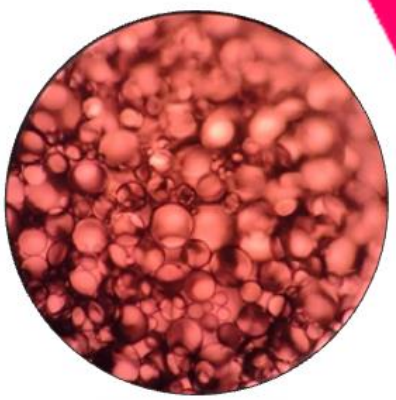
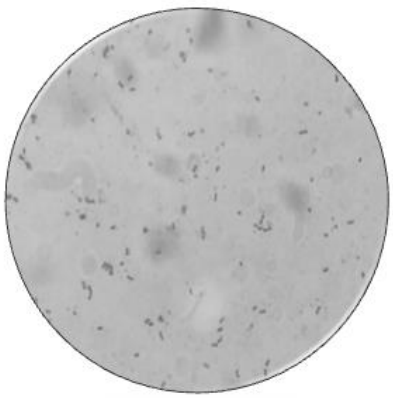
Lic. Johana Stefani Gómez

2022

PRODUCCION DE COMPUESTOS DE INTERES BIOTECNOLOGICO POR BACTERIAS LACTICAS AISLADAS DEL MEDIO MARINO PATAGONICO:

aplicaciones en la seguridad microbiológica de alimentos





UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN

Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia

Producción de compuestos de interés biotecnológico por bacterias lácticas aisladas del medio marino patagónico: aplicaciones en la seguridad microbiológica de alimentos

Licenciada Gómez, Johana Stefani

2022

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN

Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia

HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Mag. Adriana Correa Zeballos

Dr. Manuel Javier Aybar

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

Bioq. Esp. Ana Verónica Oldano

Dra. Ana Lucrecia Iruzubieta Villagra

Dra. María Antonieta Gordillo

Bioq. Constanza Presti

Lic. Vanessa Lorena Vargas Martin

Srta. Laura Guayán

Srta. Bianca Agostina Kollrich

Srta. Anabella Lagoria Lagoria

DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

VICE-DECANA

Dra. Inés del Carmen Ramos

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Susana Beatriz Ribotta

JEFE DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Carlos Leandro Puig

DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES:

DIRECTOR:

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR:

Dra. María Carolina Navarro

Dra. María Cristina Rubio

Dra. Rossana Cristina Pérez Aguilar

Dra. Cintia Mariana Romero

Dr. Diego Alejandro Sampietro

Suplentes:

Dra. Natalia Cecilia Habib

Dra. Nancy Roxana Vera

Dra. Marcela Susana Medina

Dra. Mirta María del Valle Rachid

Dra. Adriana Mónica Neske

REPRESENTANTE DE POSGRADO

ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dr. Sergio Enrique Pasteris (Titular)

Dra. Cintia Mariana Romero (Suplente)

TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTOR/A EN ALIMENTOS, ORIENTACION CIENCIAS

CARRERA DE POSGRADO DOCTORADO REGIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Acreditado y Categorizado B ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución nº: 965/99

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución nº: 1189-CONEAU-12

Director: Dr. Carlos Mario Cuevas
Vice Directora: Dra. Beatriz Lopez de Mishima

Comité AcadémicoRegional (CAR):
Directora: Dra. Silvia del Carmen Rodríguez
Vicedirectora: Dra. María Alejandra Bertuzzi
Secretario: Oscar Alfredo Garro

Representantes de las Unidades Académicas:
Dr. Oscar Alfredo Garro (UNCAUS)
Dra. María Alicia Judis (UNCAUS)
Dra. María Alejandra Bertuzzi (UNSA)
Dra. Carina Audisio (UNSA)
Dra. Sandra Luz Martínez (UNSE)
Dra. Mónica Nazareno (UNSE)
Dra. Norma Samman (UNJU)
Dra. Carmen Inés Viturro (UNJU)
Dra. María Julia Barrionuevo (UNT)
Dra. Marisa Selva Garro (UNT e Institutos de CONICET)

TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

Producción de compuestos de interés biotecnológico por bacterias lácticas aisladas del medio marino patagónico: aplicaciones en la seguridad microbiológica de alimentos

TESISTA

Lic. Gómez, Johana Stefani

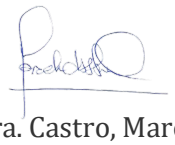
DIRECTORA

Dra. Gianni de Carvalho, Kátia

CODIRECTOR

Dr. Bellomio, Augusto

COMISION DE SUPERVISION:



Dra. Castro, Marcela

Dra. Saavedra, Lucila

Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en:

LABORATORIO DE TECNOLOGÍADE LOS ALIMENTOS

Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos

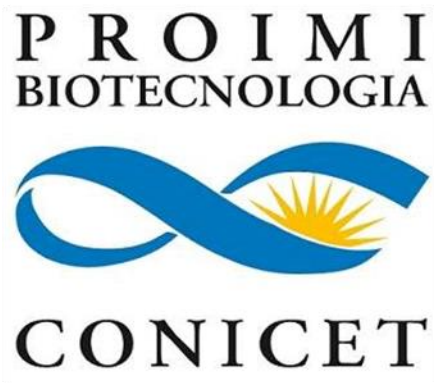
(PROIMI - CONICET)

Y

LABORATORIODE BACTERIOCINAS

Instituto Superior de Investigaciones Biológicas

(INSIBIO-CONICET)



Con el apoyo financiero de:

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y los siguientes proyectos: PIP: "Producción de péptidos bioactivos por bacterias lácticas: Contribución de la proteómica y peptidómica a las propiedades tecnológicas y funcionales de alimentos lácteos fermentados"; Proyecto de Cooperación Internacional CAPES-CONICET-MINCYT 2014: "Caracterización de biosurfactantes producidos por actinobactérias regionales y su potencial aplicación en tecnologías de remediación ambiental"; PICT: "Selección y optimización del empleo de aditivos naturales para mejorar la calidad de alimentos de alta humedad"; PICT: "Desarrollo de nuevas bacteriocinas híbridas de amplio espectro para ser usadas en la biopreservación de alimentos"; PIP: "Nuevas estrategias para el control de la salmonelosis en Argentina: diseño y evaluación de péptidos antimicrobianos como bioconservantes y su aplicación en la obtención de vacunas atenuadas"; PIUNT: "Bacteriocinas híbridas de amplio espectro para el control de enfermedades bacterianas transmitidas por alimentos del Noroeste Argentino".

A mi hijo Samuel, mi amor eterno

A mi Abu, mi ángel de la guarda

Agradecimientos

A Dios y al Sagrado Corazón de Jesús por darme las fuerzas, salud, paciencia y sabiduría necesarias para alcanzar esta meta personal.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca y proyectos otorgados que me permitieron realizar este trabajo.

A las Autoridades de PROIMI e INSIBIO, por permitirme realizar mi Tesis Doctoral en dichos lugares.

A mi directora de Tesis Dra. Kátia Gianni de Carvalho, por su compromiso durante la dirección de este trabajo, por su confianza, por ser un ejemplo de investigadora y sobre todo de persona.

A mi director asociado Dr. Augusto Bellomio, por su participación, confianza y preocupación para que pueda alcanzar mi meta.

A los miembros de mi Comisión de Supervisión, las Dras. Marcela Castro y Lucila Saavedra, por brindarme con generosidad sus conocimientos, experiencias, acertadas críticas y principalmente su tiempo.

A la Ingeniera Nora Perotti, a las Dras. Cintia Romero, Verónica Colin y Rosangela Itri, por haber confiado en mí y en mi trabajo.

A todos los profesionales de PROIMI e INSIBIO, por su colaboración en el ámbito profesional y humano.

A mis compañeros de laboratorio Clau, Pao, Flor, Horacio, Johan, Andrés, Enzo y Pablo, por aconsejarme con sus experiencias y por haber estado dispuestos a darme una mano en lo que necesitaba. Muchas gracias por su amistad.

A mi mamá, por no dejarme cambiar de carrera cuando tenía dudas sobre mi futuro, por haber sido mi sostén para continuar y sobre todo por

enseñarme que las metas se consiguen haciendo nuestro mayor esfuerzo por lograrlas.

A mi papá, por enseñarme a no perder la fe y que la distancia no es sinónimo de ausencia, por su ayuda incondicional. Gracias por ser uno de mis mayores pilares y sostenerme cuando pensaba que no podía seguir.

A mis hermanas Jannette y Erika, a mis sobrinos IC y Renata, sin ustedes mi vida estaría incompleta, gracias por su apoyo y amor infinitos.

A mi hijo Samuel, por llenar mis días de risas, gritos, bailes y juegos. Sos el amor de mi vida y esta Tesis es por y para Vos.

A la memoria de mi Abu, porque siempre estuviste presente, aportando tu granito de arena y aunque hoy no estés físicamente, sé que desde el cielo seguís velando por nosotros.

A José, por tu infinita paciencia y apoyo incondicional en esta etapa tan importante, por ser mi compañero y mucho más.

A mi tía Gra, a mi madrina y a mis familiares, por el apoyo y cariño recibidos a diario, somos una familia excepcional.

A mis amigas, las de siempre, que estuvieron en las buenas y en las malas, que me vieron llorar y reír, gracias por las infinitas charlas y el ánimo para seguir.

A todos y a cada uno, que colaboraron de alguna manera para la finalización de esta Tesis, simplemente MUCHAS GRACIAS.

Índice

Resumen 4

Abstract 6

Abreviaturas y Siglas 8

Introducción General 10

Enfermedades trasmitidas por alimentos 11

Listeria 16

Listeriosis 19

Conservación de alimentos 22

Métodos de conservación 25

Biopreservación 26

Bacterias Lácticas (BL) 28

Metabolismo 30

Enterococcus 35

Presencia de *Enterococcus* en alimentos 39

Bacteriocinas 41

Bioemulsionantes 51

Objetivos 57

Objetivo General 58

Objetivos Específicos 58

Capítulo I 59

1.1 Introducción 60

1.2. Materiales y Métodos 61

1.2.1. Selección de BL productoras de compuestos de interés biotecnológico 61

1.2.2. Determinación del principio activo causante de la actividad inhibitoria y caracterización de la actividad. Detección de ácidos orgánicos y proteínas de alto peso molecular 62

1.2.3. Evaluación de las propiedades tecnológicas*in vitro* de las cepas de *Enterococcus* seleccionadas 63

1.3. Resultados y Discusión 65

1.3.1. Selección de BL productoras de compuestos de interés biotecnológico 65

1.3.2. Determinación del principio activo causante de la actividad antimicrobiana 65

1.3.3. Evaluación de las propiedades tecnológicas *in vitro* de las cepas de *Enterococcus* seleccionadas 66

1.4. Conclusiones Parciales 73

Capítulo II 74

2.1. Introducción 75
2.2. Materiales y Métodos 76
2.2.1. Determinación del espectro antimicrobiano de las cepas de *Enterococcus* seleccionadas 76
2.2.2. Producción de bacteriocinas por *Enterococcus* en diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación 76
2.2.3. Evaluación de la producción de bioemulsionante por *E. mundtii* Tw278 empleando diferentes fuentes de carbono 78
2.2.4. Formulación de medios de producción con base de suero de leche 78
2.2.5. Evaluación del efecto del pH en la producción de bacteriocina y bioemulsionante 78
2.3. Resultados y Discusión 79
2.3.1. Determinación del espectro de inhibición de las cepas de *E. mundtii* 79
2.3.2. Producción de bacteriocinas en diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación 80
2.3.3. Evaluación de la producción de bioemulsionante por *E. mundtii* Tw278 empleando diferentes fuentes de carbono 84
2.3.4. Formulación de medios de producción con base de suero de leche 85
2.3.5 Evaluación del efecto del pH en la producción de bacteriocina y bioemulsionante 87
2.4. Conclusiones Parciales 88
Capítulo III 89
3.1. Introducción 90
3.2. Materiales y Métodos 90
3.2.1. Screening de genes estructurales de enterocina por PCR 90
3.2.2. Purificación y caracterización de bacteriocinas por HPLC y espectrometría de masa 91
3.2.3. Caracterización y propiedades del bioemulsionante producido por *E. mundtii* Tw278 93
1.2.4. Análisis de los datos 95
3.3. Resultados y Discusión 96
3.3.1. Screening de genes estructurales de enterocina por PCR 96
3.3.2. Purificación y caracterización de bacteriocinas por HPLC y espectrometría de masa 96
3.3.3. Caracterización y propiedades del bioemulsionante BE278 producido por *E. mundtii* Tw278 98
3.4. Conclusiones Parciales 108
Capítulo IV 109

4.1. Introducción 110
4.1.1. Carne y productos cárnicos 110
4.1.2. Yogur 111
4.2. Materiales y Métodos 114
4.2.1. Modelos Alimentarios 114
4.2.2. Análisis de los datos 117
4.3. Resultados y Discusión 117
4.3.1. Modelo PENG y Hamburguesas 118
4.3.2. Modelo de Yogur 122
4.4. Conclusiones Parciales 129
Conclusiones Finales 130
Proyecciones 132
Producción Científica 135
Bibliografía 137
Anexo 170

Resumen

La aparición y propagación de bacterias patógenas transmitidas por alimentos ha inducido el desarrollo de nuevas estrategias de control que incluyen la búsqueda de nuevos compuestos de probada eficacia. Sin embargo, existe una alta demanda de alimentos que contengan concentraciones mínimas o nulas de conservantes químicos. Por ello, ha ido en aumento la búsqueda de antimicrobianos naturales que puedan ser empleados para controlar o eliminar el desarrollo de dichos patógenos. Esta investigación se extiende además y es de gran importancia para su uso en zootecnia y veterinaria, ampliando el horizonte de aplicación a la sanidad animal.

El objetivo general fue estudiar la producción de compuestos de interés biotecnológico por bacterias lácticas (BL), y evaluar las cepas seleccionadas y sus bacteriocinas en diferentes modelos alimentarios para su biopreservación.

Se trabajó con 60 cepas provistas por la Facultad de Ciencias Naturales (UNP, Argentina), aisladas de medio marino proveniente de las provincias del Chubut y Santa Cruz. Se seleccionaron 4 cepas de *Enterococcus mundtii* denominadas Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807, activas contra cepas patógenas de *Listeria monocytogenes*. Se comprobó, mediante pruebas bioquímicas, que el o los principios activos producidos por las mismas son de naturaleza proteica, tipo bacteriocina. Además, las 4 cepas fueron capaces de resistir las condiciones simuladas de un tracto gastrointestinal *in vitro*.

La máxima producción de bacteriocinas se registró a una temperatura de incubación de 30 °C, empleando LAPTg. Se realizó una purificación parcial de la bacteriocina de *E. mundtii* Tw56, por la cual se obtuvo un pico de HPLC que presentaba actividad antilisteria y que será sujeto a futuras caracterizaciones para determinar su identidad.

Por otro lado, se constató que *E. mundtii* Tw278 produce un bioemulsionante (BE) con capacidad emulsionante de 60,97±0,95 % frente a aceite de girasol. Se pudo optimizar la producción del mismo, empleando como fuente de carbono de bajo costo, suero de leche. De los resultados obtenidos de su naturaleza química y análisis por IR, se trataría de una glicoproteína, con baja toxicidad frente a la línea celular Caco2 y sin causar la ruptura de las membranas de vesículas unilaminares gigantes. El BE produce una emulsión polidispersa de aceite en agua, con un tamaño promedio menor a 50 µm del diámetro de las partículas.

Por último, se evaluó la capacidad de estas 4 cepas, así como de sus metabolitos para la conservación de alimentos frente a *Listeria monocytogenes* Scott A a 4 °C por 15 días. De los resultados obtenidos, podemos concluir que las cepas *E. mundtii* Tw56, Tw802 y Tw807, así como sus extractos antilisteria fueron capaces de disminuir la población de

Listeria, hasta no ser detectada, en los modelos alimentarios PENG y de carne, emulando hamburguesas.

Por otro lado, se constató que la cepa *E. mundtii*Tw278, así como su extracto antilisteria, fueron capaces de controlar y disminuir hasta valores no detectables la población de *L. monocytogenes* Scott A en un modelo de yogur, con una producción a 42 °C por 8 h y almacenamiento a 4 °C por 15 días. Cabe destacar, que tanto la presencia de la cepa bacteriocinogénica como la de su extracto, no alteraron las propiedades fisicoquímicas inherentes al yogur.

Palabras clave: *Enterococcus mundtii*; Bacteriocinas; Bioemulsionante

Abstract

The appearance and spread of pathogenic bacteria strains transmitted by food has led to the development of new control strategies that include the search for new compounds of proven efficacy. However, there is a high demand for foods that contain minimal or no concentrations of chemical preservatives. Therefore, the search for natural antimicrobials that can be used to control or eliminate the development of these pathogens has been increasing. This research also extends and is of great importance for its use in zootechnics and veterinary science, broadening the horizon of application to animal health.

The general objective was to study the production of compounds of biotechnological interest by lactic acid bacteria (BL), and to evaluate the selected strains and their bacteriocins in different food models for their biopreservation.

Worked with 60 strains provided by the Faculty of Natural Sciences (UNP, Argentina), isolated from the marine environment from the provinces of Chubut and Santa Cruz. Four strains of *Enterococcus mundtii* called Tw56, Tw278, Tw802 and Tw807, active against pathogenic strains of *Listeria monocytogenes*, were selected. It was verified, through biochemical tests, that the active principles produced by them are of a protein nature, bacteriocin type. Furthermore, all 4 strains were able to withstand the simulated conditions of a gastrointestinal tract in vitro.

The maximum production of bacteriocins occurred at an incubation temperature of 30 °C, using LAPTg. A partial purification of the *E. mundtii* Tw56 bacteriocin was carried out, by which an HPLC peak was obtained that presented antilisteria activity and that will be subject to future characterizations to determine its identity.

On the other hand, it was found that *E. mundtii* Tw278 produces a bioemulsifier (BE) with an emulsifying capacity of 60.97±0.95% compared to sunflower oil. It was possible to optimize its production, using milk whey as a low-cost carbon source. From the results obtained from its chemical nature and IR analysis, it would be a glycoprotein, with low toxicity against the Caco2 cell line and without causing the rupture of the membranes of giant unilamellar vesicles. The BE produces a polydisperse emulsion of oil in water, with an average size of less than 50 µm of the diameter of the particles.

Finally, the ability of these 4 strains as well as their metabolites for food preservation against *Listeria monocytogenes* Scott A at 4 °C for 15 days was evaluated. From the results obtained, we can conclude that the *E. mundtii* Tw56, Tw802 and Tw807 strains, as well as their antilisteria extracts, were able to reduce the population of *Listeria*, until it was not detected, in the PENG and meat food models, emulating hamburgers.

On the other hand, it was found that the *E. mundtii* Tw278 strain, as well as its antilisteria extract, were able to control and reduce the population of L. monocytogenes

Scott A to undetectable values in a yogurt model, with production at 42 °C for 8 h and storage at 4 °C for 15 days. It should be noted that both the presence of the bacteriocinogenic strain and its extract did not alter the physicochemical properties inherent in yogurt.

Keywords:*Enterococcus mundtii*; Bacteriocins; Bioemulsifier

Abreviaturas y Siglas

ADN: ácido dexoxiribonucleico.

ALC: alimentos listos para consumir.

ARN: ácido ribonucleico.

a_w: actividad de agua.

BHI: infusión de cerebro y corazón.

BE: bioemulsionante.

BL: bacterias lácticas.

BPM: buenas prácticas de manufactura.

BS: biosurfactante.

C: citosina.

CA: control de agua.

CAA: Código Alimentario Argentino.

CDC: Centros para el control y prevención de enfermedades.

CO_2: dióxido de carbono.

CV: control de viabilidad.

EFSA: European Food Safety Authority.

EPA: Environmental Protection Agency.

ETAs: Enfermedades transmitidas por alimentos.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FDA: Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU.

FSIS: Food Safety and Inspection Service.

G: guanina.

GRAS: Generalmente reconocidos como seguros.

GUV: vesículas unilaminares gigantes.

HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Points.

H_2O_2: peróxido de hidrógeno.

HHP: Alta presión hidrostática.

HTST: High Temperature Short Time.

LB: medio Luria.

MEE: electroforesis enzimática multilocus.

MM: masa molecular.

MS: espectrometría de masa.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panameracana de Salud.

PG: galato de propilo.

PHE: Public Health England.

RHL: ramnolípidos.

RTE: ready to eat.

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

SL: suero de leche.

SNC: sistema nervioso central.

TBHQ: terc-butilhioroquinona.

TFA: ácido trifluoroacético.

USDA: United States Department of Agriculture.

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

Introducción General

Enfermedades trasmitidas por alimentos

Los alimentos contaminados constituyen una de las principales causas de morbilidad en diversos países y, en ciertas ocasiones pueden generar las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) con serias consecuencias para la salud humana (Centros para el control y prevención de enfermedades (CDC), 2021a). La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014) define a las ETAs como "el conjunto de síntomas originados por la ingestión de alimentos que contengan agentes biológicos (por ejemplo bacterias o parásitos) o no biológicos (por ejemplo plaguicidas o metales pesados) en cantidades tales que afecten a la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupo de personas". Estas enfermedades se caracterizan por una variedad de síntomas, que van de leves a muy graves, y dependen del microorganismo y/o toxina causante. Los más comunes son: malestar estomacal, cólicos estomacales, náuseas, vómitos, diarrea y fiebre (CDC, 2021b); en algunos casos se pueden presentar complicaciones severas, como sepsis, meningitis, abortos, síndrome de Reiter, síndrome de Guillan Barré, artritis crónica, daños al cerebro y los nervios, insuficiencia renal o la muerte (Linscott, 2011; Steniner, 2013; CDC, 2021b).

