter from control films. This indicates that a high concentration of BLIS in films does not necessary restrain the growth of *L. innocua*, probably due to the aggregation phenomena mentioned earlier or may be due to the generation of BLIS *L. innocua* resistant cells. In other studies made with nisin, it was found that high concentration of this bacteriocin does not necessary improve the control of *L. monocytogenes*, and may induce the appearance of nisin resistant cells, as a result of changes in the fatty acid composition of the membrane (Mazzotta and Montville 1997; Chi-Zhang and others 2003).

The antimicrobial effectiveness of films containing nisin has been tested successfully against a specific population of target microorganisms in liquid media (Kim and others 2000; Padgett and

others 2000). Migration of antimicrobial substances incorporated into films is an important factor to control microbial growth on foods (Choi and others 2001). This phenomenon may be governed by the rate of migration and by the intrinsic nature of the media where release is tested (Kim and others 2000).

Scanning microscopy of films

SEM micrographs of surface topography and cross section microstructure of CZ and WPI without (not shown here) and with BLIS (16666 AU BLIS/mL FFS) (Figure 2), did not show differences in structure. In general terms, CZ films showed a porous surface characterized by numerous pinholes and being rough (Figure 2a). At the same time, CZ films are less structured and have an open network (Figure 2b). These CZ film features probably also contributed to BLIS migration into water and to the effectiveness against *L. innocua* population in a cellular suspension. Padgett and others (1998) also observed a porous surface for CZ films. WPI films presented a smooth surface topology practically devoid of pinholes (Figure 2c). A cross-sectional view shows a more uniform layered microstructure (Figure 2d). This feature, in conjunction with BLIS-WPI bonding forces, is probably responsible for the poor release properties of BLIS from WPI films in comparison to CZ films. As a result, it is expected that antimicrobial substance diffuses through the film to reach the surface, and then it is transferred to the solution through an interfacial process. Therefore, film structure may have an important role in controlling the diffusion and interfacial processes of the antimicrobial migration.

Conclusions

BLIS produced by *P. parvulus* VKMX133 can be entrapped in film protein matrices with different hydrophobicities. BLIS release from films on agar plate and into liquid media depends of the nature of the interactions arising between film protein network and BLIS. WPI and CZ film-forming solutions initial pH dropped to lower values as increasing concentrations of BLIS were added. As BLIS is cationic in nature and WPI has an anionic in nature, it is probable that electrostatic interactions arose between these proteins and

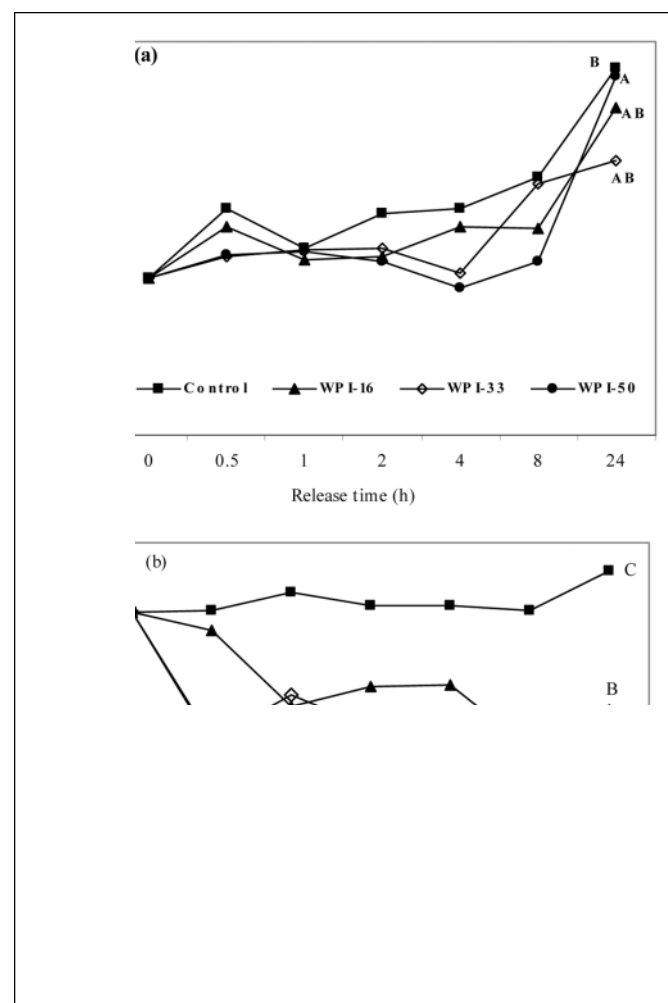


Figure 1—Effect of bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) concentration (AU/mL FFS) on the viable counts of *Listeria innocua*, at 10 °C in (a) whey protein isolate (WPI) films and (b) corn zein (CZ) films. (Means were compared by Duncan's multiple range test; curves with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$) over the whole experimental trial).