Las ETAs se clasifican en (Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria (ASSAL), 2017):

I. Infecciones Alimentarias, resultan de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos perjudiciales vivos.

II. Intoxicaciones Alimentarias, ocurren cuando las toxinas o venenos de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido. Estas toxinas generalmente no poseen olor o sabor y son capaces de causar enfermedades después que el microorganismo es eliminado o se encuentra incapacitado para provocar infección. Algunas toxinas pueden estar presentes de manera natural en el alimento, como es el caso de ciertos hongos y animales como el pez globo.

III.Toxo-infecciones Alimentarias, resulta de la ingestión de alimentos con una cierta cantidad de microorganismos causantes de infecciones, capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos e infectan.

Las ETAs son multicausales, y para que sucedan deben coexistir diferentes factores (Fig. I.1) (ASSAL, 2017):

- Debe haber una fuente de contaminación.
- Debe haber un vector que traslade el agente.
- Que lleve un alimento vulnerable y tener condiciones de temperatura y tiempo, para producir la dosis infectiva (depende de la virulencia del microorganismo y las unidades con poder patógeno ingeridas) o la toxina.

➢ Y debe consumirlo una persona susceptible, que depende del estado nutricional, edad, sistema inmunológico y acidez estomacal.

Figura I.1 Multicausalidad de las ETAs

Los centros para el control y prevención de enfermedades estiman que todos los años 48 millones de personas contraen una ETA (lo que equivale a la enfermedad en 1 de cada 6 personas cada año), 128.000 personas son hospitalizadas y 3.000 de esas personas mueren (CDC, 2021a).De acuerdo con la OMS, las ETAs constituyen uno de los problemas sanitarios más comunes que aquejan la salud de las personas en el mundo, y afectan con mayor severidad a niños, mujeres embarazadas, ancianos y personas con otros padecimientos; sin embargo, estas enfermedades no solo afectan la salud, sino que tienen un impacto socioeconómico negativo, debido a que ocasionan una disminución en la productividad y el comercio e imponen una carga sustancial en los sistemas de salud al generar gastos en hospitalizaciones y medicamentos (Sharif y col., 2018; OMS, 2020) (Tabla I.1).

Tabla I.1 Evaluación de pérdidas económicas y el impacto en la Salud Pública de las principales combinaciones patógeno-alimento (Adaptada de Batz y col., 2011).

Ranking	Combinación patógeno-alimento	Costo enfermedad[a]	N° de enfermos	N° de hospitalizaciones	N° de muertes
1	*Campylobacter* – aves de corral	1.257	608.231	6.091	55
2	*Toxoplasma* – cereales	1.299	35.537	1.815	134
3	*Listeria* – fiambres	1.086	651	595	104
4	*Salmonella* – aves de corral	712	221.045	4.159	81
5	*Listeria* – lácteos	724	434	397	70
6	*Salmonella* - procesados[b]	630	195.655	3.682	72
7	*Norovirus* - procesados[b]	914	2.494.222	6.696	68
8	*Salmonella* – producción	548	170.264	3.204	63
9	*Taxoplasma* – carne	689	20.086	1.026	76
10	*Salmonellla* – huevos	370	115.003	2.164	42

[a]U$ Millones
[b]comidas complejas procesadas (sin carne y compuestos de múltiples ingredientes)

Existen muchos géneros de bacterias patógenas que pueden causar ETAs. Entre las bacterias Gram-negativas, pueden destacarse los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Brucella*, *Yersinia* y *Vibrio*, mientras que las bacterias Gram-

positivas más importantes son *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, entre otras. Diferentes serotipos de *Salmonella* entérica y *Listeria monocytogenes* son responsables de más del 50 % de las muertes causadas por infecciones graves (Ray y Bhunia, 2007). En los últimos años, han emergido otras bacterias Gram-negativas, como *E. coli* entero hemorrágica (Erickson y Doyle, 2007), que produce hemorragia intestinal. Esto condujo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y a la OMS a tener en cuenta que este problema requiere de atención urgente.

Uno de los principales problemas que presenta el control de las ETAs es la falta de registro. Está estimado que en los países industrializados sólo se informa el 10% de los casos, mientras que en los países en vías de desarrollo la relación entre los casos ocurridos y aquellos informados es del 1%. Esta falta de registros puede atribuirse a varios factores, como la incapacidad para establecer la asociación entre un caso de diarrea y el consumo de alimentos contaminados; la falta de intervención de los servicios de salud para estudiar y notificar todos los brotes de ETAs; la carencia de laboratorios clínicos y de análisis de alimentos y personal profesional capacitado para la investigación de las ETAs, el desconocimiento de la naturaleza y los mecanismos de producción de las ETAs.

Las estadísticas elaboradas por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos indican que en Argentina el 40% de los brotes de ETAs ocurren por una incorrecta manipulación de los alimentos (OPS/OMS, 2014).

Una estrategia general de prevención de las ETAs se basa en la comprensión de los mecanismos por los cuales los agentes patógenos involucrados son transmitidos y en las formas de prevención de dicha contaminación. La contaminación puede ocurrir durante el cultivo, la cosecha, la preparación, el almacenamiento, el procesamiento y la distribución. El suelo, las técnicas de manipulación, la preparación de los alimentos, las condiciones de conservación y almacenamiento son las diferentes fuentes de la misma (Sharif y col., 2018; Gallo y col., 2020).

Varios avances fueron alcanzados en esta área, como por ejemplo la purificación del aguade consumo y la utilizada en el ambiente industrial, permitiendo el control de varias enfermedades (Tauxe, 1997). Otro mecanismo fundamental para el control de estas enfermedades consiste en la prevención del consumo de alimentos potencialmente contaminados con agentes patógenos, especialmente aquellos que son consumidos crudos. Alimentos de origen animal, como la leche y la carne, son naturalmente susceptibles a la contaminación por agentes causantes de ETAs provenientes de los animales productores, portadores de agentes zoonóticos.

Los métodos tradicionales de conservación de alimentos utilizados involucran procesos como el calor o cocción, el frío, la reducción de la disponibilidad de agua y la fermentación. Los conservantes químicos son una de las herramientas para evitar el deterioro de los alimentos y para aumentar su vida útil. Las sustancias químicas antimicrobianas tienen la capacidad de detener el crecimiento celular o de eliminar los microorganismos. Entre los antimicrobianos tradicionales utilizados se pueden mencionar: cloruro de sodio (la sal), nitritos, sulfitos, ácido acético y ácido benzoico.

Los conservantes son necesarios y útiles para prolongar la vida útil al evitar que los alimentos se deterioren o echen a perder, además, para que los fabricantes eviten el deterioro durante el transporte y almacenamiento de alimentos. Sin embargo, estos agentes químicos también pueden tener algunos efectos nocivos. Los nitratos y nitritos se usan comúnmente en productos cárnicos, como perros calientes, salchichas, pescado ahumado, jamón y carne en conserva para prevenir la oxidación y el crecimiento de bacterias. La ingesta de nitratos puede tener un alto riesgo de cáncer, como tumores cerebrales, leucemia y tumores nasofaríngeos. También existe un mayor riesgo de diarrea e infecciones de las vías respiratorias en los niños (Sharif y col., 2018). El consumo de dosis elevada de nitratos puede provocar dolor en la región abdominal, heces con sangre, desmayos y debilidad muscular.

Los sulfitos son útiles para prevenir la decoloración de los alimentos y se encuentran principalmente en el vino, las frutas secas, las papas procesadas y los camarones. Estos poseen efectos adversos para la salud además de la destrucción de la tiamina. Estos antimicrobianos también provocan urticaria, irritaciones de la piel, hipotensión, dolor abdominal, sofocos, diarrea y respiración asmática (Sharif y col., 2018). Sin embargo, la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. (FDA) clasifica los sulfitos y los compuestos que producen azufre en la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe).

El benzoato de sodio es útil para prevenir el crecimiento de bacterias en los alimentos. Sin embargo, el consumo de dichos alimentos puede provocar asma, urticaria y reacciones alérgicas. Este conservante en grandes dosis puede dañar el bazo, el hígado, el corazón, los riñones, las glándulas suprarrenales y el cerebro, como se informó en numerosos estudios con animales. El galato de propilo (PG) y la terc-butilhidroquinona (TBHQ) se encuentran principalmente en aceites vegetales, alimentos procesados y productos cárnicos. Estos se utilizan en aceites comestibles o productos afines para evitar la rancidez. Sin embargo, se ha documentado riesgos de cáncer incluso con dosis bajas de PG y TBHQ (McCurdy y col., 2009; Sharif y col., 2018).

A pesar de haber sido utilizados desde hace mucho tiempo, el uso continuo de los agentes antimicrobianos lleva a la selección de microorganismos con altos niveles de tolerancia y resistencia a los mismos. Asimismo, se ha demostrado una adaptación a la supervivencia de estas especies en alimentos ácidos, siendo también un componente importante de su patogenicidad. Esta adaptación puede ocurrir después de la exposición a ácidos orgánicos débiles tales como el ácido benzoico o el ácido fenil acético a valores de pH cercanos a la neutralidad, por ejemplo, en el rumen o heces (Leyer y col., 1995). El desarrollo de nuevos antimicrobianos, el uso de tecnología de obstáculos múltiples y un cambio en el uso de conservantes son alternativas propuestas para contrarrestar el problema (Bower y Daeschel, 1999; Harrison y Davidson, 2002).

Las medidas de seguridad y control en las granjas y sitios de producción de materias primas, han ido mejorando sistemáticamente para disminuir la carga de microorganismos patógenos antes de que el material llegue a su sitio de procesamiento (Oliver y col., 2009). Además, las medidas de higiene y control microbiológico en las plantas de producción son cada vez más estrictas (Lianou y Sofos, 2007). El desarrollo de nuevos materiales, de tecnologías de elaboración de alimentos y de técnicas de control microbiológico, hace que sea posible tener menos casos de intoxicaciones producidas por alimentos cada año, especialmente en los países desarrollados (D'Urso y col., 2009; O'Grady y col., 2009).

La bioconservación es un método que busca disminuir la carga microbiana no deseada de un producto, por medio del uso compuestos antimicrobianos o microorganismos con capacidad antimicrobiana y de esta manera permite prolongar la vida útil del producto. Entre los principales microorganismos usados en la bioconservación, se encuentran las bacterias lácticas (BL), las cuales producen una serie de metabolitos antagónicos o que inhiben el crecimiento de otras bacterias, entre ellas patógenos como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enteritidis* y *E. coli*, cuya transmisión se da principalmente a través de alimentos contaminados (Rodríguez, 2013). El efecto antagónico entre microorganismos se conoce desde el siglo XIX en los inicios de la microbiología, y se ha vinculado a la actividad metabólica de las BL (Stiles, 1996). Este antagonismo se refiere a la inhibición a través de la competencia por los nutrientes y/o a la producción de uno o más metabolitos con actividad antimicrobiana (Rodríguez, 2013), por la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el ácido láctico, ácido cítrico, bacteriocinas, entre otros (Fernández y col., 2014).

A través de la bioconservación, el producto podría ser etiquetado con las expresiones "libre de" o "sin", en los casos en los que se pueda sustituir por completo los

conservantes químicos habitualmente usados. De acuerdo a los metabolitos producidos por las BL, la bioconservación se divide en dos tipos: la bioconservación con bacteriocinas y la bioconservación con cepas no productoras de bacteriocinas.

Adicionalmente en algunos casos, la utilización de BAL en alimentos representa una mejora en sus propiedades nutricionales o funcionales, como es el caso de los productos probióticos. En cualquier caso, es deseable que un cultivo protector cumpla con algunos de los siguientes requisitos (Holzapfel y col., 1995):

- No debe ser patógeno.
- No producir sustancias que pudieran representar un problema para la salud, como aminas biógenas y toxinas.
- Poseer capacidad de adaptación al producto, de manera que pueda proveer una actividad protectora consistente, una actividad metabólica predecible y una actividad enzimática específica para un alimento determinado (ejemplo: nitrato reductasa o catalasa en la carne).
- Ser competitivos frente a microorganismos habituales del alimento.
- No ser productores de sustancias sensorialmente indeseables.
- Funcionar como indicador en condiciones de abuso.

Listeria

Listeria spp. son pequeños bacilos Gram-positivos, no formadores de esporas, no encapsulados, generalmente móviles a bajas temperaturas (20 °C), aunque algunas cepas de Listeria son inmóviles a 37 °C debido a la falta de expresión de flagelina a esta temperatura (Way y col., 2004). Su ADN se caracteriza por un bajo contenido de G+C (36–42%). Están relacionados con *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* (Khelef y col., 2006). Sobre la base de la hibridación de ADN, la electroforesis enzimática multilocus (MEE), los patrones de restricción de genes de ARNr y la secuenciación de ARNr 16S, el género *Listeria* comprende seis especies y dos subespecies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*.

L. monocytogenes es un patógeno humano y animal, y *L. ivanovii* es patógena para animales, principalmente ovinos y bovinos. En raras ocasiones, se demostró que *L. ivanovii* y *L. seeligeri* estaban asociadas con infecciones humanas (Khelef y col., 2006).

Los rumiantes domésticos probablemente juegan un gran papel en el mantenimiento de *Listeria* spp. en el medio rural, mientras 2-10% de las personas son portadoras de *L. monocytogenes* en heces sin, aparentemente, efectos adversos en su salud.

L. monocytogenes puede convertirse en endémico en las plantas de procesado de alimentos. (Jay y col., 2005).

Los alimentos se pueden contaminar en cualquier momento de la cadena productiva, así como también en el almacenamiento en frío. La tolerancia a altas concentraciones salinas y bajos pHs y la capacidad de multiplicarse a temperaturas de refrigeración, convierten a *L. monocytogenes* en un serio peligro para la seguridad alimentaria y por lo tanto para la salud pública (Buchanan y col., 2017).

Listeria sp. se encuentran en una amplia variedad de reservorios que van desde el suelo, las plantas en descomposición, el agua, la leche del ganado y los alimentos hasta numerosas especies animales y humanos, además puede colonizar las plantas de procesamiento de alimentos, persistiendo durante varios meses y años (Martín y col., 2014; Ortiz y col., 2014). Este microorganismo posiblemente ingresa en las plantas industriales por medio de la tierra existente en los zapatos y en la vestimenta de los obreros, en el equipo de transporte de los alimentos crudos de origen animal y por medio de portadores humanos sanos. La formación de biopelículas protege a esta bacteria contra la desinfección y favorece su supervivencia en las superficies que están en contacto con los alimentos; lo cual aumenta la contaminación cruzada de estos y los convierte en un vehículo para llegar al hombre y causar la enfermedad (Pan y col., 2006; Rodríguez y col., 2007).

Esta frecuentemente presente en alimentos crudos tanto de origen vegetal y animal, y se puede encontrar en alimentos cocinados debido a la contaminación post procesamiento. Se ha aislado de leche pasteurizada, queso, helados, verduras crudas, carnes fermentadas y embutidos cocidos y crudos, entre otros (Álvarez Ordóñez y col. 2015).

Listeria presenta 16 serovares, que se basan en la expresión de antígenos somáticos (O) y flagelares (H), con 13 serovares de *L. monocytogenes* que pueden causar enfermedad. Aproximadamente el 95% de los aislados humanos pertenecen a los serovares 4b, 1/2a y 1/2b. Sorprendentemente, los serovares 4b se encuentran en la mayoría de los brotes invasivos transmitidos por los alimentos en todo el mundo y en hasta el 50 % de los casos esporádicos de Listeriosis, mientras que los serogrupos 1/2 (incluidos 1/2a, 1/2b y 1/2c) se asocian principalmente con casos esporádicos (Khelef y col., 2006).

Listeria sp. son bacterias anaerobias facultativas, una propiedad que podría ser ventajosa durante la infección. Crecen perfectamente bien en condiciones aeróbicas de laboratorio. Aunque el medio de cultivo BHI (infusión de cerebro y corazón) es el medio de elección para el crecimiento *in vitro*, *Listeria* puede crecer en varios otros medios, como el

medio líquido Luria (LB). Una de las propiedades clave de *L. monocytogenes* reside en su capacidad para crecer en un amplio rango de temperaturas (1–45 °C), lo que favorece la resistencia y el enriquecimiento de los alimentos (OMS, 2004). Sin embargo, el crecimiento óptimo ocurre entre 30 y 37 °C. Este microorganismo muere a 60°C, lo que hace que la pasteurización sea una buena técnica para su eliminación en los productos lácteos (Khelef y col., 2006).

La actividad de agua (a_w) óptima para su crecimiento es próxima a 0,97, sin embargo, este microorganismo tiene la capacidad de multiplicarse en una a_w considerada baja para la multiplicación de patógenos (0,92). La dosis infectiva es desconocida y puede variar conforme a la cepa y a la susceptibilidad de la víctima. En casos contraídos a través de la leche pasteurizada o cruda se afirma que, en personas susceptibles, menos de 1.000 UFC/mL pueden causar la enfermedad.

El análisis de *L. monocytogenes* cultivadas a diferentes temperaturas y de mutantes sensibles al frío reveló que la adaptación a la temperatura implica modificaciones en la composición de ácidos grasos de la membrana bacteriana (Khelefy col., 2006). *Listeria* también resistir condiciones de sal y pH relativamente extremas (pH 5,5–9 y 10 % de NaCl), pero el crecimiento óptimo se produce a pH neutro y 0,5 % de NaCl (Khelefy col., 2006). La sorprendente resistencia de *Listeria* sp. a las duras condiciones externas (OMS, 2004) explica su amplia distribución en múltiples hábitats y explica el número creciente de brotes de origen alimentario en los países industrializados.

Las cepas virulentas de *Listeria* son resistentes a la bilis (hasta un 40%) en placas de medio BHI sólido. Esto se debe en parte a la expresión de una hidrolasa para sales biliares, codificada por el gen *bsh* (Dussurget y col., 2002) y otros genes de tolerancia biliar codificados por el locus *btlA* (Begley y col., 2003). Los desinfectantes son activos sobre *Listeria*, lo que permite un tratamiento eficiente de las superficies en contacto con los alimentos, pero el suero y la leche interfieren con la actividad bactericida de los mismos, lo que enfatiza la atención que se presta a la higiene en las plantas de procesamiento de alimentos (Khelefy col., 2006).

Si bien la sensibilidad a los antibióticos puede variar entre las cepas, la mayoría de las especies del género *Listeria* son sensibles a muchos antibióticos, como los aminoglucósidos, las tetraciclinas, los macrólidos, el cloranfenicol y las penicilinas. Algunos de ellos se usan para tratar la Listeriosis, por ejemplo, generalmente ampicilina en combinación con un aminoglucósido (Charpentier y col., 1995; Hof y col., 1997; Troxler y col., 2000). Las cepas de *Listeria* son naturalmente resistentes a los antibióticos como las cefalosporinas o las sulfonamidas. La mayoría de los medios de enriquecimiento contienen el antibiótico ácido nalidíxico debido a la resistencia de *L. monocytogenes* y así lograr

enriquecer muestras que lo contengan. Aunque su resistencia a los antibióticos aún no es una preocupación en la clínica médica, recientemente han surgido nuevas cepas resistentes a tetraciclina o trimetoprima (Poyart-Salmeron y col., 1990; 1992; Charpentier y col., 1995; Charpentier y Courvalin, 1999).

L. monocytogenes se aisló en humanos ya en la década de 1920 (Murray y col., 1926; Pirie, 1927). Sin embargo, no se identificó como una causa importante de infección neonatal hasta después de la Segunda Guerra Mundial en Alemania (Potel, 1952). El desarrollo y uso de agentes inmunosupresores en la segunda mitad del siglo XX condujo a la identificación de casos de Listeriosis en pacientes inmunocomprometidos (Louria y col., 1967). Posteriormente, el desarrollo de terapias altamente inmunosupresoras para trasplantes de órganos o médula ósea condujo a una gran expansión de la población inmunodeprimida y la posterior identificación de la inmunosupresión como un factor de riesgo importante para la Listeriosis (Stamm y col., 1982). Más recientemente, la epidemia del VIH ha aumentado notablemente la población inmunodeficiente, con un riesgo relativo de desarrollar Listeriosis 500 veces mayor en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en comparación con la población general (Jurado y col., 1993).

En 2014, *L. monocytogenes* infectó en todo el mundo a unas 23.150 personas, de las cuales murieron 5.463, según lo referenciado por Noordhout y col. En países desarrollados, *Listeria* es el tercer patógeno transmitido por alimentos que más costos genera a los sistemas de salud.

Listeriosis

La Listeriosis se describió por primera vez a fines de la década de 1920 y se propuso que se contraía a través de la contaminación oral y esta hipótesis se confirmó en la década de 1960. Una serie de brotes en países industrializados durante las décadas de 1970 y 1980 establecieron definitivamente que *L. monocytogenes* era de hecho responsable de la Listeriosis transmitida por los alimentos (Sánchez Hernández, 2016).

La primera cepa oficial del patógeno humano *L. monocytogenes* se aisló en 1924 después de un brote en una guardería de animales entre conejos y cobayos que presentaban mononucleosis grave (Murray y col., 1926). Un aislado clínico de *L. monocytogenes* de un caso de meningitis humana fue depositado en el Instituto Pasteur en 1921 (Dumont y Cotoni, 1921). La primera cepa del patógeno animal, *L. ivanovii*, se identificó en la década de 1960 en corderos con Listeriosis congénita (Ivanov, 1962).

La comunicación de brotes epidémicos de Listeriosis humana a partir de los años 80 y su asociación con el consumo de alimentos contaminados, ha sido una gran

preocupación de las autoridades sanitarias y ha tenido un fuerte impacto económico en la industria alimentaria. A partir de 1983 una serie de brotes epidémicos humanos en Norteamérica y Europa establecieron claramente a la Listeriosis como una grave ETA. Los alimentos más frecuentemente asociados con brotes y con alto nivel de riesgo son los quesos y productos lácteos, patés y salchichas, pescados ahumados, ensaladas y en general productos industrializados, refrigerados, listos para el consumo, sin requerimientos de cocción o calentamiento previo (Buchanan y col., 2017).

Los brotes de infecciones por *Listeria* en los años 90 estuvieron vinculados principalmente a embutidos y salchichas. Ahora, los brotes de *Listeria* generalmente están vinculados a productos lácteos, frutas y verduras. Los investigadores han rastreado brotes recientes a quesos blandos, apio, germinados, melón y helado (CDC, 2017).

La Listeriosis es una enfermedad que suele aparecer en casos esporádicos y cuyo interés epidemiológico radica en la posibilidad de transmisión vertical humana y en brotes importantes de transmisión alimentaria. Se suele manifestar como un cuadro febril leve, pero puede causar meningoencefalitis, septicemia o ambos en neonatos y adultos y aborto en las mujeres embarazadas. La meningoencefalitis (inusual en la embarazada) puede comenzar de forma repentina o puede ser subaguda, particularmente en inmunodeprimidos y en ancianos (Pohl y col., 2017). En personas sin enfermedades de base puede producir cuadros de gastroenteritis febril, en embarazadas, que transmiten la infección al feto, los niños pueden nacer muertos, con septicemia o sufrir meningitis en el período neonatal, incluso aunque la madre sea asintomática. Los grupos de riesgo, potencialmente vulnerables a la Listeriosis incluyen: embarazadas, fetos, recién nacidos, pacientes inmunodeprimidos (incluyendo pacientes con VIH) y adultos mayores. Si bien, la transmisión alimentaria es la más frecuente, Listeriosis también ocurre como infección intrahospitalaria, sobre todo en maternidades y servicios de ginecología (McLauchlin y col., 2004). No obstante, se estima que entre el 2-10% de la población general actúa como portador sin ninguna consecuencia aparente en su salud (Buchanan y col., 2017).

La Listeriosis presenta un largo período de incubación (7-60 días), por lo cual, establecer la relación entre el caso clínico y el alimento consumido requiere de un sistema de vigilancia integrada. Adicionalmente, la dificultad para realizar estudios de brotes no permite establecer con precisión la relación dosis-respuesta para *L. monocytogenes* (Buchanan y col., 2017). No obstante, se estima que aún durante los brotes, la tasa de ataque suele ser baja, lo que implica que, si una población se expone a un alimento contaminado y no se registran casos, esto no significa necesariamente que la cepa actuante no es capaz de causar enfermedad (McLauchlin y col., 2004).

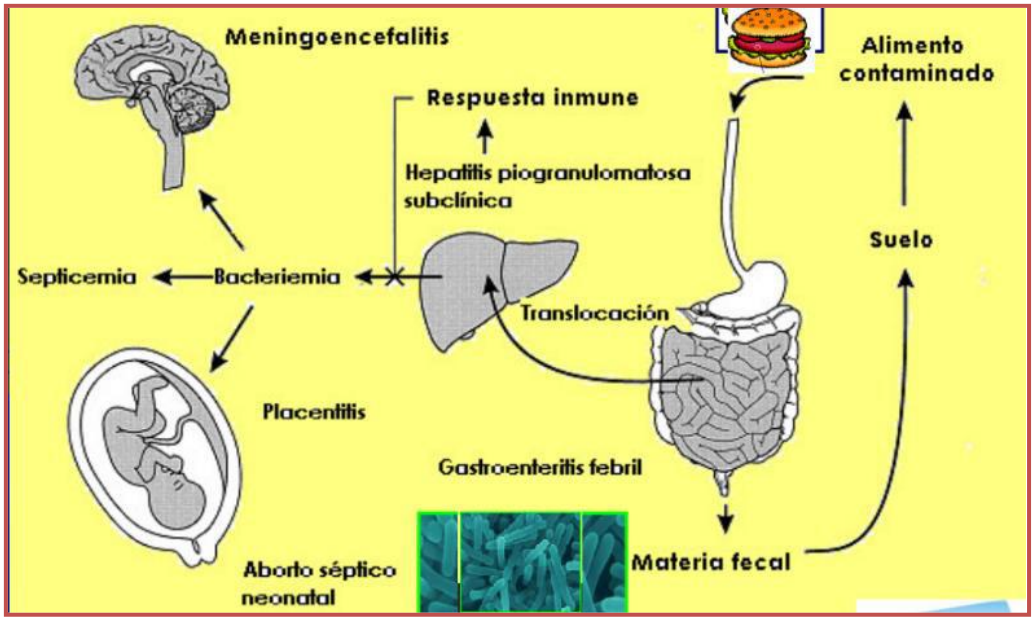
Los principales tipos de Listeriosis son la **invasiva** y la **no invasiva**. Las personas con sistemas inmunológicos fuertes desarrollan gastroenteritis febril de tipo no invasivo, presentando fiebre, diarrea, dolor de cabeza y dolores musculares, de manera similar a los otros microbios transmitidos por los alimentos, lo que resulta en una infección leve pero raramente diagnosticada (CDC, 2017). Mientras que, la forma invasiva es más grave y afecta a determinados grupos de alto riesgo (embarazadas, lactantes, ancianos y personas inmunocompremetidas). Entre sus síntomas se encuentran la fiebre, dolores musculares, septicemia y meningitis (Allerberger y Wagner, 2010). La mayoría de las personas con Listeriosis invasiva requiere atención hospitalaria y aproximadamente una de cada cinco muere por la enfermedad (CDC, 2017).

La Listeriosis produce septicemia, meningitis, encefalitis, infección cervical o intra-uterina en gestantes, pudiendo provocar aborto en el segundo o tercer trimestre de embarazo en el 20 % de los casos (CDC, 2017), como también un parto prematuro. Síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos y diarrea pueden preceder o acompañar las manifestaciones más graves de la enfermedad. En recién nacidos, la Listeriosis es grave y frecuentemente causa la muerte (alrededor del 3 % de los casos) (CDC, 2017), por septicemia, neumonía y meningitis. Los adultos no gestantes presentan septicemia, meningoencefalitis, siendo la meningitis y la bacteriemia los casos más relatados. Síntomas ligados al sistema nervioso central (SNC) incluyen, malestar y confusión mental. Otras manifestaciones de endocarditis y raras infecciones por las vías respiratorias (Slutsker y Schuchat, 1999). La tasa de letalidad en los recién nacidos es del 30%; en adultos (sin embarazo) es del 35%; en torno al 11% para personas con menos de 40 años y 63% para personas con más de 60 años. Cuando ocurre septicemia la tasa de letalidad es de 50% y la de meningitis puede llevar a una letalidad del 70%. Es considerada una enfermedad poco común. Sin embargo, el número de víctimas es similar al producido por *Salmonella* spp, (30 % de las infecciones mortales) (Ray y Bhunia, 2007).

La infección en humanos se produce principalmente por el consumo de alimentos contaminados (Figura I.2), como leche, quesos, verduras frescas, mariscos, productos cárnicos y alimentos listos para el consumo (Litlle y col., 2012; Beale y col., 2014; Chen y col., 2014). La bacteria puede atravesar la barrera intestinal y diseminarse desde los ganglios linfáticos mesentéricos hasta el bazo y el hígado, desde donde puede alcanzar el cerebro o la placenta, provocando meningitis o encefalitis en pacientes inmunocomprometidos, abortos en mujeres embarazadas o infecciones generalizadas en neonatos infectados (granulomatosis infantiseptica).

Se estima que 1.600 personas contraen la enfermedad cada año y que aproximadamente 260 mueren. Es más probable que la infección enferme a mujeres

embarazadas y sus recién nacidos, adultos de 65 años o mayores y personas con el sistema



inmunitario debilitado (CDC, 2017).

Figura I.2 Patogenicidad de *Listeria monocytogenes*

La mayoría de las infecciones humanas transmitidas por los alimentos están asociadas con una alta prevalencia, pero con una baja morbimortalidad. La situación es diferente para la Listeriosis humana, que es una infección poco frecuente pero muy grave, asociada con una mortalidad de hasta el 30%, incluso cuando se administra un tratamiento adecuado. Esto explica el alto impacto económico asociado con la Listeriosis a pesar de su prevalencia relativamente baja (Khelef y col., 2006). Además, la Listeriosis permanece infradiagnosticada, particularmente en sus etapas iniciales, y esto conduce a un retraso en la administración de la terapia antimicrobiana, que es absolutamente crítica para un resultado favorable, a diferencia de la mayoría de las demás infecciones transmitidas por los alimentos (Lorber, 1997; Wing y Gregory, 2002).

Conservación de alimentos

Para algunos, el descubrimiento del fuego en el Paleolítico es el inicio de la tecnología de alimentos; la cocción, además de facilitar el consumo de carne, extendía su vida útil y su disponibilidad. En el periodo Neolítico (6000-3000 a.C.), con el desarrollo de la agricultura, el humano alcanza un suministro más seguro y constante de alimentos y se convierte en sedentario (Dergal, 2019).

Existen diversos registros históricos y obras de arte que dan fe de las prácticas realizadas por las civilizaciones que se desarrollaron en Mesopotamia y en Egipto (3000 a.C.), donde se evidencia la crianza de ganado, la conservación de la carne y el pescado

usando sal; además de la producción de pan, vino, cerveza, aceite, vinagre y queso (Delgado y Ridaura, 2005; Dergal, 2019).

En resumen, desde el establecimiento de las primeras comunidades prehistóricas los humanos han aprovechado, inconscientemente en un principio, las actividades que desarrollaban los distintos microorganismos sobre los alimentos. Ha sido desde el siglo XX cuando se tomó conciencia de su importancia, tanto en el área del desarrollo como de conservación. El proceso que "descubrieron" se conoce hoy como fermentación y los ejemplos más conocidos son, sin duda, la producción de alcohol por acción de las levaduras a partir de carbohidratos y la de ácido a partir de los mismos sustratos por la actividad de las BL. Así, la conservación biotecnológica de los alimentos se ha originado a partir de la compresión científica del proceso de fermentación, una de las técnicas más antiguas de conservación (Holzapfel y col., 1995).

Aún hoy en día, los métodos de conservación de los alimentos que se han llevado a cabo durante miles de años tales como la salazón, desecación, o en su término más científico, deshidratación, fermentación y el encurtido siguen siendo operaciones que controlan las poblaciones microbianas en los alimentos. La necesidad de alimentos con calidad e inocuidad para los vuelos espaciales en la década de 1970 propició el desarrollo del sistema Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP, por sus siglas en inglés) o Análisis de Riesgos y de Puntos Críticos de Control, actualmente muy difundido en las empresas de alimentos del mundo. Este sistema de control, junto con el uso del método correcto de conservación, asegura la calidad e inocuidad de muchos de los alimentos disponibles en el mercado (Dergal, 2019).

La conservación de alimentos, en su contexto más amplio puede definirse como la aplicación de tecnologías encargadas de prolongar la vida útil y disponibilidad de los alimentos para el consumo humano y animal, protegiéndolos de microorganismos patógenos y otros agentes responsables de su deterioro. El objetivo es mantener, e incluso mejorar, sus características nutritivas, sensoriales e higiénicas, es decir, prevenir cualquier transformación que implique un menoscabo de la calidad -nutritiva, higiénica y sensorial del alimento, e intentar mantener su estado original durante su almacenamiento.

La composición de los alimentos es muy compleja y se basa en dos grandes grupos de sustancias: los macrocomponentes que se encuentran en alta concentración (98%) como el agua, las proteínas, los hidratos de carbono y las grasas, además de los microcomponentes (2%) como las vitaminas, los minerales y todos aquellos compuestos que confieren color, sabor y aroma (Dergal, 2019).

La calidad de los alimentos se encuentra afectada por factores físicos, químicos, bioquímicos, microbiológicos, cuyo control es esencial para la preservación de los mismos.

Los alimentos se deterioran por alguno de los siguientes tres mecanismos o por la combinación de ellos (Dergal, 2019):

I. Por contaminación y crecimiento microbiano masivo con bacterias, hongos y levaduras: ocurre en casi todos los alimentos, sobre todo en vegetales, carnes, lácteos y pescados frescos con alto contenido de agua.

II. Por enzimas endógenas o propias del alimento que favorecen reacciones como el oscurecimiento de diversos vegetales, la rancidez de grasas, aceites y el descoloramiento de varios pigmentos.

III. Por reacciones químicas catalizadas por el calentamiento, el oxígeno del aire, la luz (sobre todo la ultravioleta solar) por algunos metales como el hierro y el cobre que propician la reacción de oscurecimiento de Maillard, la oxidación de grasas y la degradación de pigmentos.

La principal causa de deterioro, de los alimentos, es el ataque por diferentes tipos de microorganismos (bacterias, levaduras, mohos y virus), cuyo problema tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo) (Matamoros, 2009).

La actividad bacteriana en el deterioro de los alimentos se refleja en dos vertientes (Dergal, 2019):

I. Afecta la calidad: Aquella que altera, echa a perder o pudre, pero no causa daño a la salud aun si se consumen dichos alimentos, es decir, no representa un problema de inocuidad. Este mecanismo es responsable de la pérdida de aproximadamente 30 % de los alimentos que se producen en el mundo debido a que genera olores, sabores, colores y texturas desagradables. Por ejemplo, los lactobacilos que contaminan y acidifican con ácido láctico la leche, las salsas y otros productos, cuyo sabor y olor pueden ser desagradables, pero no son tóxicos.

II. Afecta la inocuidad: Aquella que involucra bacterias patógenas cuyo crecimiento y desarrollo son responsables de ETAs. Esta contaminación es muy peligrosa ya que, por lo general, el agente dañino no echa a perder el alimento, y no se identifica de inmediato la cantidad ni la fecha de ingestión, por consecuencia, el tratamiento médico no siempre es acertado. Su efecto dañino se ha comprobado en muchas ocasiones. Las epidemias de tifoidea o de cólera en la Europa medieval arrasaban pueblos enteros. El caso dramático más reciente es el de Haití donde después del terremoto de 2010 fallecieron aproximadamente 4.600 personas por ingerir agua contaminada con *Vibrio cholera*.

Métodos de conservación

Existe una amplia variedad de métodos para aumentar la vida útil y seguridad de un alimento. Sin embargo, el mejor método es la prevención de la contaminación; aunque, esto no siempre es posible y el uso de técnicas que reduzcan y/o eliminen patógenos y microorganismos alterantes es de suma importancia (Corbo y col., 2006).

Los procedimientos básicos usados en el control microbiano de alimentos incluyen:

- Destrucción de todos los microorganismos no deseables mediante métodos físicos o químicos e implementación de barreras físicas que impidan la re-contaminación.
- Mantenimiento del alimento bajo condiciones ambientales que excluyan o minimicen las actividades microbianas.
- Modificación del alimento o material mediante procesado o adición de compuestos, que reduzcan su disponibilidad como sustrato para el desarrollo microbiano.

Los **métodos físicos** ajustan temperatura ambiental, humedad, presión o composición de gas. Dentro de los de uso común en la industria alimentaria podemos mencionar:

- **Tratamientos térmicos:** Uno de más empleados es la **pasteurización**, que inactiva las enzimas y destruye células vegetativas, es decir bacterias patógenas no esporuladas y microorganismos alterantes. Otro proceso térmico que se utilizan en la industria es el **calentamiento óhmico** que consiste en aplicar alta temperatura durante corto tiempo (HTST, por sus siglas en inglés). Al ser tan rápido, presenta la ventaja de que el efecto perjudicial, causado por el calentamiento en los alimentos, es mínimo ya que los nutrientes no son destruidos ni alteradas sus cualidades organolépticas. Combinada con el envasado aséptico proporciona un elevado efecto conservante.
- **Almacenamiento en frío y congelación:** El almacenamiento **en frío** consiste en mantener los alimentos a temperaturas bajas, pero por encima del punto de congelación (-2a 16 °C). El tiempo de almacenamiento en estas condiciones puede variar desde pocos días hasta semanas, dependiendo de las características del alimento a conservar. La conservación en frío se basa en que, al reducir la temperatura, disminuyen las velocidades de reacciones químicas, actividad enzimática y fluidez de los lípidos de la membrana citoplasmática. La **congelación** consiste en bajar la temperatura de un alimento hasta -18 °C y mantenerlo almacenado a esta o a más baja temperatura. Es una metodología muy eficaz pues conserva sin alterar las cualidades del alimento, pero muy costosa desde el punto de vista energético.
- Procesos de deshidratación.

- Irradiación con UV o ionizante (rayos gamma, x, y haz de electrones) (Allende y col., 2006; Rico y col., 2007).
- Retirada mecánica de microorganismos mediante filtración de líquidos.
- Alta presión hidrostática, campo eléctrico pulsado (Palgan y col., 2011), campo magnético oscilante, efectos fotodinámicos, embalaje en atmósfera modificada y ultrasonido (Rico y col., 2007; Oey y col., 2008) y combinaciones de procesos físicos.

La conservación basada en **métodos químicos** usualmente implica la aplicación de conservantes químicos, comúnmente conocidos como agentes antimicrobianos. Según el Código Alimentario Argentino (CAA, 1993) los conservantes son "sustancias que impiden o retardan la alteración de los alimentos provocada por microorganismos o enzimas". La FDA los define como "cualquier sustancia que, cuando se añade a los alimentos, tiende a prevenir o retrasar el deterioro de los mismos" (Rivero, 2018).

Los antimicrobianos o conservadores pueden tener al menos tres tipos de acción sobre el microorganismo:

- Daños a la integridad de las membranas (externa y citoplasmática);
- Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales (por ejemplo, metabolismo energético);
- Inhibición de la acción enzimática, biosíntesis de ácidos nucleicos o de la pared celular.

Biopreservación

A pesar del aumento de medidas y regulaciones destinadas a mejorar la seguridad alimentaria, las ETAs continúan siendo un problema de salud importante en el mundo. Los patógenos, especialmente las bacterias, son responsables de causar una amplia variedad de infecciones e intoxicaciones alimentarias, lo que resulta en enfermedades de moderadas a graves e incluso la muerte (Fu y col., 2016). La amenaza de las ETAs aumenta debido a factores como la modernización, comercialización y globalización de la industria alimentaria y el surgimiento de nuevas formas de transmisión, grupos poblacionales vulnerables y microorganismos patógenos resistentes a los antimicrobianos (Cortés-Sánchez y Salgado-cruz, 2017).

En contraste, existe una creciente demanda de los consumidores por productos alimenticios mínimamente procesados y sin conservantes. Esta demanda ha sido impulsada principalmente por los efectos adversos sugeridos por algunos autores de las técnicas clásicas de conservación química y física, como reacciones alérgicas, amenazas de formación de productos finales cancerígenos y alteración de las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos (Wilson y Bahna, 2005; Kashani y col., 2012). La coexistencia de estas situaciones ha desencadenado el desarrollo de estrategias que

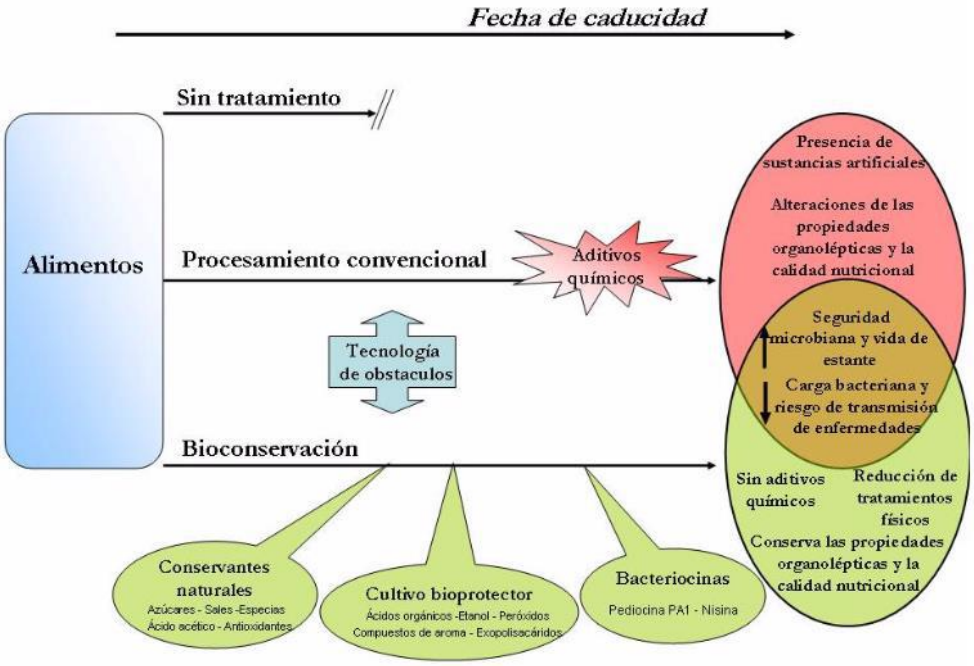
garanticen la seguridad alimentaria y al mismo tiempo reduzcan el uso de conservantes químicos. Una de esas estrategias de conservación es la tecnología de bioconservación, que implica el uso de microorganismos no patógenos y/o sus productos metabólicos para garantizar la seguridad y mejorar la vida útil del producto al inhibir el deterioro de los alimentos (Johnson y col., 2018).