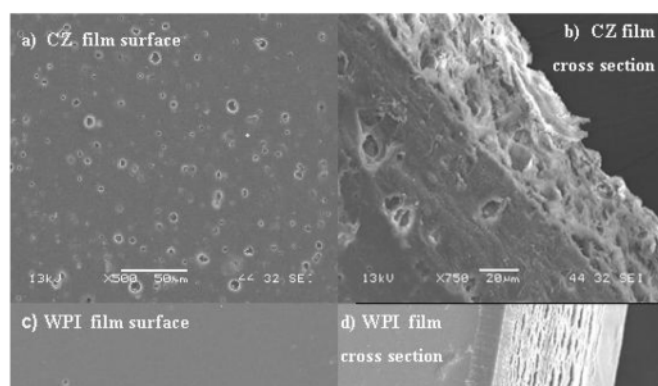


Figure 2—Scanning electron micrographs of surface and cross sections of corn zein (a and b) and whey protein isolate (WPI) films (c and d), respectively containing 16666 BLIS (AU/mL FFS).

BLIS. WPI-BLIS interactions are likely to be stronger than those arising between CZ-BLIS, due to stronger anionic nature of WPI than CZ. With the latter protein, probably hydrophobic interactions with BLIS predominate over electrostatic interactions. In addition, surface topology of CZ films shows a porous structure, whereas WPI films are more closed and compact. The combined surface type of binding of the films determines BLIS release, antimicrobial activity, and antimicrobial effectiveness which were best for CZ films. Finally, high concentrations of BLIS did not improve the microbial effectiveness against *L. innocua*, as high BLIS concentrations in films may lead to aggregation phenomena that reduce antimicrobial effectiveness of CZ films. Other factors such as the effect of pH on BLIS release from films and their application of films on a real food system such as meat or meat products need to be studied.

Acknowledgments

We acknowledge the support of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) of Mexico for graduate studies scholarships. We also thank Dr José Sepulveda for his assistance in the SEM analysis and Dr Margaret Lee Zoreda for her assistance in the revision of this manuscript. Thanks to the engineer Diego Pineda of Davisco Foods Intl. Inc., Mexico City office, for supplying us with whey protein isolate and to Freeman Industries, Tuckahoe, N.Y., for providing corn zein for the research.