Este sistema de control biológico presenta un número de ventajas comparadas con otros métodos de conservación:

- El uso de microorganismos antagónicos es más seguro en comparación con la aplicación de conservantes químicos, ya que no se acumulan en los alimentos. La microbiota nativa compite con los microorganismos patógenos y alterantes por el espacio físico, nutrientes y/o la producción de compuestos antagonistas que afecten su viabilidad (Parish, 2003);
- Pueden ser más persistentes en el tiempo que los tratamientos químicos lo que dificulta que los patógenos desarrollen resistencia a los mismos;
- Tienen efecto insignificante sobre el equilibrio ecológico de manera que no destruyen enemigos naturales de las especies indeseables como lo hacen los tratamientos tradicionales;
- Pueden ser compatibles con otros sistemas de control y por lo tanto pueden aplicarse en forma combinada, ya que, se busca la combinación de dos o más factores que interaccionen aditiva o sinérgicamente controlando a la población microbiana, evitando la aplicación de un solo factor de conservación en forma severa, lo que mejora la calidad sensorial y nutrimental del alimento; permitiendo el procesamiento de productos semejantes al producto fresco, más sanos, con menos aditivos y listos para preparar y servir (Alzamora, 2000). En casi todos los países las tecnologías basadas en la utilización conjunta de distintos factores inhibidores para conseguir la estabilidad microbiológica final se denominan “tecnologías de barrera o de obstáculos” (Fig. I.3) (también se conocen como “métodos combinados de conservación”). Se definen como la combinación de barreras o técnicas, insuficientes por separado para proteger el alimento, pero que en conjunto pueden llegar a impedir o retrasar la actuación de los factores de alteración. En la figura I.3 se ejemplifica la vida media de los alimentos desde su preparación a la fecha de caducidad si no sufrieron tratamiento para su conservación, si se sometió a un tratamiento de conservación tradicional o sise llevó a cabo un tratamiento de bioconservación.

Es muy importante destacar que los microorganismos utilizados como agentes de control biológico deben poseer una alta actividad antagónica, ser seguros para la salud humana y no tener efectos adversos en la calidad sensorial y nutricional del producto.

Figura I.3 Representación esquemática del tiempo de vida útil de un alimento comercial.



Las nuevas técnicas de biopreservación incluyen bacteriófagos, bacteriocinas y microorganismos bioprotectores. Los bacteriófagos podrían infectar específica y efectivamente, multiplicándose en sus respectivas células bacterianas huésped (Meireles y col., 2016). Sin embargo, las BL representan uno de los grupos más importantes en este sentido, realizando un proceso fermentativo.

Bacterias Lácticas (BL)

Las bacterias lácticas (BL) son grupo extenso y heterogéneo de bacterias filogenéticamente relacionadas, notablemente versátiles y ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se caracterizan por ser Gram-positivas (Ekinci y Gurel, 2007), inmóviles, anaerobias facultativas, catalasa negativa, no esporuladas (Duboc y Mollet, 2001; Gálvez y col., 2007) de morfología celular cocoide o bacilar de longitud variable, dispuestas en forma individual, de a pares, en tétradas o cadenas. Su característica principal es la de ser estrictamente fermentativas y producir ácido láctico como compuesto final único o mayoritario. Carecen de la enzima catalasa debido a su incapacidad para sintetizar compuestos porfirínicos, aunque en ciertas especies se encontró una pseudo-catalasa cuando crecen en condiciones de aerobiosis (Axelsson, 2004) y, de citocromo oxidasa. Poseen peroxidasa y superóxido dismutasa que destruyen el H_2O_2 y el ión superóxido (O^{2-}) respectivamente. Forman colonias color blanco lechoso debido a la ausencia de citocromos. No poseen cadena transportadora de electrones responsable de la respiración (Axelsson, 2004).

Pertenecen al *phylum Firmicutes*, clase *Bacilares* y orden *Lactobacillales*, el cual incluye seis familias (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocceae*, *Streptococccaceae*). Su clasificación taxonómica tradicional en los diferentes géneros, estuvo basada principalmente en los caracteres fenotípicos tales como morfología celular, tipo de metabolismo fermentativo de la glucosa, configuración del ácido láctico producido, habilidad para desarrollar a diferentes temperaturas y concentraciones de sales, tolerancia a ácidos y álcalis.

Sin embargo, el desarrollo y la aplicación de técnicas bioquímicas y moleculares sofisticadas (Holt y col., 1993), como la determinación de la composición de bases guanina-citosina del ADN (mol% G+C), la hibridación de los ácidos nucleicos (ADN:ADN y ADN:ARN) y/o su secuenciación (Holt y col., 1993), han originado importantes cambios. Por ejemplo, el género *Bifidobacterium,* aunque tradicionalmente estuvo incluido en este grupo por producir ácido láctico a partir de la glucosa, está filogenéticamente más próximo al grupo de los actinomicetos, por lo que ha sido excluido del grupo de las BL (Axelsson, 1998).

Las características definitorias de las BL son: la respuesta positiva a la tinción Gram, la incapacidad de esporular, el carácter microaerófilo, la ausencia de citocromos, la de ser catalasas negativas, la capacidad para producir ácido láctico como metabolito final mayoritario de la fermentación de los hidratos de carbono, el poseer un contenido G+C inferior al 55 mol% y la de tener una estrecha relación con los alimentos, entre los géneros que conforman este grupo, se destacan *Lactococcus* (Lc.), *Lactobacillus* (L.), *Streptococcus* (S.), *Leuconostoc* (Ln.), *Pediococcus* (P.) *Carnobacterium* (C.), *Enterococcus* (E.), *Oenococcus* (O.), *Tetragenooccus* (T.), *Vagococcus* (V.) y *Weisella* (W.) (Parra Huertas, 2010). En la Tabla I.2 se puede observar las principales características de estos géneros.

Tabla I.2 Principales características de los géneros pertenecientes al grupo de bacterias lácticas[a] (Adaptada de Axelsson, 1998).

Características	Bacilos		Cocos							
	Carnobacterium	*Lactobacillus*	*Aerococcus*	*Enterococcus*	*Lactococcus* *Vagococcus*	*Leuconostoc* *Oenococcus*	*Pediococcus*	*Streptococcus*	*Tetragenooccus*	*Weisella*[b]
Formación de tétradas	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO_2 a partir de glucosa[c]	-[e]	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Crecimiento a 10 °C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Crecimiento a 45 °C	-	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Crecimiento con 6,5 % NaCl	ND[f]	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Crecimiento con 18 % NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Crecimiento a pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Crecimiento a pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Ácido láctico[d]	L	D, L, DLg	L	L	L	D	L, DLg	L	L	D, DLg

[a] **+** positivo; **-** negativo; **±** respuesta variable según especies; **ND** no determinada.
[b] *Weisella* también puede tener forma bacilar.
[c] Homo o heterofermentación de la glucosa: negativo y positivo, indican homofermentación y heterofermentación, respectivamente.

[d] Configuración del ácido láctico producido a partir de la glucosa.
[e] Pequeñas cantidades de CO_2 pueden ser producidas, dependiendo del medio.
[f] Crecimiento negativo en 8 % de NaCl.
[g] Producción de ácido D-, L- o DL-láctico varía entre especies.

Las BL poseen una gran especificidad fisiológica y sus requerimientos nutricionales son complejos (Saguir y Manca de Nadra, 2007), motivo por el que las BL se encuentran en la naturaleza asociadas a habitats ricos en nutrientes, como son algunos alimentos, leche, carnes y vegetales, la boca, el intestino, la vagina, etc. en los que son consideradas "inquilinos" habituales (Liu y col., 2014). Generalmente utilizan glúcidos y compuestos fermentables relacionados como fuente de energía, por lo que su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares (Madigan y col., 2004).

Las BL desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación industrial de alimentos de origen lácteo, vegetal o cárnico, debido a sus propiedades tecnológicas (Lahtinen y col., 2012; Limón-Martínez y col. 2019), siendo muy utilizadas en la industria alimentaria por su habilidad para acidificar y preservar alimentos y contribuir en el desarrollo de la textura, sabor y aroma de los mismos.

Su capacidad para ser empleadas en la preservación de alimentos, se debe al crecimiento competitivo con otros microorganismos, la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etanol, bacteriocinas y biosurfactantes (Merino, 2019).

Metabolismo

Las BL tienen una gran capacidad para degradar diferentes carbohidratos y otros compuestos relacionados, siendo los azúcares el mejor sustrato para su crecimiento. La Figura I.3 muestra un esquema de las rutas metabólicas comúnmente utilizadas para la fermentación de estos compuestos.

Las BL pueden diferenciarse en dos grupos en base a la vía utilizada para la fermentación de los azúcares y compuestos relacionados, homofermentativos o heterofermentativos (Madigan y col., 2004). Las dos vías metabólicas más importantes son:

- **Glucolisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)** (Fig. I.4 A): es la ruta a través de la cual las bacterias homofermentativas, en condiciones de crecimiento estándar (concentraciones no limitantes de glucosa, disponibilidad de factores de crecimiento, vitaminas, aminoácidos y precursores de ácidos nucleicos y cantidad de oxígeno limitada), metabolizan las hexosas produciendo dos moles de ácido láctico y dos moles de ATP por mol de hexosa fermentada (Ruiz-Rodríguez y col., 2016), sin producción neta de poder reductor. La enzima clave en esta ruta es la fructosa-1,6-difosfato aldolasa. Estas especies

carecen de las enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa y por ello son incapaces de fermentar las pentosas o el gluconato. Además de la glucosa, la fructosa y la manosa, son fermentadas a través de esta vía por algunas BL, después de una isomerización y/o fosforilación.

- **Ruta del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (6-PG/PK)** (Fig. I.4 B): las bacterias heterofermentativas utilizan esta vía, también denominada vía de la pentosa fosfato, produciendo además de ácido láctico, dióxido de carbono (CO_2) y etanol (y/o ácido acético) como productos finales. El rendimiento energético de esta reacción es un mol de ATP y 3 moles de NADH por un mol de hexosa fermentada (Ruiz-Rodríguez y col., 2016).

Por lo tanto, en base al tipo de mecanismo fermentativo las BL se dividen en:

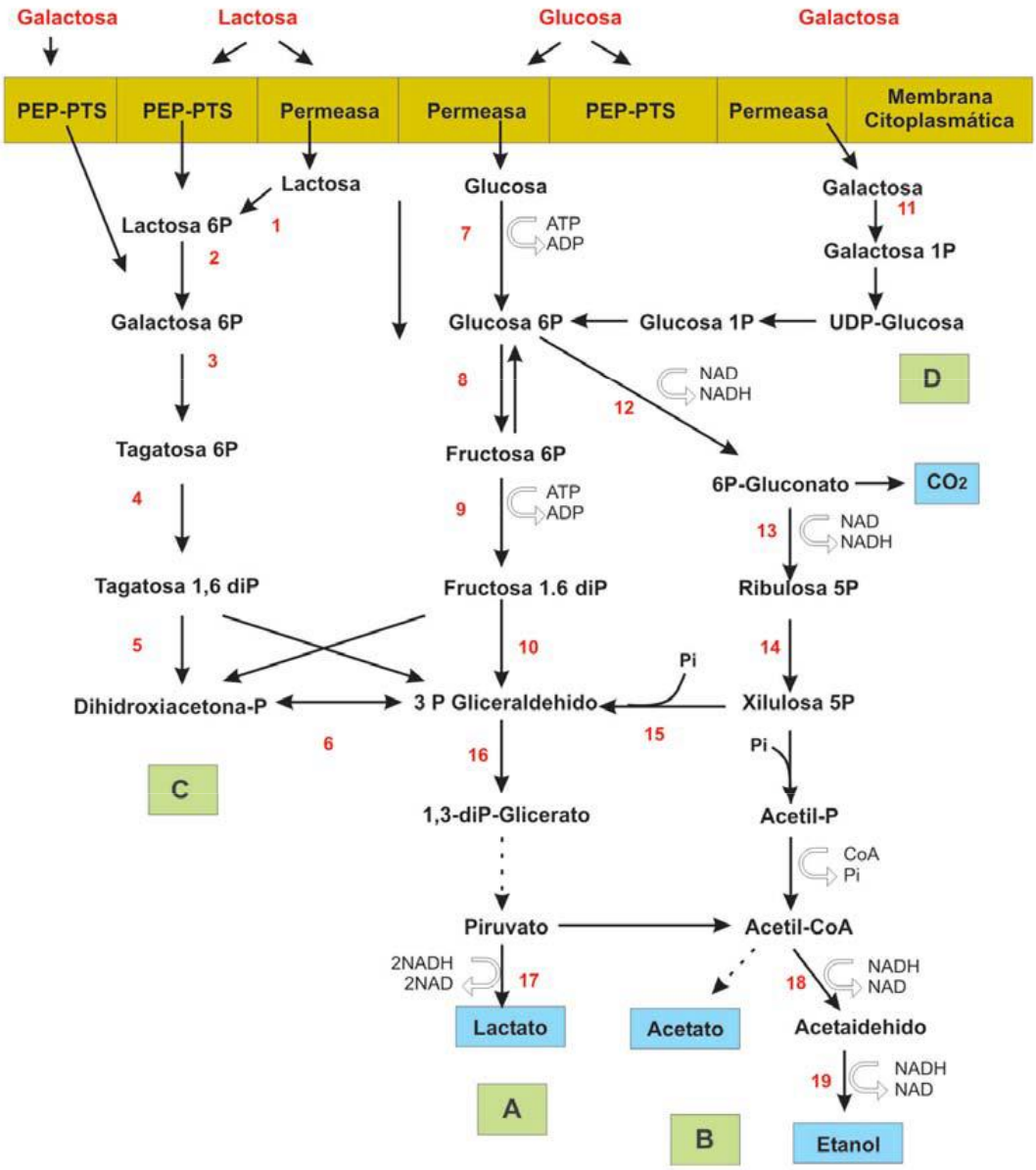
I. **Homofermentativas estrictas:** Fermentan hexosas solamente por la vía glicolítica**.**

II. **Heterofermentativas facultativas:** Tienen la capacidad de utilizar ambas vías, siendo su metabolismo principalmente homofermentativo. Sin embargo, si se modifican las condiciones del medio, tales como la concentración de glucosa, pH, y la disponibilidad de nutrientes cambian su metabolismo a heterofermentativo (Axelsson, 2004). Además, son capaces de transformar las pentosas en lactato y acetato, al poseer una fosfocetolasa inducida por la presencia de pentosas (Kandler, 1983).

III. **Heterofermentativas estrictas:** Utilizan exclusivamente la vía de la pentosa fosfato, también son capaces de fermentar las pentosas produciendo ácido láctico y acético.

Con referencia al ácido láctico producido, hay que indicar que existen dos posibles isómeros, el D(-) y el L(+), cuya formación depende de que la enzima que lleve a cabo la reducción del piruvato a lactato sea la D-lactato o la L-lactato deshidrogenasa. Las especies de BL pueden producir sólo uno de los isómeros o una mezcla de ambos y tiene importancia taxonómica el tipo de isómero producido. Cuando se producen ambas enzimas (D-lactato y L-lactato deshidrogenasa), éstas suelen tener distinta actividad, lo que da lugar a un exceso de uno de los isómeros y raramente se produce una mezcla racémica (Fleming y col., 1985). El isómero L(+) es conocido como el "isómero fisiológico" ya que al ser similar al encontrado en el organismo humano, es mejor asimilado o más rápidamente metabolizado (Montaño y col., 1992). Este hecho propició que el Comité de Expertos de la FAO/WHO en el año 1974, recomendara la eliminación del isómero D(-) en los alimentos para niños.

Figura I.4 Principales rutas de transporte y metabolismo de azúcares utilizadas por las bacterias lácticas (Fuente: Seseña Prieto, 2005).
(**A**) Fermentación homoláctica (glucolisis o vía de Embden-Meyerhof-Parnas); (**B**) Fermentación heteroláctica (ruta del 6- fosfogluconato/fosfocetolasa); (**C**) ruta de la tagatosa-6-fosfato; (**D**) ruta de Leloir.



Las enzimas numeradas son: 1, β-galactosidasa; 2, fosfo-β-galactosidasa; 3, galactosa-6P isomerasa; 4, tagatosa-6P quinasa; 5, tagatosa 1,6-diP aldolasa; 6, triosa-P isomerasa; 7, glucoquinasa; 8, glucosa-6P isomerasa; 9, fosfofructoquinasa; 10, 1,6-diP-aldolasa; 11, galactoquinasa; 12, glucosa-6P deshidrogenasa; 13, gluconato-6P deshidrogenasa; 14, ribulosa-P epimerasa; 15, fosfocetolasa; 16, gliceraldehído-P deshidrogenasa; 17, lactato deshidrogenasa; 18, acetaldehído deshidrogenasa; 19, alcohol deshidrogenasa.

Del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados, puede concluirse que, aunque la glucólisis es por lo general la ruta metabólica más utilizada por las BL y los productos resultantes de la misma los que con mayor frecuencia se encuentran en los alimentos fermentados, éstas son capaces de actuar sobre otros compuestos por exigencias de sus respectivos metabolismos, dando lugar a una gran variedad de

productos como el acetaldehído, el diacetilo, el 2,3-butanodiol, la propanona, o los dextranos, que van a influir notablemente en la textura, el gusto, el olor y el color de los alimentos y, en definitiva, en las propiedades organolépticas de los mismos (Poolman, 1993; Axelsson, 1998).

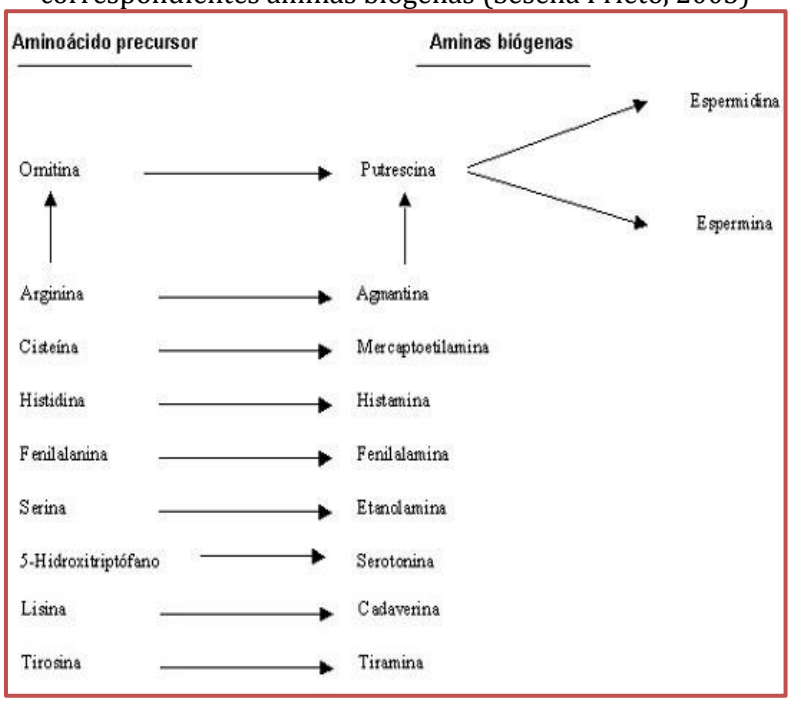
Las BL son capaces de transformar, utilizando distintas rutas metabólicas, las proteínas, los péptidos y algunos aminoácidos. Éstas han desarrollado "sistemas proteolíticos" complejos que les permiten utilizar eficientemente las fuentes de nitrógeno presentes en los medios de cultivo, liberando péptidos y/o aminoácidos, que serán transportados a través de la membrana citoplasmática, mediante sistemas de transporte específicos y finalmente utilizados en el interior celular (Saguir y col., 2008). A pesar de ello, la presencia de aminoácidos preformados en el medio es de gran importancia para estas bacterias, dada su limitada capacidad para sintetizar aminoácidos a partir de fuentes de nitrógeno inorgánico (Saguir y Manca de Nadra, 2002).

En la última fase de la proteólisis se produce acumulación de aminoácidos libres, algunos de los cuales influyen en la textura, siendo una importante reserva de compuestos precursores de aromas y pueden contribuir al sabor característico de algunos alimentos (por ejemplo, la prolina está asociada con el gusto levemente dulce de los quesos suizos y la arginina con el sabor amargo de ciertos alimentos).

Además de la actividad proteolítica, entre las BL, es frecuente encontrar especies capaces de descarboxilar algunos aminoácidos, procesos que llevan a la formación de dióxido de carbono y la correspondiente amina (Halász y col., 1994). La presencia de estas aminas denominadas "biógenas" ha sido descrita en algunos alimentos fermentados, como los embutidos, los productos lácteos, los derivados del pescado, los vinos o los encurtidos (Landete y col. 2005) siendo en estos últimos la histamina, la más frecuentemente encontrada (Saguir y Manca de Nadra, 2008). En la figura I.5 se encuentran algunos ejemplos de las aminas biógenas con mayor presencia en los alimentos y los aminoácidos a partir de los que se originan (Seseña Prieto, 2005).

El gran interés suscitado por estos compuestos, proviene del hecho de que algunas de ellas como la histamina, pueden ser tóxicas incluso ingeridas en bajas concentraciones. Además, tanto la tiramina como la histamina tienen propiedades vasoactivas y/o psicoactivas, por lo que su presencia en los alimentos supone un riesgo importante para los consumidores (Mariné-Font y col., 1995).

Figura I.5 Aminoácidos descarboxilados por las bacterias lácticas y sus correspondientes aminas biógenas (Seseña Prieto, 2005)



No obstante, para que en los alimentos se produzca acumulación de aminas biógenas es necesario que confluyan estas circunstancias: disponibilidad de los aminoácidos precursores, presencia de microorganismos con actividad aminodescarboxilasa y condiciones favorables tanto para su crecimiento como para la actividad descarboxilante (ten Brink y col., 1990). Además, se ha demostrado que el uso de cepas bacteriocinogénicas y/o bacteriocinas, puede contribuir a reducir el riesgo de supervivencia y multiplicación de bacterias amino-biógenas durante la maduración y almacenamiento de alimentos fermentados. Además, la producción de aminas biógenas durante la fermentación puede ser controlada mediante el uso de enzimas y bacterias oxidantes de aminas (Hanchi y col., 2018; Zdolec y col., 2020).

Las BL pueden llevar a cabo otras transformaciones en los aminoácidos como son las reacciones de transaminación y de desaminación que, aunque menos frecuentes, son también de gran importancia ya que conducen a la formación de aldehídos, fenoles, índoles y otros compuestos azufrados fuertemente aromáticos, que pueden provocar malos olores (Seseño Prieto, 2005).

Varias investigaciones han mostrado que las BL son capaces de formar biopelículas de especies múltiples en varios nichos y pueden evitar la radicación de microorganismos patógenos de manera eficiente mediante mecanismos de competencia, antagonismo e inhibición. Los biosurfactantes son compuestos anfifílicos que pueden ser producidos por BL y están implicados en la dinámica de las biopelículas, permitiendo la absorción y

desorción bacteriana, crear canales para el flujo de agua y nutrientes hacia zonas más profundas de la biopelícula y en el desprendimiento de las bacterias para formar una biopelícula en otros ambientes (Boles y col., 2005). Se ha demostrado que estos biosurfactantes pueden tener actividad anti-adhesivas e inhibitorias de patógenos tales como *Escherichia coli*, *S. epidermis*, *S. aureus* y levaduras tales como *Candida* sp. (Rodrigues y col., 2004, 2006a, b; Gudiña y col., 2010).

Enterococcus

Enterococcus es el tercer género principal de BL después de *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Ben Braïek y Smaoui, 2019).Son bacterias ubicuas del tracto gastrointestinal humano y animal, que también están presentes en vegetales, carne, leche y queso (Giraffa, 2002). Su capacidad para colonizar nichos ecológicos tan diversos está relacionada con su tolerancia en condiciones ambientales adversas (Byappanahalli y col., 2012). A pesar de las preocupaciones sobre su existencia como importantes patógenos oportunistas que causan una amplia variedad de infecciones, podrían exhibir funciones interesantes.

Enterococcus sp. son bacterias Gram positivas ubicuas que se han aislado del suelo, las aguas superficiales y el agua de mar; en asociación con plantas; en productos alimenticios fermentados; como parte de la microbiota intestinal tanto de vertebrados como de invertebrados; y como agentes causales de enfermedades humanas (García-Solache y Rice, 2019). Tienen un contenido de genoma bajo en G+C de aproximadamente 34 a 45 %, un tamaño de genoma que varía de 2,3 a 5,4 Mb con 2.154 a 5.107 genes predichos, y un genoma central de género con una cantidad de genes que varía de 605 a 1.037 según los datos conjunto y criterios utilizados para el análisis (Lebreton y col., 2017; Zhong y col., 2017). El pangenoma enterocócico es más grande y refleja la naturaleza altamente plástica de sus genomas y las adaptaciones de nicho particulares (García Solache y Rice, 2019).

El término “enterococo” fue acuñado por primera vez por Thiercelin en 1899, cuando describió bacterias comensales intestinales con la capacidad de volverse patógenas (Thiercelin, 1899). Debido a similitudes morfológicas y bioquímicas, los enterococos se consideraron parte del género *Streptococcus* (Andrewes y Horder, 1906; Frobisher y Denny, 1928) y se clasificaron como estreptococos del grupo D hasta mediados de la década de 1980. Aunque se identificaron cuatro ramas separadas de estreptococos, los estreptococos piógenos, los estreptococos viridans, los estreptococos lácticos y los enterococos (Sherman, 1937), el término "enterococo" se consideró más como un nombre reservado para los cocos Gram positivos aislados del intestino/heces, en

lugar de un grupo monofilético. Sin embargo, con base en un análisis detallado de las características bioquímicas y de cultivo, en 1970, Kalina propuso que los llamados estreptococos entéricos se ubicaran en un género propio, *Enterococcus*, pero fue solo en 1984 que la propuesta formal del género Enterococcus se volvió más aceptada (Schleifer y Klipper-Bälz, 1984). Esta separación, de los enterococos de los estreptococos, se basó primero en estudios de hibridación ADN-ADN y ADN-ARNr (Schleifer y Kilpper-Bälz, 1984; 1987; Schleifer y col., 1985). Fue confirmada por el análisis de la secuencia del ARNr 16S (Ludwig y col., 1985) que mostró que los enterococos también diferían de los lactococos y de otros cocos Gram positivos. Finalmente, apareció como un género debidamente reconocido separado de los estreptococos en una adición editorial a la edición de 1986 del Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Mundt, 1986).

Este género microbiano está compuesto por más de 38 especies (Abriouel y col., 2008), las cuales están asociadas a distintos grupos por estudios realizados de secuencias de ARNr 16S y/o estudios de hibridación de ADN-ADN. La familia Enterococcaceae fue propuesta por primera vez por Ludwig y col.(2009) en base a la similitud del gen 16S rRNA. Las *Enterococcaceae* están en el orden *Lactobacillales* con otras familias de importancia médica y económica, como las *Lactobacillaceae* y las *Streptococcaceae*, clase *Bacilli* en el phylum *Firmicutes*.

Los enterococos son bacterias ovoides que no forman esporas (Schleifer y Klipper-Bälz, 1984) y existen individualmente o en pares, cadenas o grupos. Son anaerobios facultativos quimio-organotróficos con metabolismo homofermentativo, con ácido láctico como producto final predominante de la fermentación de carbohidratos (Švec y Franz, 2014).

La mayoría de los enterococos son oxidasa y catalasa negativos, tolerantes a la sal (hasta un 6,5 %), resistentes al 40 % de bilis, hidrolíticos de esculina y capaces de crecer en presencia de azida de sodio (hasta un 0,4 %). Todas las especies descritas y probadas producen β-glucosidasa; leucina arilamidasa; ácido de los azúcares d-fructosa, galactosa, β-gentiobiosa, glucosa, lactosa, maltosa, d-manosa, ribosa, trehalosa, celobiosa y N-acetilglucosamina; y los glucósidos salicina, metil β-d-glucósido, amigdalina y arbutina. En general, los *Enterococos* son ureasa negativos y no producen ácido a partir de d-arabinosa, eritritol, d- y l-fucosa, metil α-d-xilósido y l-xilosa; estas características metabólicas se han utilizado en el desarrollo de kits de pruebas comerciales. El crecimiento ocurre entre 10 y 45°C, con un crecimiento óptimo para la mayoría de las especies entre 35 y 37°C (Švec y Devriese, 2015) y son notablemente resistentes a la desecación (Švec y Devriese, 2015). Se informa que solo dos especies de enterococos son móviles: *Enterococcus gallinarum* y *E.*

casseliflavus/*E. flavescens* (Hugh, 1959; Mundt y Graham, 1968; Collins y col., 1984; Naser y col., 2006).

Cuando son cultivadas en agar sangre de caballo, los enterococos pueden ser alfa, beta o no hemolíticos y formar colonias de 1 a 2 mm con apariencia húmeda (Public Health England, 2021). Con base en sus capacidades metabólicas, se han desarrollado diferentes medios de cultivo selectivos para el aislamiento de enterococos; estos medios selectivos suelen contener sales biliares, azida de sodio, antibióticos y sales de esculina o tetrazolio. No todas las especies de enterococos pueden crecer en estos medios selectivos, pero las especies clínicamente más relevantes crecen bien. La mayoría de las pruebas clínicas para la identificación de enterococos incluyen pruebas de catalasa, pirrolidonil arilamidasa/pirrolidonil-aminopeptidasa (PYR) y una prueba de hidrólisis de bilis esculina. Se han desarrollado kits comerciales para estandarizar y optimizar la detección de enterococos en el entorno clínico, todos requieren aislamiento previo y cultivo de los organismos, lo que podría retrasar el diagnóstico. Además, la diferenciación precisa entre especies en grupos de especies no siempre se logra basándose únicamente en pruebas fenotípicas (Williams y col., 1991).

Los enterococos se consideran organismos comensales del tracto gastrointestinal humano; sin embargo, también pueden ser patogénicos, en su mayoría relacionados con las IRAS, y comúnmente causan infección del tracto urinario (ITU), bacteriemia, endocarditis, quemaduras e infecciones de heridas en el sitio quirúrgico, infecciones del abdomen y del tracto biliar e infección de catéteres y otros dispositivos médicos implantados. En la mayoría de las encuestas, los enterococos son la tercera causa más común de endocarditis de válvula nativa, después de *Staphylococcus aureus* y *Estreptococos viridans* (Murdoch y col., 2009; Slipczuk y col., 2013). En humanos, *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies de enterococos más abundantes.

Los enterococos no son organismos muy virulentos, y la patogenicidad de *E. faecalis* y *E. faecium* en el entorno hospitalario se relaciona principalmente con su capacidad de supervivencia en un ambiente hostil, rico en antimicrobianos. Varios rasgos en ambas especies se han relacionado con su potencial patógeno y su capacidad para causar enfermedades. Estos incluyen la capacidad de evadir el sistema inmunológico; la capacidad de adherirse a las células huésped, la matriz extracelular (EM) y materiales inertes, como una variedad de dispositivos médicos; y la capacidad de formar biopelículas que las hacen más resistentes a la eliminación de antibióticos y al ataque fagocítico (Mohamed y Huang, 2007). Los factores de virulencia son más evidentes en *E. faecalis*, lo que tal vez explique su papel aún principal en las infecciones por enterococos.

El antibiótico glucopeptídico vancomicina permaneció prácticamente universalmente activo contra E. faecalis y E. faecium durante casi tres décadas después de su introducción clínica. A principios de la década de 1980, comenzaron a surgir cepas, primero en Europa y luego en los Estados Unidos, que expresaban un alto nivel de resistencia inducible a la vancomicina y al antibiótico teicoplanina introducido más recientemente (Shlaes y col., 1989a; 1989b).

Se ha acumulado una gran cantidad de información en las últimas dos décadas sobre la biología de la población de *E. faecalis* y *E. faecium*, pero se sabe poco sobre la estructura de la población de los enterococos non-faecium non-faecalis.

Los enterococos se consideran como componentes de la flora intestinal de humanos y animales que actúan como patógenos oportunistas en diferentes compartimentos extraintestinales del cuerpo. Han recibido una atención considerable en la bacteriología médica debido a su papel cada vez mayor en las infecciones intrahospitalarias (nosocomiales). Un factor importante que contribuye a este fenómeno sin duda ha sido su resistencia natural (intrínseca) y adquirida a los antibióticos de uso frecuente. La mayoría de las especies de enterococos conocidas hasta la fecha se asocian típicamente con los intestinos de humanos y animales domésticos, y cuando se encuentran fuera del intestino, se interpretan como indicadores de contaminación fecal (Díaz Perez y col., 2010).

Los enterococos se encuentran entre las bacterias no esporulantes más termotolerantes, y las especies clásicas son sorprendentemente resistentes al secado, lo que las hace propensas a causar deterioro en carnes procesadas cocidas o calentadas (Franz y col., 1999). Por estas propiedades, pueden ser considerados como indicadores de la calidad sanitaria de los alimentos y *E. faecalis* es la especie dominante en la mayoría de estos alimentos.

En marcado contraste con esto, su presencia es muy deseable en una variedad de quesos para lograr ciertos aromas u otras propiedades sensoriales. *E. faecium* y *E. faecalis* suelen dominar estos quesos y su número suele llegar a 10^6 o 10^7UFC/g. En otros tipos de quesos predominan diferentes BL, pero también en estas variedades los enterococos representan una parte importante de la flora de los productos madurados (Franz y col., 1999).Su actividad proteolítica, la producción de acetaldehído, acetoína y diacetilo, y posiblemente también la actividad de esterasa en la grasa de la leche, se consideran importantes para la maduración del queso (Centeno y col., 1996; Tsakalidou y col., 1998). Las propiedades favorables de los enterococos han llevado a la inclusión de ciertas *E. faecalis*, *E. faecium* o *E. durans* en cultivos iniciadores de ciertos tipos de queso. Hacen posible lograr propiedades deseables de manera constante (Franz y col., 1999).

En algunos casos son utilizados como aditivos alimentarios para prevenir la diarrea o mejorar el crecimiento en animales (Hanchi y col., 2018). Otra característica por la cual los enterococos han despertado interés, es por la alta producción de bacteriocinas activas contra otros enterococos, *Listeria*, E. *coli* O157:H7 y algunas cepas de *Clostridium* sp. (Schelegueda y col., 2015; Goñi y col., 2016; Delcarlo y col., 2019; Guitián y col., 2019; Núñez Martínez, 2020). Las bacteriocinas producidas por los *Enterococcus* generalmente pertenecen a la clase II (Abee y col., 1994; Cintas y col., 1998).

Presencia de *Enterococcus* en alimentos

El género *Enterococcus* incluye una amplia variedad de cepas que actúan como cultivos iniciadores en el desarrollo de las características organolépticas de los alimentos fermentados, incluyendo derivados cárnicos, lácteos y vegetales, así como, por su capacidad para producir bacteriocinas, ambas características son consideradas importantes desde el punto de vista tecnológico e higiénico, respectivamente (Núñez Martínez, 2020).

El uso de *Enterococcus*, con esta finalidad, se está normalizando y se ha aceptado que forman parte de la microbiota natural de ciertos alimentos (Hanchi y col., 2018). La resistencia de los enterococos a la pasteurización y su adaptabilidad a diferentes sustratos y condiciones de crecimiento explican su presencia en alimentos elaborados a partir de materias crudas o tratadas térmicamente. Además, la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas frente a bacterias patógenas y deteriorantes, ha atraído considerablemente la atención para su aplicación en la conservación de alimentos, reduciendo el uso de conservantes químicos y/o disminuyendo la intensidad de tratamientos físicos como el calor.

A continuación, se analiza la presencia de *Enterococcus* en los productos alimenticios (Hanchi y col., 2018):

- **Productos lácteos**: los *Enterococcus*, así como otras BL, actúan como iniciadores de la fermentación natural en la leche cruda, sobreviviendo incluso a las temperaturas alcanzadas en los procesos de refrigeración y pasteurización gracias a su naturaleza psicrótrofa, su resistencia al calor y a la adaptabilidad que poseen a diferentes condiciones de crecimiento y sustratos. Juegan un papel beneficioso en el desarrollo de las características organolépticas de los quesos, especialmente en los originarios de países Mediterráneos Europeos, elaborados a partir de leche cruda o pasteurizada, e interviniendo en la maduración de diferentes variedades de queso como Mozzarella, Feta, Cheddar o Pecorino sardo, probablemente debido a su actividad lipolítica o proteolítica (Núñez Martínez, 2020). En diferentes cuajadas de quesos se encontraron *Enterococcus* en

rangos de 10^4 a 10^6 UFC/g y en quesos madurados de 10^5 a 10^7 UFC/g con *E. faecalis* y *E. faecium* como especies predominantes. Además, la capacidad de los *Enterococcus* para fermentar citrato y producir diacetilo y otros compuestos volátiles pueden contribuir a aportar un flavor característico. En quesos elaborados a base de leche cruda de oveja, vaca o cabra se han encontrado, *E. durans* y *E. faecalis* y, en menor medida, otras especies de *Enterococcus* como *E. casseliflavus*. Por el contrario, la presencia de elevados niveles de *Enterococcus* en algunos quesos, especialmente quesos frescos o suaves, elaborados a partir de leche pasteurizada, es interpretada como resultado de una mala práctica higiénica durante su elaboración, lo que puede llevar al deterioro y la pérdida de propiedades sensoriales del producto (Giraffa, 2003; Bhardwaj y col., 2008; Hanchi y col., 2018).

- **Vegetales fermentados**: todavía no está claro si la fuente de *Enterococcus* es endógena o si es el resultado de una contaminación ambiental. En los ensilados están presentes de forma natural, jugando un papel importante en la fermentación, por lo que algunas cepas se utilizan como inóculos. Las especies de *Enterococcus* más asociadas a vegetales son *E. faecium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, y *E. sulfurosus*, algunos de ellos se han encontrado en materias primas utilizadas en la elaboración de cerveza, en sorgo y en fermentaciones de soja (Abriouel y col., 2008; Lebreton y col., 2014; Hanchi y col., 2018). En la fermentación de alimentos basados en sustratos amiláceos se ha detectado la presencia de *E. saccharolyticus*. Por otro lado, las bacteriocinas de los *Enterococcus* se utilizan como agentes bioprotectores en alimentos de origen vegetal como zumos de frutas y alimentos listos para el consumo, en vegetales fermentados y no fermentados. La enterocina AS-48 es utilizada en un amplio rango de productos vegetales siendo efectivo su uso para la inactivación de *Salmonella* entérica en zumos de frutas contaminados, de *L. monocytogenes* y de microorganismos formadores de esporas en vegetales crudos y enlatados (Núñez Martínez, 2020). Otros ejemplos que actúan de forma similar son las enterocinas CCM4231 y EJ97 que se utilizan para el control de *Listeria* en leche de soja y de *Bacillus* en puré de calabacín (Hanchi y col., 2018).
- **Productos cárnicos**: forman parte de la microbiota natural de muchos productos cárnicos fermentados, pero también los podemos encontrar en carne cruda, siendo las especies que más predominan *E. faecium* y *E. faecalis*, seguidas de *E. hirae* y *E. durans*. Se han encontrado *E. faecium* y *E. mundtii* en carne de pollo y productos cárnicos fermentados como las salchichas, contribuyendo al desarrollo de propiedades sensoriales (Hanchi y col., 2018). Otras actividades importantes asociadas a los enterococos en este tipo de alimentos son la reducción de la actividad de metamioglobina, la habilidad de degradar factores antinutritivos como la estaquiosa y la rafinosa, y la producción de

hidrolasa de sal biliar (Hanchi y col., 2018). Las bacteriocinas también pueden jugar un papel importante en los productos cárnicos utilizándolas como cultivos protectores en derivados cárnicos listos para el consumo (RTE, por sus siglas en inglés) (Callewaert y col., 2000; Hanchi y col., 2018).

- **Pescados y mariscos**: *E. faecium* y *E. mundtii* parecen ser las especies predominantes (Sánchez Valenzuela y col., 2009; Parada y col., 2017; Hanchi y col., 2018). Algunos ejemplos de ello son *E. mundtii* LP17 y LP18 aislados de salmonete (*Mullus surmuletus*) y sardinas (*Sardina pilchardus*) respectivamente (Iseppi y col., 2019), *E. faecium* que se ha aislado de almejas (*Tapes decussata*) (Sánchez Valenzuela y col., 2009), jurel plateado (*Pseudocaranx dentex*), mújol (*Mugil cephalus*) y pargo (*Pagrus auratus*). En otro estudio, se aisló *E. faecium* CN-25 en muestras de huevas de pescado fermentado tradicional tailandes (Sonsa-Ard y col., 2015).

Bacteriocinas

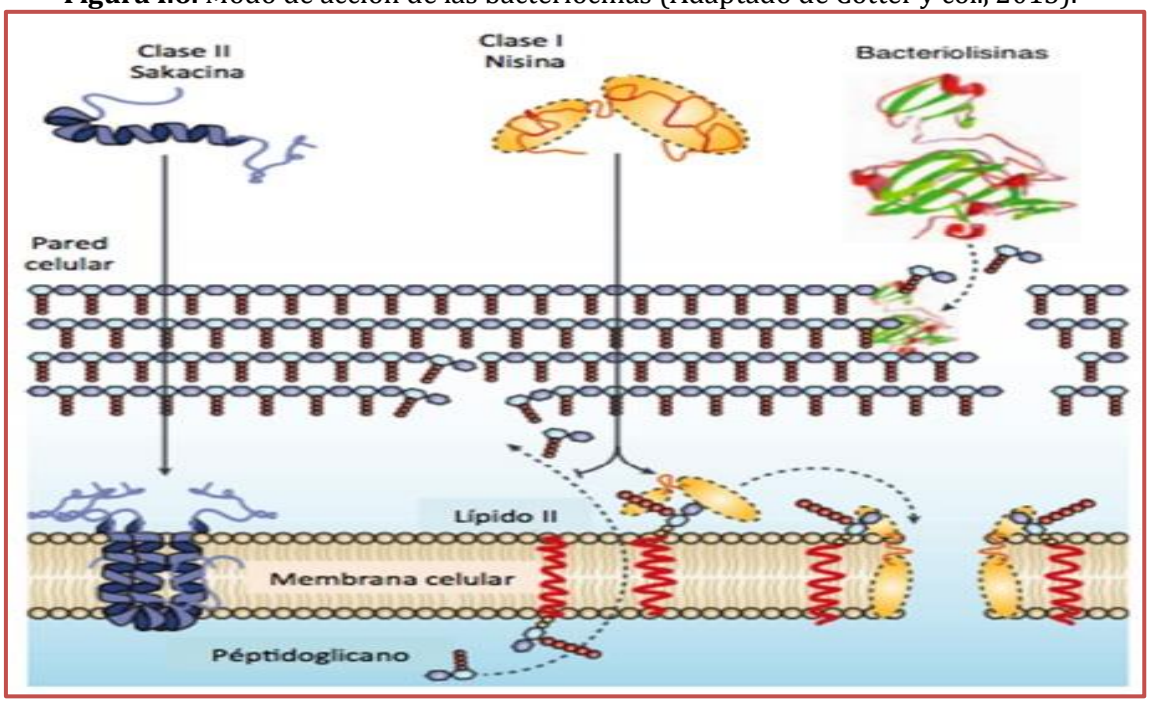
Las proteínas y los péptidos antimicrobianos ribosómicamente sintetizados y secretados por bacterias son denominados bacteriocinas (Cintas y col., 1998; Cotter y col., 2005). El estudio de las bacteriocinas se inicia en 1925, con el descubrimiento de las colicinas producidas por *Escherichia coli* (Gratia, 1925). Este hallazgo permitió el desarrollo de métodos de detección y aislamiento de otras clases de bacteriocinas (Lewus y Montville, 1991). Desde el descubrimiento de las colicinas, las bacteriocinas han sido muy estudiadas debido a sus aplicaciones como conservantes naturales.

Se trata de proteínas catiónicas pequeñas, heterogéneas, hidrofóbicas, constituidas por 20 a 60 residuos de aminoácidos, punto isoeléctrico elevado y características anfipáticas. Las bacteriocinas son variadas en relación al microorganismo productor, al espectro de actividad (estrecho o amplio), modo de acción, masa molecular, origen genético, propiedades bioquímicas, receptores celulares e interacción con el sistema inmunitario (Mokoena, 2017; De Giani y col., 2019; Lopetuso y col., 2019). Las bacteriocinas pueden ser producidas espontáneamente o inducidas, y las cepas productoras son inmunes a la o las bacteriocina/s que expresa debido a proteínas de inmunidad específicas (Naidu y Clemens, 2000; De Martinis y Franco, 2002; Cotter y col., 2005).