References

- Bell C, Kyriakides A. 1998. *Listeria*: a practical approach to the organism and its control in foods. 1st ed. London: Blackie Academic & Professional. 150 p.
- Bennik MHJ, Smid EJ, Gorris LGM. 1997. Vegetable-associated *Pediococcus parvulus* produces pediocin PA-1. *Appl Environ Microbiol* 63:2074–6.
- Bhunia AK, Johnson MC, Ray B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J Appl Bacteriol* 70:25–30.
- Cagri A, Ustunol Z, Ryser ET. 2001. Antimicrobial, mechanical and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. *J Food Sci* 66(6):865–70.
- Cha DS, Cooksey K, Chinnan MS, Park HJ. 2003. Release of nisin from various heat pressed and cast films. *Lebensm Wiss Technol* 36:209–13.
- Cha DS, Choi JH, Chinnan MS, Park HJ. 2002. Antimicrobial films based on Na-alginate and κ -carrageenan. *Lebensm Wiss Technol* 35:715–9.
- Chen H, Hoover DG. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 2:82–100.
- Chi-Zhang Y, Yam KL, Chikindas ML. 2003. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly release into a broth system. *Int J Food Microbiol* 90(1):15–22.
- Choi JO, Park JM, Park HJ, Lee DS. 2001. Migration of preservative from antimicrobial coating into water. *Food Sci Biotechnol* 10(3):327–30.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71:1–20.
- Coma V, Sebtí I, Pardon P, Deschamps A, Pichavant FH. 2001. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. *J Food Prot* 64(4):470–5.
- Dawson PL, Hirt DE, Rieck JR, Acton JC, Sothibandhu A. 2003. Nisin release from films is affected by both protein type, and film-forming method. *Food Res Int* 36:959–68.
- Eswaranandam S, Hettiarachchy NS, Johnson MG. 2004. Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminaria*. *J Food Sci* 69(3):79–84.
- Fu D, Weller CL, Wehling RL. 1999. Zein: proteins, preparations, and applications. *Food Sci Biotechnol* 8(1):1–10.
- Grower JL, Cooksey K, Getty K. 2004. Release of nisin from methylcellulose-hydroxypropyl methylcellulose film formed on low-density polyethylene film. *J Food Sci* 64(4):107–11.
- Han JH. 2000. Antimicrobial food packaging. *Food Technol* 54(3):56–65.
- Hoffman KL, Han IY, Dawson PL. 2001. Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid, and EDTA. *J Food Prot* 64(6):885–9.
- Khwalidia K, Perez C, Banon S, Desobry S, Hardy J. 2004. Milk proteins for edible films and coatings. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:239–51.
- Kim YM, Lee NK, Paik HD, Lee DS. 2000. Migration of bacteriocin from bacteriocin-coated film and its antimicrobial activity. *Food Sci Biotechnol* 9(5):325–9.
- Ko S, Janes ME, Hettiarachchy NS, Johnson MG. 2001. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *J Food Sci* 66(7):1006–11.
- Leung PP, Yousef AE, Shelhammer TH. 2003. Antimicrobial properties of nisin-coated polymeric films as influenced by film type and coating conditions. *J Food Safety* 23:1–12.
- Lungu B, Johnson MG. 2005. Potassium sorbate does not increase control of *Listeria monocytogenes* when added to zein coatings with nisin on the surface of full fat turkey frankfurter pieces in a model system at 4 °C. *J Food Sci* 70(2):95–9.
- Mazzotta AS, Montville TJ. 1997. Nisin induced changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. *J Appl Microbiol* 82:32–8.
- Min S, Krochta JM. 2005. Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lacto-ferrin hydrolysate, and lactoperoxidase systems. *J Food Sci* 70(2):87–94.
- Ming X, Weber GH, Ayres JW, Sandine WE. 1997. Bacteriocin applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *J Food Sci* 62(2):413–5.
- Padgett T, Han IY, Dawson PL. 1998. Incorporation of food-grade antimicrobial compound into biodegradable packaging films. *J Food Prot* 61(10):1330–5.
- Padgett T, Han IY, Dawson PL. 2000. Effect of lauric acid addition on the antimicrobial efficacy and water permeability of corn zein films containing nisin. *J Food Proc Preserv* 24: 423–32.
- Ponce-Alquicira E, Alquicira-Páez L, Fernández-Perrino FJ, Guerrero-Legarreta L, Wachter-Rodarte C. 2005. Effect of bacteriocin concentration on spontaneous resistant induction in *Listeria* strains. http://ift.confex.com/ift/2005/tech-program/paper_30132.htm. IFT Annual Meeting; New Orleans; 16–19 July 2005.
- Quintavalla S, Vicini L. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Sci* 62:373–80.
- Ray B, Miller KW. 2000. *Pediocin*. In: Naidu AS, editor. *Natural food antimicrobial systems*. New York: CRC Press. p 525–66.
- Ray B, Miller KW, Mahendra KJ. 2001. Bacteriocin of lactic acid bacteria: current perspectives. *Indian J Microbiol* 41:1–21.
- Rollema HS, Kuipers OP, Both P, de Vos MW, Siezen RJ. 1995. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl Environ Microbiol* 61:2873–78.
- Scanell AGM, Hill C, Ross RP, Marx S, Hartmeier W, Arendt EK. 2000. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocin Lacticin 3147 and Nisaplin. *Int J Food Microbiol* 60:241–9.
- Schneider R, Fernández FJ, Aguilar MB, Guerrero-Legarreta I, Alpuche-Solís AG, Ponce-Alquicira E. 2005. Partial characterization of a class II *Pediocin* produced by *Pediococcus parvulus* 133 strain isolated from meat (Mexican “chorizo”). *Food Control* (forthcoming).
- Sebtí I, Coma V. 2002. Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. *Carbohydr Polym* 49(2):139–44.
- Sebtí I, Delves-Broughton J, Coma V. 2003. Physicochemical properties and bioactivity of nisin-containing crosslinked hydroxypropylmethylcellulose films. *J Agric Food Chem* 51:6468–74.
- Siragusa GR, Cutter CN, Willet JL. 1999. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiol* 16:229–35.
- Teerakarn A, Hirt D, Acton JC, Rieck JR, Dawson PL. 2002. Nisin diffusion in protein films: effects of film type and temperature. *J Food Sci* 67(8):3019–25.
- Yang R, Johnson MC, Ray B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58(10):1335–59.