Hasta el momento, muchas bacteriocinas han sido ampliamente identificadas con varios modos de acción (Fig. I.6) cómo los siguientes: inducir la permeabilidad de la membrana citoplasmática (mediante la formación de poros), inhibir la biosíntesis de la pared celular e interferir con las vías metabólicas (Roces y col., 2012; Hols y col., 2019). La formación de poros de membrana como un mecanismo inhibidor común, la alta actividad

inhibidora con bajas concentraciones en el rango nanomolar y la actividad antimicrobiana de espectro relativamente estrecho son las características de muchas bacteriocinas producidas por las BL (Darbandi y col., 2022).

Figura I.6. Modo de acción de las bacteriocinas (Adaptado de Cotter y col., 2013).



Las bacteriocinas poseen una actividad antimicrobiana variable, normalmente sobre especies estrechamente relacionadas, o inclusive sobre cepas de la misma especie productora. Pueden actuar sobre microorganismos Gram positivos, debido a que pueden desestabilizar los polímeros aniónicos de la pared celular (ácidos teicoico y lipoteicoico) (Zacharof y Lovitt, 2012). Por tanto, se destacan por su actividad contra patógenos y alterantes como *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *C. botulinum* (Schillinger y col., 1996). Además, de su efecto sobre la pared celular, las bacteriocinas afectan la síntesis de ADN y proteínas (Calo-Matay col., 2007). En el caso de las bacterias Gram negativas, al estar protegidas por una membrana externa esta previene que las bacteriocinas (y cualquier otra sustancia con peso molecular por encima de los 600 Da) pueda alcanzar la membrana citoplasmática. Sin embargo, las bacterias Gram negativas pueden ser sensibilizadas a las bacteriocinas cuando se combina su uso con quelantes o tratamientos de conservación (Lücke, 2000).

Las bacteriocinas tienen aplicación en varios sistemas alimenticios. En general, el empleo de bacteriocinas se realiza en procesos de preservación que involucran un sistema de barreras múltiples (Cleveland y col., 2001). La actividad de las bacteriocinas es influenciada fuertemente por factores tales como el pH, la concentración microbiana, el

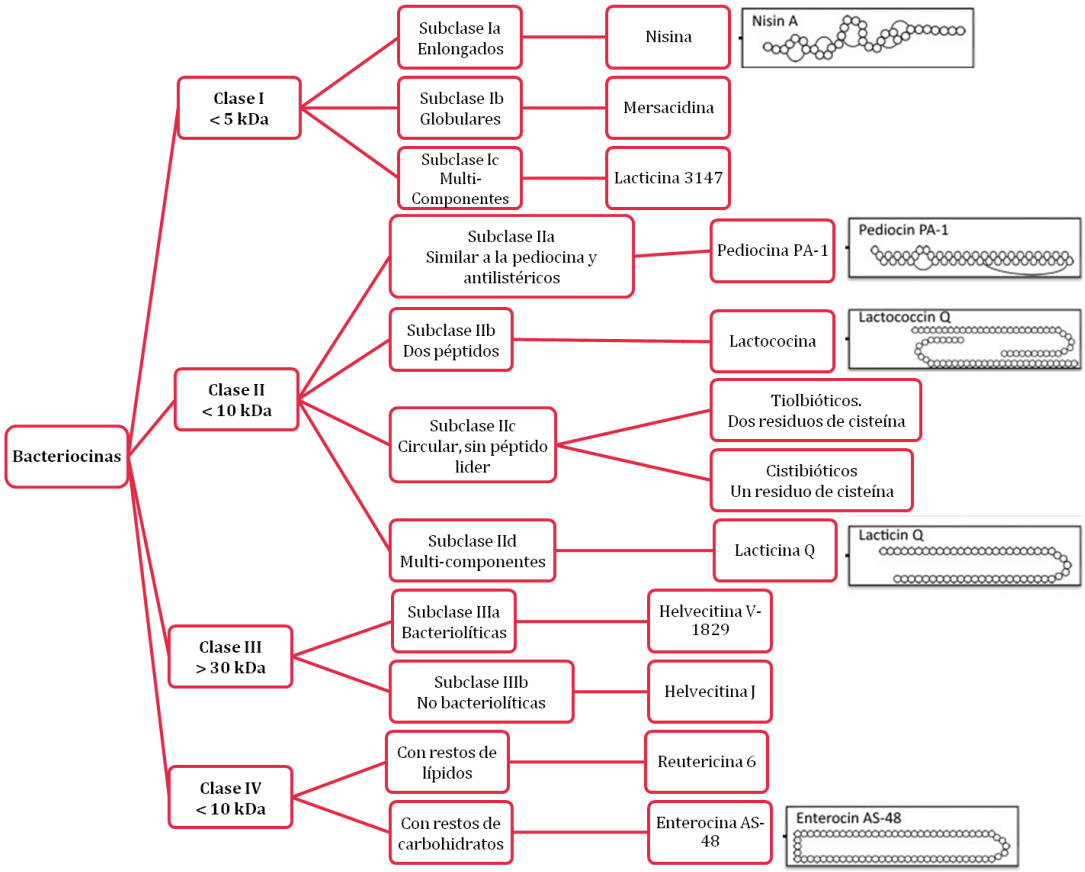
contenido lipídico, las enzimas proteolíticas que pudieran existir en el alimento y la relación sólido vs. Líquido de la matriz alimenticia (Baptista y col., 2020).

Las bacteriocinas han sido clasificadas en diferentes clases, de acuerdo con sus propiedades estructurales y fisicoquímicas, a lo largo de los años (Klaenhammer, 1993; Deegan y col, 2006; Cotter y col., 2013; Alvarez-Sieiro y col., 2016; Ahmad y col., 2017) (Fig. I.7).

- **Clase I:** péptidos pequeños (<5 kDa), con actividad a nivel de membrana, termoestables, con residuos de aminoácidos lantionina y/o metil-lantionina en su estructura debido a las modificaciones postraduccionales que sufrieron durante su biosíntesis (González-Martínez y col., 2013; Meade y col., 2020). Aquí se incluyen a los lantibióticos, sactipéptidos, glucocinas y péptidos de lazo que son agrupados en subclases: **Ia** enlongados, **Ib** globulares y **Ic** multicomponentes. El representante más común de esta clase es la nisina (Hols y col., 2019; Meade y col., 2020).
- **Clase II:** péptidos menores a 10 kDa, termoestables y resistentes a amplios rangos de pH, actúan a nivel de la membrana plasmática. Se dividen en 4 subclases: **IIa** similar a la pediocina, **IIb** dos péptidos, **IIc** circular sin péptido líder y **IId** lineales no similares a la pediocina sin modificar. El representante más común de esta clase es la pediocina PA-1 (Meade y col., 2020).
- **Clase III:** proteínas de alta masa molecular (MM) (> 30 kDa) con actividad antimicrobiana y termolábil, se dividen en bacteriocinas líticas y no-líticas (Ahmad y col., 2017; Meade y col., 2020). Los representantes más comunes de esta clase son helveticina J, colinas y microcinas (Heredia-Castro y col., 2017; Meade y col., 2020).
- **Clase IV:** son moléculas cíclicas o complejas que en su estructura contienen restos de lípidos o una conjugación de carbohidratos para permitir la actividad antimicrobiana (Ahmad y col., 2017). Tienen una masa molecular inferior a 10 kDa y el representante más común de esta clase es la enterocina AS-48 (Johnson y col., 2018).

Como destacan Dicks y col. (2018) la clasificación de bacteriocinas está en constante evolución debido a que actualmente se van descubriendo nuevas bacteriocinas con estructuras más complejas y con diversidad de péptidos; por lo tanto, la agrupación de las bacteriocinas debe adaptarse y cambiar según exista una mayor comprensión de cómo funcionan las bactericinas y la identificación de nuevas bacteriocinas.

Figura I.7 Clasificación de las bacteriocinas (Adaptado de Ahmad y col., 2017).



Se ha informado sobre la purificación y la caracterización genética de muchas bacteriocinas peptídicas derivadas de enterococos, la mayoría de las cuales se han obtenido de *E. faecalis* y *E. faecium* (Tabla I.3). Dado que algunas de estas bacteriocinas no se pudieron agrupar con las típicas bacteriocinas derivadas de BL de acuerdo con la clasificación tradicional, se ha propuesto la clasificación de las enterocinas en cuatro nuevas clases (Franz y col., 2007). La citolisina producida por *E. faecalis* es un lantibiótico peptídico bilineal con actividad citolítica (hemolítica), y sus genes codificadores se encuentran tanto en aislamientos hospitalarios como alimentarios. Se diferencia estructuralmente de otros lantibióticos lineales, incluidas las nisinas A y Z (Corbun y col., 2004; Hynk y col., 2005).Las enterocinas de clase II son bacteriocinas de dos péptidos de la familia de las pediocinas (Ennahar y col., 200). Los péptidos antimicrobianos más comunes son las enterocinas similares a la pediocina, también conocidas como bacteriocinas de clase II-1, que se clasifican en dos subgrupos según la similitud de secuencia (Fimland y col., 2005). Todos ellos tienen un motivo de "caja de pediocina" YGNGVXC conservado y un dominio de hoja β sostenido por un puente disulfuro conservado en el extremo N-terminal (Chen y col., 1997). La enterocina A, las mundticinas y la enterocina CRL5 se encuentran entre el primer subgrupo (Franz y col., 2007). El segundo subgrupo está representado por

la bacteriocina 31, la bacteriocina T8, la bacteriocina RC714, la enterocina SEK4, la enterocina P y la enterocina M (Franz y col., 2007). Las bacteriocinas de clase II-2 carecen del motivo YGNGVXC y no se sintetizan con un péptido líder; sin embargo, deben tener acciones complementarias de ambos péptidos para ser completamente activos (Perez y col., 2014). Un subgrupo principal incluye enterocina Q, enterocina C, bacteriocina de dos péptidos L50 (A, B), enterocina RJ-11 y enterocina EJ97.8. Otras enterocinas lineales no similares a la pediocina con un péptido líder se clasifican como Clase II-3. La presencia de un segundo péptido puede reforzar su actividad antimicrobiana. Las enterocinas de clase III son péptidos cíclicos que incluyen la enterocina AS-48 producida por *E. faecalis* S-48. Finalmente, la clase IV incluye una bacteriocina grande y lábil al calor, denominada enterolisina A, producida por *E. faecalis*. Las enterocinas tienen una amplia gama de actividad antimicrobiana, inhibiendo no solo el crecimiento de bacterias estrechamente asociadas, sino también patógenos Gram positivos como *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *V. cholerae* en los alimentos. Esta particularidad se ha observado por ejemplo en enterocina LD3, enterocina CV7, enterocina B, enterocina Gr17, enterocinas A y B, y enterocina dP (Franz y col., 2007). Además, estas bacteriocinas muestran actividad antimicrobiana de amplio espectro contra bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas* spp. y *Vibrio* sp. (Gupta y col., 2016; Perumal y Venkatesan, 2017; Nawaz y col., 2019; Sheoran y Tiwari, 2019). Además, se consideran una de las armas contra los patógenos multirresistentes y previenen la formación de biopelículas. A pesar de su potente actividad contra los patógenos transmitidos por los alimentos, las bacteriocinas enterocócicas aún no han sido aprobadas para su uso en la conservación natural de alimentos debido a problemas de seguridad (Ben Braïek y Smaoui, 2019).

El uso potencial de estos péptidos antimicrobianos o de las cepas bacteriocinogénicas ha surgido como una estrategia importante para aumentar la seguridad alimentaria a través del control de patógenos alimentarios/microorganismos de deterioro (Galvéz y col., 2007;Balciunas y col., 2013; Prudêncio y col., 2015; Johnson y col., 2018). La inoculación de alimentos con cepas productoras de bacteriocinas y la adición de bacteriocinas purificadas o semipurificadas, que promueven un efecto bactericida con/sin lisis celular o un efecto bacteriostático que inhibe el crecimiento celular, son los enfoques más comunes para usar bacteriocinas para la bioconservación de alimentos (da Silva y col., 2014).

Tabla I.3 Bacteriocinas de *Enterococcus* y sus principales características.

Bacteriocina	Cepa productora	Fuente	Masa Molecular (kDa)	Rango de termo estabilidad	Rango de estabilidad de pH	Estabilidad	Sensibilidad	Espectro de acción inhibitorio	Referencias
Enterocin LD3	*E. hirae* LD3	Dosa	4,1	A 121 °C por 30 min	2-6	Amilasa lipasa	Papaina Proteinasa K Pepsina Tripsina	*S. aureus* *P. fluorescens* *P. aeruginosa* *S. typhi* *S. flexneri* *L. monocytogenes* *E. coli* O157:H7 *E. coli* (urogénica, aislado clínico) *Vibrio* sp.	Gupta y col., 2016; Sheoran y Tiwari, 2019
Unnamed	*E. mundtii* QAUEM2808	Producto de leche fermentada Dahi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	*E. coli* ATCC 10536 *S. aureus* ATCC 6538 *P. aeruginosa* ATCC 9027 *L. monocytogenes* ATCC 13932	Nawaz y col., 2019
Enterocin B	*E. faecium* YT52	Boza	5,5	A 100 °C por 20 min	5-10	Lipasa Lisozima Catalasa	Proteinasa K Tripsina α-quimotripsina Pepsina	*L. monocytogenes* *B. cereus*	Charyyev y col., 2019
Nisina	*E. hirae* DF105Mi	Leche de cabra	(-)	A 121 °C por 20 min	2-12	Detergentes α-amilasa Catalasa	Proteinasa K Pronasa Tripsina Pepsina	*L. monocytogenes*	Furtado y col., 2019

Tabla I.3 Bacteriocinas de *Enterococcus* y sus principales características (continuación).

Bacteriocina	Cepa productora	Fuente	MM (kDa)	Termo estabilidad	Estabilidad pH	Estabilidad	Sensibilidad	Espectro de acción	Referencias
Faerocina MK	*E. faecium* M3K31	Vigna mungo	N.D.	A 100 °C por 30 min	2-12	NaCl	Proteinasa k Papaina	*L. monocytogenes* *S. aureus* *E. coli* *E. herbicola* *B. subtilis* *B. cereus* *P. aeruginosa*	Bagdey y Vigneshwaran, 2019
TJUQ1	*E. faecium*	Pickled chino	(-)	4-45 °C	6-9	(-)	(-)	*L. monocytogenes* CMCC 1595 Bacterias resistentes a vancomicina y/o meticilina	Qiao y col., 2020
KT11"	*E. faecalis* KT11	Queso	~3,5	A 121 °C por 30 min	2-11	Surfactantes Solventes	Proteinasa K α-quimotripsina Proteasa Tripsina	*L. monocytogenes* *S. aureus* ATCC 25923 *B. subtilis* *S. aeruginosa* *K. pneumoniae* *S. marcescens* *E. aerogenes*	Abanoz y Kunduhoglu, 2018
Enterocina CV7	*E. faecalis* CV7	Pollo	4,5	A 121 °C por 10 min	2-12	Solventes Detergentes	Pepsina Proteinasa K	*L. monocytogenes* *S. aureus* *S. thypi* *S. entérica* *E. coli* *V. fischeri*	Perumal y Venkatesan, 2017

Tabla I.3 Bacteriocinas de *Enterococcus* y sus principales características (continuación).

Bacteriocina	Cepa productora	Fuente	MM (kDa)	Termo estabilidad	Estabilidad pH	Estabilidad	Sensibilidad	Espectro de acción	Referencias
EF478	*E. faecalis*	Agua	45	A 60 °C por 1 h A -20 °C por un año	2-8	Amilasa Lipasa	Proteinasa K Tripsina α-quimotripsina	*E. faecalis* ATCC51299 *E. faecium* ATCC 35667	Phumisantiphong y col., 2017
Enterocina dP	*E. lactis* Q1	Camarón	(−)	A 100°C por 15 min	4-9	(−)	Proteinasa KTrypsin	*L. monocytogenes* *P. aeruginosa* *L. garvieae* *A. niger* *Fusarium equiseti*	Ben Braïek y col., 2017
B3A-B3B	*E. faecalis* B3A-B3B	Heces	5,2	(-)	2-10	(-)	Proteinasa K Tripsina Papaina	*L. monocytogenes* *S. aureus* *C. perfringens*	Al-Seraih y col., 2017
152A y L50B	*E. durans* 152	Suelo	5	A 121 °C por 15 min	2-8	(-)	Proteinasa K	*L. monocytogenes*	Du y col., 2017
DU10	*E. faecalis* DU10	Intestino de pato	6,3	A 121 °C por 10 min	2-12	Detergentes Solventes	Proteinasa K Pepsina Tripsina α-quimotripsina	*L. monocytogenes* *S. aureus* *S. typhi* *S. entérica* *Salmonella* sp. *E. coli*	Perumal y col., 2016
Enterocina A, B	*E. faecium* GGN7	Leche	4,8 5,4	A 121 °C por 10 min	2-8	(-)	Proteinasa K Tripsina	*L. ivanovii* BUG496 *P. aeruginosa* 27853	Gaaloul y col., 2015
F4-9	*E. faecalis* F4-9	Pez rojo	5,5	A 100 °C por 15 min	2-6	(-)	Tripsina α-quimotripsina Proteinasa K	*Enterococcus* *B. coagulans* *E. coli* JM109	Maky y col., 2015

Tabla I.3 Bacteriocinas de *Enterococcus* y sus principales características (continuación).

Bacteriocina	Cepa productora	Fuente	MM (kDa)	Termo estabilidad	Estabilidad pH	Estabilidad	Sensibilidad	Espectro de acción	Referencias
CRL 1826	*E. gallinarum* CRL 1826	Rana Toro cautiva	(-)	A 80 °C por 30 min	2-9	Solventes Lipasa α-amilasa	α-quimotripsina Tripsina Pepsina	*Citrobacter freundii* *P. aeruginosa* *L. monocytogenes* *S. aureus*	Montel Mendoza y col., 2015
LD3	*E. hirae* LD3	Dosa batter	Entre 3,48 y 7,68	A 121 °C por 15 min	2-6	Solventes Detergentes Catalasa Amilasa Lipasa	Prpsina Tripsina Proteinasa K Papaina	*P. fluorescens* *P. aeruginosa* *S. typhi* *S. flexneri* *L. monocytogenes* *E. coli* O157:H7 *Vibrio* sp.	Gupta y Tiwari, 2015
SH01	*E. faecium* SH01	Mukeunji	3	A 121 °C por 15 min	2-12	α-amilasa Catalasa Detergentes	α-quimotripsina Pronasa E Proteinasa K Tripsina	*L. monocytogenes* KCTC 3569 *L. curvatus* KFRI 166 *L. mesenteroides* ATCC 10830	Seo y col., 2014
FL31	*E. faecium*	(-)	3,5	A 100 °C por 90 min	2-9	Surfactantes Solventes	Tripsina Pronasa E Proteinasa K	*L. momnocytogenes* ATCC 19117	Chakchouk-Mtibaa y col., 2014

Las bacteriocinas son excelentes candidatas como bioconservantes debido a su impacto mínimo en las propiedades nutricionales y sensoriales de los productos alimenticios, baja toxicidad y estabilidad (O'Connor y col., 2020).El uso de bacteriocinas como conservantes de alimentos puede ser beneficioso en varios aspectos:

I. Para disminuir el riesgo de intoxicación alimentaria;

II. Para disminuir la contaminación cruzada en la cadena alimentaria;

III. Para mejorar la vida útil de los productos alimenticios;

IV. Para proteger los alimentos durante los episodios de abuso de temperatura;

V. Para disminuir las pérdidas económicas debido al deterioro de los alimentos;

VI. Para reducir el nivel de conservantes químicos agregados;

VII. Para reducir la intensidad de los tratamientos físicos para preservar mejor el valor nutricional de los alimentos y reducir los costos de procesamiento;

VIII. Proporcionar métodos de conservación alternativos para "alimentos nuevos" a fin de satisfacer las demandas de los consumidores de productos alimenticios listos para comer, ligeramente conservados y de sabor fresco (Hu y col., 2014).

La gran cantidad de aplicaciones que tienen las bacteriocinas en el área alimentaria pueden dividirse en tres categorías principales (Chikindas y col., 2018; O'Connor y col., 2020):

I. Como cultivo microbiano productor de bacteriocinas;

II. En lácteos o productos fermentados que contengan bacteriocinas de calidad alimentaria;

III. Bacteriocinas de grado alimenticio purificadas o semipurificadas.

Dadas estas categorías, las aplicaciones (Fig. I.8) de las bacteriocinas pueden dividirse en:

I. Bacteriocinas como bioconservantes de alimentos;

II. Bacterias productoras de bacteriocinas como cultivos iniciadores y protectores de alimentos;

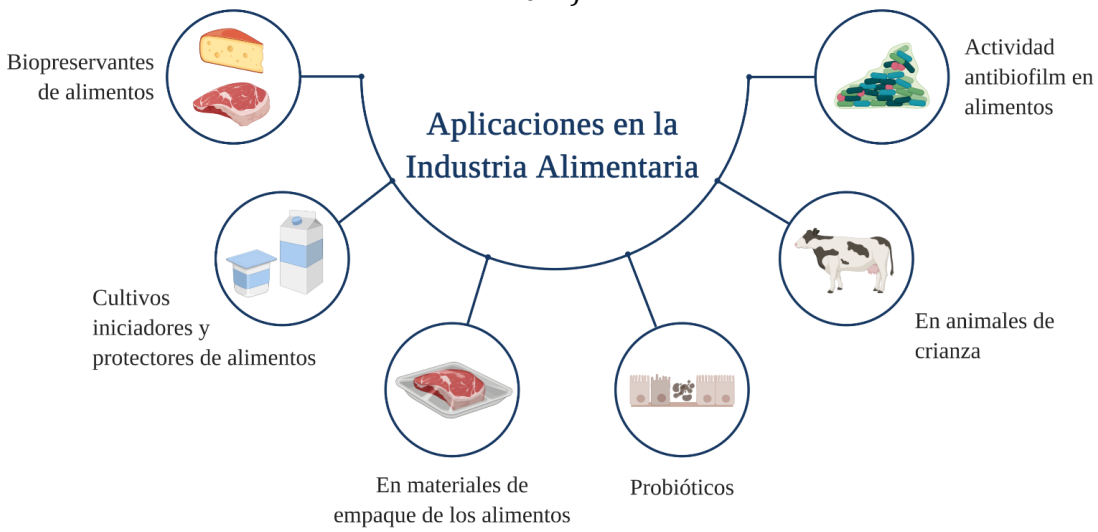
III. Bacteriocinas en los materiales de empaque de los alimentos;

IV. Bacteriocinas reguladoras y moduladoras de la microbiota humana;

V. Bacteriocinas en animales de crianza;

VI. Actividad antibiopelículas en alimentos.

Figura I.8 Aplicaciones de las bacteriocinas en la industria alimentaria (Falconí Medina, 2021).



Bioemulsionantes

Una emulsión son 2 líquidos inmiscibles (no se mezclan entre sí) donde uno de ellos se dispersa en el otro en forma de pequeñas gotitas, y para que esto ocurra intervienen las fuerzas de atracción y repulsión, estéricas y de agotamiento (Vegas y col. 2017). Por ejemplo, podría formarse una emulsión homogeneizando agua y aceite, pero las dos fases se separarían. Esto sucede porque las gotas tienden a unirse con sus homólogas cuando colisionan, lo que eventualmente conlleva a una completa separación de las fases. La fuerza que conduce este proceso viene dada por el hecho que el contacto entre las moléculas de aceite y agua es energéticamente desfavorable (Berton-Carabin y col., 2014), lo cual hace a las emulsiones sistemas termodinámicamente inestables. Sin embargo, es posible formar emulsiones cinéticamente estables por un período de tiempo razonable (días, semanas, meses o años) si se incluye sustancias conocidas como emulsionantes y/o agentes espesantes antes de la homogeneización. Los emulsionantes son moléculas de superficie activa que se adsorben a la superficie de las gotas recién formadas durante la homogeneización, previniendo que las gotas se acerquen lo suficiente como para unirse (Castro, 2006).

El líquido que compone las gotas en el sistema se le conoce como la Fase **Dispersa** o Interna, mientras que el líquido que compone el resto de la emulsión se llama Fase **Continua** o Externa (Bautista Villarreal y Álvarez Nava, 2019). Estos sistemas pueden clasificarse de acuerdo a la distribución de las fases oleosa y acuosa (McClements, 2015):

- **Emulsión aceite en agua** ("oil-in-water emulsion" o emulsión O/W): consiste en gotas de aceite dispersas en una fase acuosa. Como ejemplos podemos nombrar, mayonesa, aderezos, leche, crema, sopas y salsas.

- **Emulsión agua en aceite** ("wáter-in-oil emulsion" o emulsión W/O): consiste en gotas de agua dispersas en una fase oleosa. Algunos ejemplos son la margarina, manteca, entre otros.
- **Emulsiones múltiples**: son emulsiones complejas, a saber, agua en aceite en agua (W/O/W) y aceite en agua en aceite (O/W/O). Ejemplos: helado, productos cárnicos.

Los compuestos tensioactivos microbianos son moléculas anfifílicas que contienen un resto hidrofóbico y otro hidrofílico producido por microorganismos y tienen la capacidad de reducir la tensión interfacial entre diferentes fases fluidas. Neu (1996) dividió estos compuestos en 2 grupos los de bajo peso molecular, también denominados **biosurfactantes** (BS), y los de alto peso molecular, también denominados **bioemulsionantes**(BE). El primero reduce las tensiones interfaciales del líquido en el que se disuelven, mientras que el segundo suele ser más eficaz para estabilizar emulsiones de aceite en aguay bajo poder para reducir la tensión superficial (Mujumdar y col., 2019). Además, presentan una amplia variedad de estructuras químicas, como glicolípidos, lipopéptidos, complejos polisacáridos-proteínas, lipopolisacáridos, fosfolípidos, ácidos grasos y lípidos neutros (Gudiña y col., 2010). A diferencia de los de origen sintético, los bioemulsionantes son altamente selectivos, biodegradables y de toxicidad reducida (EPA, 2003). Además de BS/BE producidos por plantas y animales; los microorganismos representan uno de los candidatos más adecuados para la producción de diversas formas de estos compuestos (Satpute y col., 2018).

Los tensioactivos y emulsionantes tienen una gran cuota de mercado durante las últimas décadas que parece estar en constante crecimiento con una tasa de crecimiento anual compuesta estimada del 6 % (Satpute y col., 2018). Junto con el surfactante sintético, el biosurfactante (BS) y los bioemulsionantes (BE) también están comenzando a crear su propia demanda comercial con una tasa de crecimiento anual compuesta pronosticada de 8-9% (Satpute y col., 2018).

Actualmente, se utilizan en las industrias farmacéutica, biomédica y de procesamiento de alimentos. Esto se debe a que la emulsificación juega un papel importante en la formación de consistencia y textura en diferentes alimentos y productos, así como en la dispersión de fases y en la solubilización de aromas (Santos y col., 2016).

Los compuestos emulsionantes y tensioactivos no son nuevos en la industria alimentaria y se han utilizado de forma rutinaria en la formulación de numerosos productos alimenticios a lo largo de los siglos. Lácteos, productos fermentados, panadería, cervecerías utilizan regularmente emulsionantes y tensioactivos sintéticos y naturales. Otros productos como ensaladas, aderezos, mayonesa, postres, etc. a menudo se complementan con dichos compuestos para mejorar su sabor, apariencia y

almacenamiento. Otras propiedades que confieren los bioemulsionantes (BE) son la estabilización de los aceites, de sabor, la mejora de propiedades en formulaciones de panadería y lácteos (Kosaric 2001; Kosaric y Sukan, 2014). Los monoglicéridos, por ejemplo, se utilizan actualmente como emulsionantes para numerosos productos alimenticios, mientras que los tensioactivos sintéticos como los ésteres de sorbitán y sus derivados etoxilados se han materializado en muchos productos alimenticios (Hasenhuettl, 2008; Tadros 2013; 2016).

Para comprender las diversas propiedades del tensioactivo/emulsionante es esencial para explotarlas en aplicaciones industriales más amplias. Los compuestos de bajo peso molecular como los monoglicéridos, las lecitinas, los glicolípidos y los alcoholes grasos reducen eficazmente la tensión superficial e interfacial. Mientras que los compuestos de alto peso molecular compuestos principalmente por proteínas, las moléculas de tipo polisacárido facilitan la estabilización de las emulsiones (Satpute y col., 2010a; 2010b). Bajo estas circunstancias, las interacciones electrostáticas promueven un poder de penetración efectivo. Los diferentes tipos de alimentos representan sistemas coloidales que tienen varias formas de agregaciones compuestas de partículas y gotas que dan lugar a la apariencia de "geles". Las moléculas de surfactante y polímero se agregan debido a una serie de interacciones, incluidas las fuerzas de van der Waals y las fuerzas repulsivas. Los mecanismos son absolutamente adecuados para los alimentos que tienen contenido de aceite y grasa. La reducción de la tensión superficial ayuda a la formación de emulsiones entre fases inmiscibles y mejora la textura (Satpute y col., 2018).

El propósito, de la adición de biosurfactantes y bioemulsionantes, es principalmente alterar o retener cierta singularidad química (pH, temperatura y sabor), biológica (segura para el consumo) y física (constancia, apariencia) del producto alimenticio que se somete a varios procedimientos como preparación, procesamiento, aderezos, fabricación, almacenamiento, embalaje, manipulación y finalmente transporte. El uso extensivo de carboximetilcelulosa y monoestearato de glicerilo es una práctica habitual. Los biosurfactantes y bioemulsionantes se utilizan principalmente como agente gelificante estabilizador y espesante, sin embargo, su propiedad de emulsificación no puede ignorarse al considerarlos para aplicaciones alimentarias. Estos afectan dramáticamente la textura y consistencia de los alimentos. Al mismo tiempo, otros parámetros interesantes, como la dispersión de fase y la solubilización del aroma, también están influenciados por los fenómenos de emulsificación y las características de los emulsionantes. El objetivo principal de la estabilización de la emulsión se logra mediante la agregación de los glóbulos de grasa por el emulsionante y los sistemas aireados estabilizadores. Por lo tanto, dos sistemas heterogéneos se homogeneizan y el

emulsionante reduce la energía entre las dos fases evitando la coalescencia de las partículas (Berton-Carabin y col., 2014).

Productos como la nata, la margarina, la mayonesa, la mantequilla, el chocolate y los aderezos para ensaladas requieren un uso extensivo de emulsionantes (Nitschke y Costa, 2007). El mejor ejemplo que se puede citar es el empleo deramnolípidos (RHL) en la preparación de pasteles congelados, relleno de crema para pasteles daneses agregando una cantidad suficiente. La L-ramnosa se usa como compuesto de sabor de alta calidad (Van Haesendonck y Vanzeveren, 2004). Además de los productos de panadería, RHL también ayuda a mejorar las propiedades de los productos lácteos como la crema de mantequilla y los productos congelados (Van Haesendonck y Vanzeveren, 2004). El bioemsulsionante de *Candida utilis* se usa en aderezos para ensaladas y está demostrando ser muy útil para modificaciones de textura innovadoras. Liposa, un bioemulsionante,que tiene buenas propiedades de emulsificación se puede utilizar con éxito para la emulsificación de aceites comestibles comercialmente (Shepherd y col., 1995). La mayoría de los bioemulsionantes, particularmente los de alto peso molecular, exhiben un comportamiento estabilizador superior al de la carboximetilcelulosa y al ácido arábigo. Las alteraciones excelentes se descartan debido a la adición de BS/BE en los alimentos (Marchant y Banat 2012). El bioemulsionanteproducido por*Enterobacter cloaceae* funciona en la capacidad de potenciador de la viscosidad, lo que permite su uso en productos que contienen ácidos de bajo pH como el ácido ascórbico y el ácido cítrico (Iyer y col., 2006). Aunque varios informes tratan sobre la producción de los biosurfactantes/bioemulsionantes, no hay mucha información de estas biomoléculas para productos alimenticios a escala comercial (Satpute y col., 2018).

Para finalizar, existen aplicaciones bien establecidas para los BS/BE microbianos en una variedad de formulaciones de alimentos, aderezos y procesamiento de alimentos. Además de las propiedades tensioactivas y/o emulsionantes, otras como antiadhesivo, antimicrobiano y antibiofilm han despertado aún más el interés por las moléculas de BS/BE. La Tabla I.4 resume diferentes BS/BE que exhiben actividades potenciales contra patógenos. Es importante resaltar que BS/BE representa una nueva generación de aditivos alimentarios, así como de agentes antiadhesivos.

La producción de biopelículas microbianas a través de la secreción de polisacáridos extracelulares (EPS) conduce al deterioro severo de los alimentos (Sharma y Malik, 2012). Por lo tanto, los procedimientos defensivos son importantes para reducir la adherencia y el establecimiento de patógenos en y sobre las superficies de los alimentos. Los BS/BE desempeñan un papel interesante para impedir la formación de biopelículasmicrobianas dañinos en materiales alimentarios. Por lo tanto, la colonización

microbiana se ha evitado y/o eliminado con éxito mediante la aplicación de varios tipos de BS/BE.

Tabla I.4 Biosurfactante/bioemulsionantes con potencial actividad contra diferentes patógenos.

BS/BE	Actividad Potencial	Cepas indicadoras	Referencia
Ramnolípido	Inhibir la germinación de esporas y el crecimiento miceliar Protección de vinos	*Botrytis cinérea*	Varnier y col., 2009
Ramnolípido	Actividad antifúngica	*Botrytis* sp, *Rhizoctonia* sp, *Phytium* sp, *Phytophtora* sp, *Plasmopara* sp	Vatsa y col., 2010
Ramnolípido	Actividad antimicrobiana	*Candida albicans*, *S. aureus*	Manivasagan y col., 2011
Surfactina y ramnolíipido	Remover biofilm Modificar propiedades de superficie	*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis*	Gomes y Nitschke, 2012
Glicolípido *Streptomyces*	Actividad antimicrobiana	*B. megaterium*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. shigalla*, *S. dysenteriae*, *S. boydii*, *C. albicans*, *A. niger*	Haba y col., 2014
Glicolípido *Brachybacterium paraconglomeratum* (actino marino)	Actividad antimicrobiana	*S. aureus*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *K. pnumoniea*, *Mi. Luteus*, *S. epidermis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis*	Kiran y col., 2014
Ramnolípido	Actividad antimicrobiana	Inhibe bacterias Gram negativas y positivas; levaduras	Al-Asady y col., 2016
Ramnolípido	Aumentar la vida útil de frutas	Inhibe el crecimiento de bacterias, mohos y hongos	Dilarri y col., 2016
***Bacillus licheniformis* VS16**	Actividad antibacteriana Inhibir formación de biofilm Remover cadmio (Cd) de vegetales	*Brevibacterium casei*, *Nocardiopsis*, *Vibrio alginolyticus*	Giri y col., 2017

El preacondicionamiento de superficies inanimadas con BS populares como surfactina y RHL previene con éxito la adhesión de bacterias patógenas y que dañan los

alimentos. Ambos tipos de BS interrumpen eficazmente las biopelículas preformadas (Gomes y Nitschke, 2012). Se ha demostrado que RHL y la surfactina inhiben la adhesión de *L. monocytogenes* en superficies de poliestireno. Así comoel papel eficaz de la surfactina en la reducción de la adhesión de *L. monocytogenes* en acero inoxidable y polipropileno (Nitschke y col., 2009).

Objetivos

Objetivo General

Evaluación de la producción de compuestos de interés biotecnológico como bacteriocinas, y/o biosurfactantes/bioemulsificantes por bacterias lácticas (BL) para su posible empleo en procesos de biopreservación de productos alimenticios.

Objetivos Específicos

1. Seleccionar cepas de BL productoras de bacteriocinas y/o biosurfactantes/bioemulsionantes que presenten cualidades de producción que pudieran resultar interesantes desde el punto de vista biotecnológico.

2. Optimizar la producción de bacteriocinas y/o biosurfactantes/bioemulsificantes empleando diferentes medios incluyendo MRS, LAPTg, medios económicos y/o residuos agroindustriales de gran disponibilidad en la provincia de Tucumán.

3. Caracterizar y purificar a las bacteriocinas y los biosurfactantes/bioemulsificantes producidos por cepas seleccionadas.

4. Evaluar la capacidad inhibitoria y los posibles efectos sinérgicos de las BL seleccionadas y/o de los productos de interés biotecnológico sobre patógenos o deteriorantes de alimentos.

Capítulo I

1.1 Introducción

El medio marino es un reservorio excepcional, con unagran variedad de organismos con potencial para producirdiversos productos naturales bioactivoscomo antibacterianos, antifúngicos, antivirales, entre otros (Parada y col., 2017).El ambientemarino patagónico presenta una gran extensión,alta productividad biológicay biodiversidad de macro y microorganismos, ofreciendo un hábitat con características físicoquímicas y biológicas propias que, permite el aislamiento de BL con propiedades fisiológicas particulares (Marguet y col., 2011).

En la actualidad, tanto el interés académico como industrial seconcentra en microorganismos, en parte debido al crecientenúmero de metabolitos biológicamente activos reportados enbacterias marinas, específicamente en BL (Desriac y col., 2010). A pesar depresentar un gran potencial para aplicaciones biotecnológicas,los microorganismos que habitan estos ecosistemas permanecenmayormente inexplorados y sus propiedades aún no explotadas (Dionisi y col., 2012).

Dentro de las BL, como se mencionó anteriormente se encuentra el género *Enterococcus*, estos microorganismos han sido eliminados de la lista GRAS de la FAO porque están asociados con enfermedades transmitidas por los alimentos (Khan y col., 2010), pero un punto importante es que algunas cepas de *Enterococcus* no tienen factores de virulencia y pueden ser BL adecuadas para ser aplicadas en la conservación de alimentos. (Franz y col., 2003; Giraffa, 2003; Schelegueda y col., 2016). Antes de utilizar enterococos en los alimentos, se debe evaluar cuidadosamente su seguridad, así como sus características funcionales y beneficiosas. Las cepas deben caracterizarse fenotípica y genotípicamente y deben estar libres de cualquier factor de patogenicidad y virulencia (Ben Braïek y Smaoui, 2019).

Las cepas de BL más comunes en pescados y mariscos son *L. brevis* LAP2, *L. plantarum* y *E. faecium* HL7 (Verso y col., 2018). Se ha demostrado que las cepas de BL en peces y camarones muestran actividad antibacteriana contra patógenos transmitidos por los alimentos y otras bacterias. (Gómez-Sala y col., 2015). *Aeromonas hydrophila*,es un patógeno común de los peces de agua dulce,que podría ser significativamente inhibido por la actividad probiótica de bacterias productoras de bacteriocinas en el intestino de los peces(Vijayabaskar y Somasundaram, 2008) En un estudio, las BL aisladas del intestino de un pez llamado *Mugil cephalus* mostraron una función inhibitoria contra los peces e incluso contra los patógenos humanos (Hatha y col., 2014).

En el presente capítulo se describe la caracterización parcial de sustancias antimicrobiana tipo bacteriocina de cepas de BL, aisladas deinvertebrados marinos de la provincia del Chubut (Patagonia-Argentina), productoras de bacteriocinas y

bioemulsionantes.Además, se evaluaron las propiedades tecnológicas de 4 cepas de *E. mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 para su posible empleo en aplicaciones que requieran administración de bacterias vivas por vía oral.

1.2. Materiales y Métodos

1.2.1. Selección de BL productoras de compuestos de interés biotecnológico

Se trabajó con 60 cepas pertenecientes al cepario de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia (Trelew, Chubut, Argentina). Las mismas fueron aisladas de agua de mar, sedimentos, invertebrados y contenido intestinal de peces de medio marino provenientes de las provincias del Chubut y Santa Cruz (comarcas VIRCH-Valdes y Río Senguer-Golfo San Jorge) (Anexo). Se ha establecido su género y especie a través de pruebas fenotípicas y genotípicas (secuenciación del gen 16S ARNr), y ausencia de factores de virulencia y resistencia a antibióticos (Schelegueda y col., 2015; Parada y col., 2017).

1.2.1.1. Determinación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de cultivos

Se evaluó la actividad antimicrobiana usando como cepa indicadora a *Listeria monocytogenes* Scott A (Sharma y Saharan, 2014) de acuerdo con la metodología descripta por Farías y col. (1994). En placas de Petri con medio BHI (Difco, Le Pont de Claix, France) agar (1,5%, p/v) solidificado se le adicionó una sobrecapa (7mL) de BHI agar blando (0,75 %, p/v) con 30 µL de un cultivo *overnight* (18 h) de la cepa indicadora (10^6 UFC/mL). Una vez solidificado se sembraron 10 µL del sobrenadante libre de células (SLC) de las 60 cepas. Las placas se incubaron a 30°C por 24 h. Por último, se detectó la actividad antimicrobiana por la presencia de zonas de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de la zona de siembra.

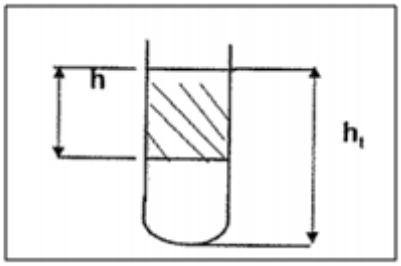
1.2.1.2. Detección de Actividad emulsionante

Las 60 cepas fueron probadas como posibles microorganismos productores de bioemulsionante (BE). Para ello, se inocularon 100 µL de una suspensión acuosa de cada una en Erlenmeyer que contenían 10 mL de medio LAPTg líquido compuesto de la siguiente manera (en g/L): glucosa, 10,0; extracto de levadura, 10,0; peptona, 15,0 y triptona, 10,0; pH inicial de 6,5. Después de la incubación a 25, 30 y 37 °C durante 24 h en condiciones estáticas, los sobrenadantes recolectados por centrifugación (5702*g* a 4 °C durante 10 min) se usaron para medir el índice de emulsificación (IE_{24}), según Cooper y

Goldenberg (1987). Volúmenes iguales de cada sobrenadante y un hidrocarburo (queroseno) se agitaron, empleando un Ultra-turrax (IKA, Modelo T18, Staufen, Alemania) a 10.000 rpm por 2 min. La emulsión se dejó reposar durante 24 h; luego, se calculó el IE_{24} (Fig. 1.1) como el porcentaje de la altura de la capa emulsionada (mm) dividido por la altura total de la columna de líquido (mm), utilizando una escala milimétrica. El microorganismo cuyo sobrenadante mostró el IE_{24} más alto se seleccionó para ensayos adicionales.

Figura 1.1. Esquema para calcular el Índice de Emulsificación a las 24 h (IE_{24}). Donde h_t: altura total del líquido (mm) y h: altura de la emulsión (mm)

$$IE_{24} = (h/ht)*100$$



La estabilidad de la emulsión (S) se estimó midiendo nuevamente la altura de la capa emulsionada después de dejarla reposar durante 7 días a temperatura ambiente (28 ± 2 °C), y se expresó como porcentaje relativo al IE_{24}.

1.2.2. Determinación del principio activo causante de la actividad inhibitoria y caracterización de la actividad. Detección de ácidos orgánicos y proteínas de alto peso molecular

Los sobrenadantes libres de células (SLC) fueron separados en 3 fracciones, la primera no fue sometida a ningún tratamiento y se denominó crudo, la segunda fue neutralizada, ajustando el pH a un valor de 6,5 con NaOH 0,5 N, para eliminar la posible actividad bactericida o bacteriostática de los ácidos orgánicos y la tercera además de ser neutralizada fue calentada a 100 °C por 5 min, para inhibir la posible actividad antimicrobiana de proteínas de altoPM. Luego, los preparados anteriores, fueron ensayados mediante la metodología descripta en la sección 1.2.1.1.

1.2.2.1. Detección de peróxido de hidrógeno

La prueba de sensibilidad a la catalasa permite descartar que la inhibición observada en los SLC se deba a la producción de peróxido de hidrógeno. El ensayo se realizó en medio líquido MRS: a un SLC con actividad inhibitoria se le agregó catalasa hasta

una concentración de 2 mg/mL. Se incubó a 37 °C durante 1 h y a continuación se determinó la actividad residual mediante la metodología descripta en la sección 1.2.1.1.

1.2.2.2. Sensibilidad a la acción de enzimas hidrolíticas

Para evaluar la naturaleza química del compuesto inhibidor, se analizó la sensibilidad de los SLC a las enzimas hidrolíticas (tripsina, proteinasa K y lipasa,concentración final de 1 mg/ml,Sigma Aldrich, EE. UU.) y los ensayos se llevaron a cabo al pH y la temperatura recomendados por el proveedor (Sigma Aldrich, EE. UU.). El SLC se incubó en soluciones enzimáticas durante 2 h a 37 °C y la actividad remanente se determinó mediante la metodología descripta en la sección 1.2.1.1. Las soluciones enzimáticas solas y una alícuota de SLC sin tratar se usaron como controles negativo y positivo, respectivamente.

1.2.3. Evaluación de las propiedades tecnológicas*in vitro* de las cepas de *Enterococcus* seleccionadas

✓ **Resistencia a pH ácido.** Se centrifugaron 2 mL de cultivos *overnight*(18 h)de los microorganismos seleccionados (5702 *g* durante 10 min) y el pellet obtenido se re suspendió en 2 mL de medio MRSlíquido (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) previamente ajustado con HCl a diferentes pH (1,5; 2; 2,5 y 3). Se incubaron a 37 °C por 3 h y se realizó el recuento de UFC/mL al inicio y final de la incubación (Noor Nawaz y col., 2017).

✓ **Resistencia a sales biliares.** Los aislados seleccionados fueron estriados sobre placas de Petri conteniendo medio MRS sólido (1,5 % p/v de agar) adicionado de 3 g/L de sales biliares (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) e incubadas a 37 °C por 24 h según lo descripto por Carvalho y col. (2009a). Luego de la incubación, se observó si hubo crecimiento o no de los aislamientos, empleando como control positivo el crecimiento observado en placas de Petri conteniendo medio MRS sólido.

1.2.3.1. Evaluación de la resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal (TGI) *in vitro*

Para evaluar la resistencia a condiciones del tracto gastrointestinal (TGI), las cepas seleccionadas*Enterococcus mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807fueron cultivadas en 25 mL de medio MRS líquido a 37 °C por 18 h. Luego del período de incubación, fueron centrifugadas a 5702 *g*durante 10 min, y el pellet fue lavado tres vecescon solución estéril de NaCl (5 g/L) y re suspendido en la misma solución (Fig. 2).

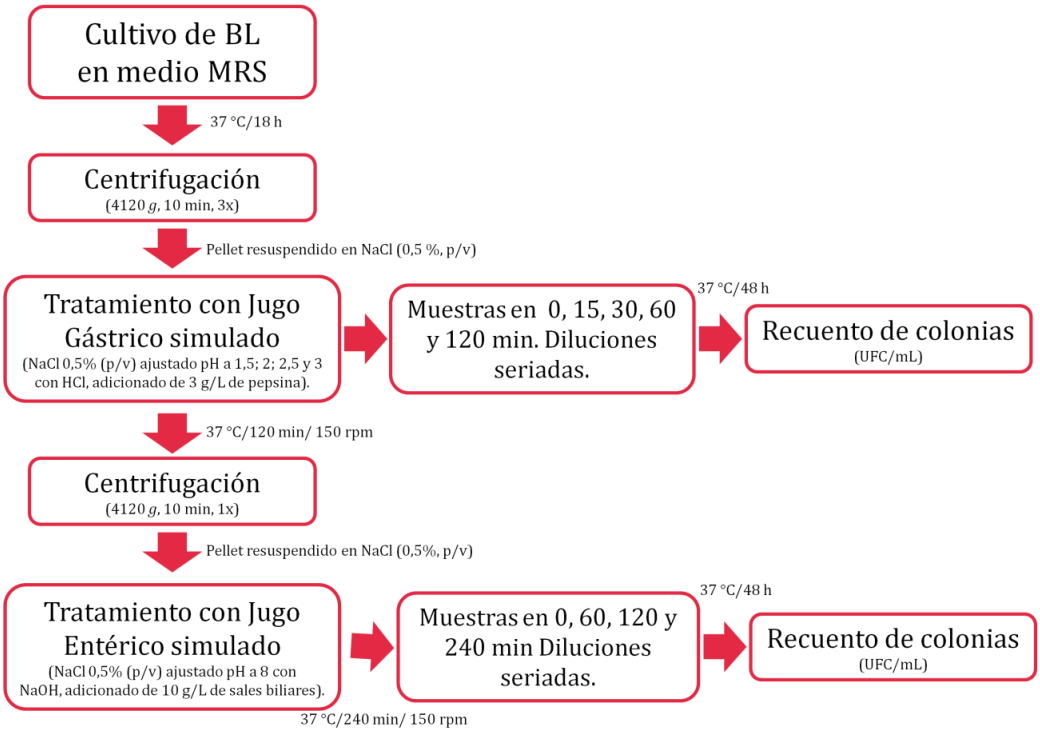
✓ Composición del jugo gástrico simulado (JGS): solución estéril de NaCl (5 g/L) con pH ajustado para 1,5; 2; 2,5 y 3 (con HCl), y adicionado con 3 g/L de pepsina (Biopack, Bs. As., Argentina).

✓ Composición del jugo entérico simulado (JES): solución estéril de NaCl (5g/L) con pH ajustado para 8 (con NaOH 0,1M), adicionado con 10 g/L de sales biliares.

El procedimiento para evaluar la resistencia de las cepas de *Enterococcus*a los JGS y JES fue el descripto por Carvalho y col. (2009b). Alícuotas de 2 mL de la cepa resuspendidas en NaCl (5 g/L), fueron transferidas a frascos conteniendo 13 mL de JGS con los diferentes valores de pH (Fig. 2). Los frascos inoculados fueron incubados a 37 °C por 120 min, con agitación (150 rpm) y se retiraron muestras en 0, 15, 30, 60 y 120 min. Se realizaron diluciones decimales seriadas en agua peptonada 0,1 % (p/v) y el recuento de UFC/mL se realizó después de 48 h de incubación a 37 °C.

Después del tratamiento con JGS, los cultivos fueron centrifugados a 5702 *g*durante 10 min, las células se resuspendieron en 2 mL de solución estéril de NaCl (5 g/L) y transferidos a tubos conteniendo 13 mL de JES (Fig. 2). Se incubaron a 37 °C por 24 h con agitación (150 rpm). Se retiraron muestras en 0, 1, 2, 4 y 24 h. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas para recuento de UFC/mL a 37 °C y 48 h de incubación.Se realizaron tres ensayos independientes y los resultados se expresaron como la media de los recuentos expresados como log UFC/mL.

Figura 1.2. Esquema de la evaluación de la sobrevida de las cepas de *Enterococcus mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 a las condiciones de un tracto gastrointestinal (TGI) *in vitro*.



1.2.3.2. Evaluación de la sobrevida de las cepas de *E. mundtii*, resuspendidas en leche, a las condiciones de un TGI *in vitro*

Un cultivo *overnight* (18 h) de las cepasde *E. mundtii*Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807, se centrifugaron a 5702 *g* durante 10 min y el pellet se lavó (3 veces) con una solución estéril de NaCl (5 g/L) y se re suspendió en una solución estéril de leche en polvo (10 % p/v). A partir de esta suspensión celular, se repitió el modelo *in vitro* semi dinámico, descripto en la sección 1.2.3.1. En el tratamiento con JGS, se tomaron muestras a los 0, 60 y 120 min. Se realizaron tres ensayos independientes y los resultados se expresaron como la media de los recuentos expresados como log UFC/mL.

1.3. Resultados y Discusión

1.3.1. Selección de BL productoras de compuestos de interés biotecnológico

En una primera etapa se seleccionaron tres cepas que producían halos de inhibición mayores de 20 mm de diámetro frente a *L. innocua* 6a y *L. monocytogenes* Scott A, las mismas son *E. mundtii* Tw56, *E. mundtii* Tw802 y *E. mundtii* Tw807, para evaluar sus propiedades tecnológicas y caracterizar el compuesto antimicrobiano.

Por otro lado, de las 60 cepas probadas, se seleccionó a *E. mundtii* Tw278, ya que mostró la mejor capacidad emulsionante sobre queroseno cuando se cultivó en medio LAPTg (sin Tween 80) a 25 °C por 24 h, sin detectarse la actividad emulsionante en las otras temperaturas evaluadas. Bajo tales condiciones, los valores de IE_{24} y S fueron 49 % y 90 %, respectivamente. El SLC de *E. mundtii* Tw278 presentó actividad antimicrobiana frente a las cepas indicadores, por lo que fue seleccionada para caracterizar sus compuestos, así como la producción simultanea de los mismos.

Cuando consideramos el BS/BE de origen microbiano; el escenario de literatura global disponible refleja la gran diversidad, con respecto a la estructura, composición y propiedades. Esta amplia diversidad entre BS/BE, por lo tanto, ofrece enormes aplicaciones no solo en la industria alimentaria (Kralova y Sjöblom, 2009; Mnif y Ghribi, 2016; Sharma y col., 2016) sino también en biorremediación (Satpute y col., 2005; Sáenz-Marta y col., 2015), agrícola (Sachdev y Cameotra, 2013), médico (Rodrigues y col., 2006a; Santos y col., 2016), cosmético y farmacéutico (Fracchia y col., 2010).

1.3.2. Determinación del principio activo causante de la actividad antimicrobiana

La actividad antagónica contra las cepas de *Listeria* de los SLC de 4 cepas de *E. mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807, no sufrió alteraciones cuando se neutralizaron con NaOH, ni cuando fueron calentados a 100 °C por 5 min. Este experimento demuestra que la

inhibición del crecimiento no fue producida por efecto de los ácidos orgánicos generados por el metabolismo de las BL, ni por proteínas de alta masa molecular.

Algunas cepas de BL tienen la capacidad de producir peróxido de hidrógeno, molécula con gran capacidad antagonista que puede ejercer su acción sobre una gran variedad de microorganismos. Sin embargo, la capacidad inhibitoria de los SLC ensayados no se vio afectada luego del tratamiento enzimático con catalasa y en consecuencia es posible afirmar que no existe una relación entre ese fenómeno y la presencia del metabolito.

En la determinación de la naturaleza proteica de los compuestos antimicrobianos secretados por las cepas de *E. mundtii* seleccionadas, las enzimas tripsina y proteinasa K inactivaron totalmente la actividad antimicrobiana de los SLC de las mismas. Los controles positivos de actividad antimicrobiana (SLC sin enzimas) mostraron actividad en todos los casos.

La actividad enzimática de lipasa no alteró la actividad antilisteria de los sobrenadantes, lo que permite descartar la existencia de lípidos o azúcares involucrados con la actividad del principio activo. La sensibilidad de las bacteriocinas a diferentes enzimas se utiliza para la identificación de cultivos potenciales en el control de patógenos transmitidos por alimentos, como se observa en la literatura (Barbosa y col., 2014, Carvalho y col., 2018; Delcarlo y col. 2019). Las cepas de *E.mundtii* seleccionadas en este trabajo fueron descriptas como productoras de bacteriocina o sustancia similar a la bacteriocina y su posible aplicabilidad como bioconservantes en la industria alimentaria.

1.3.3. Evaluación de las propiedades tecnológicas *in vitro* de las cepas de *Enterococcus* seleccionadas

*E. mundtii*Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 fueron capaces de crecer en medio MRS sólidoadicionado con sales biliares (3 g/L) (Fig. 1.3). Por otro lado, Los resultados indican que las cepas son resistentes a pH ácidos, sólo *E. mundtii* Tw278 no es detectada luego de 3 h de incubación a 37 °C en medio MRS líquido con pH ajustado a 1,5 y 2 (Figura 1.4).

Los resultados están de acuerdo con otros autores. Mishera y Prasad (2005) informaron que 3 de 7 cepas de *Lactobacillus* sp. toleran un pH de 3. Kimoto-Nira y col. (2010) determinaron que la cepa *Lactococcus lactis* G50 tolera y sobrevive a pH 2,5 por 90 min y bilis, pero la resistencia a la bilis varía con la fuente de carbono. Noor Nawaz y col. (2017) confirmaron que 25 aislados de BL mostraron buena tolerancia a condiciones ácidas (pH 3, 4 y 5), así como buena supervivencia en presencia de bilis (0,3 % p/v). Ben Braïek y col. (2018) informaron que de las cepas de *Enterococcus* aisladas de camarón

crudo encontraron que una cepa *E. lactis* C43 es resistente a la bilis, 2 cepas *E. lactis* CQ y 4VD son tolerantes, mientras que las demás fueron sensibles a ella.

Figura 1.3 Evaluación del crecimiento de las cepas de *Enterococcus mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 en medio MRS sólido adicionado de sales biliares (3 g/L) a 37 °C por 24 h.

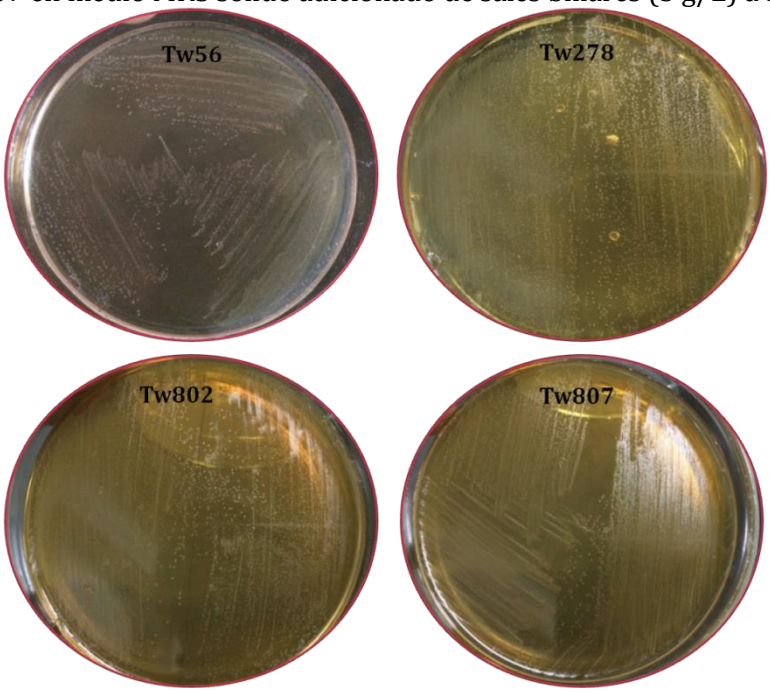
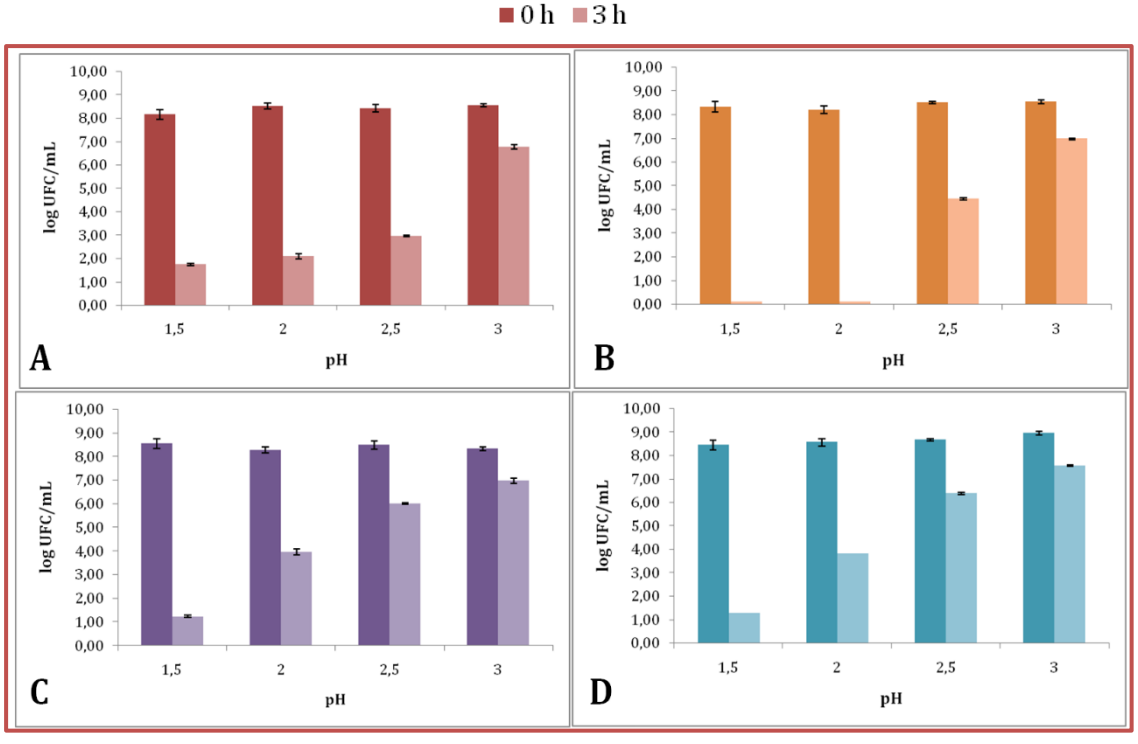


Figura 1.4 Evaluación de la sobrevida de las cepas *Enterococcus mundtii* Tw56(A), Tw278(B), Tw802(C) y Tw807(D) en medio MRS líquido con pH ajustado a 1,5; 2; 2,5 y 3, a 37 °C por 3 h.

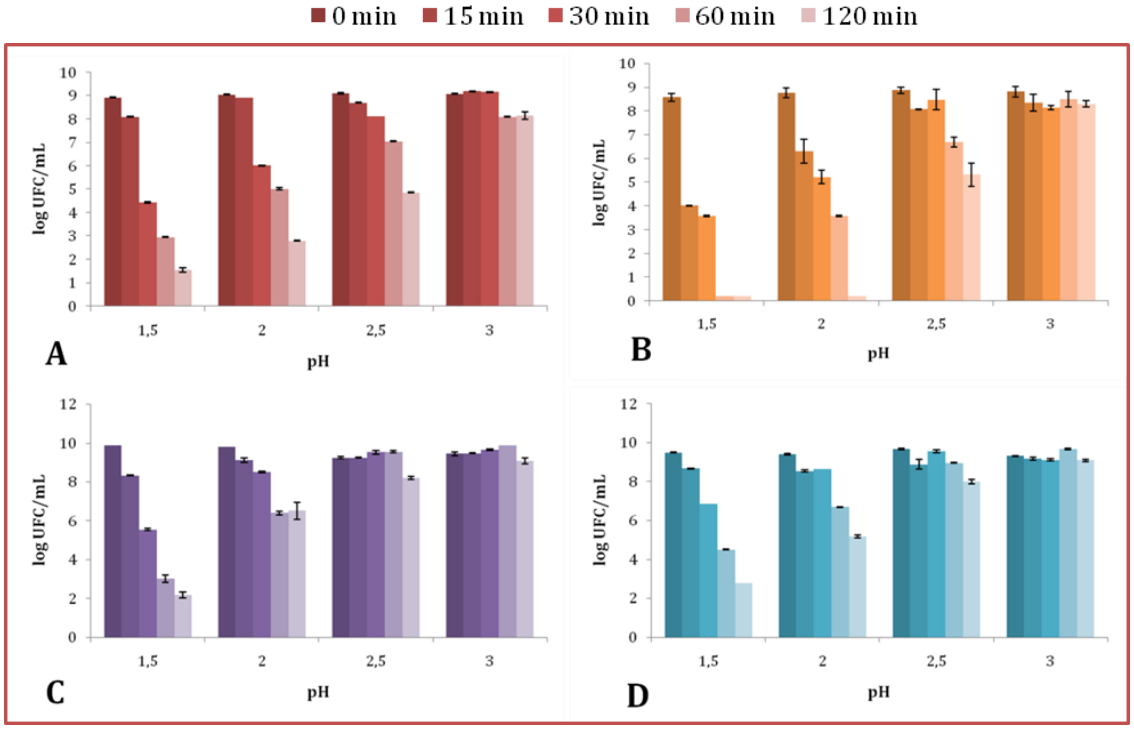


1.3.3.1. Evaluación de la resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal (TGI) *in vitro*

Las cepas de *E. mundtii* Tw56, Tw802 y Tw807 permanecieron viables después de ser expuestas durante 120 min al JGS, en las 4 condiciones probadas (Fig. 1.5A, C, D). El tratamiento con JGS ajustado a pH 1,5 produjo una reducción de 7 unidades logarítmicas de las UFC/mL a los 120 min para las cepas de *Enterococcus*. En el tratamiento con JGS a pH 2 y 2,5 luego de 120 min de exposición, el recuento de viables de *E. mundtii* Tw56 disminuye 6,26 y 4,24 unidades de log UFC/mL, respectivamente; el de *E. mundtii* Tw802 3,2 y 1,05 unidades y finalmente el de *E. mundtii* Tw807 4,25 y 1,68. El efecto sobre la viabilidad fue casi imperceptible a pH 3, menos de una unidad logarítmica para todas las cepas.

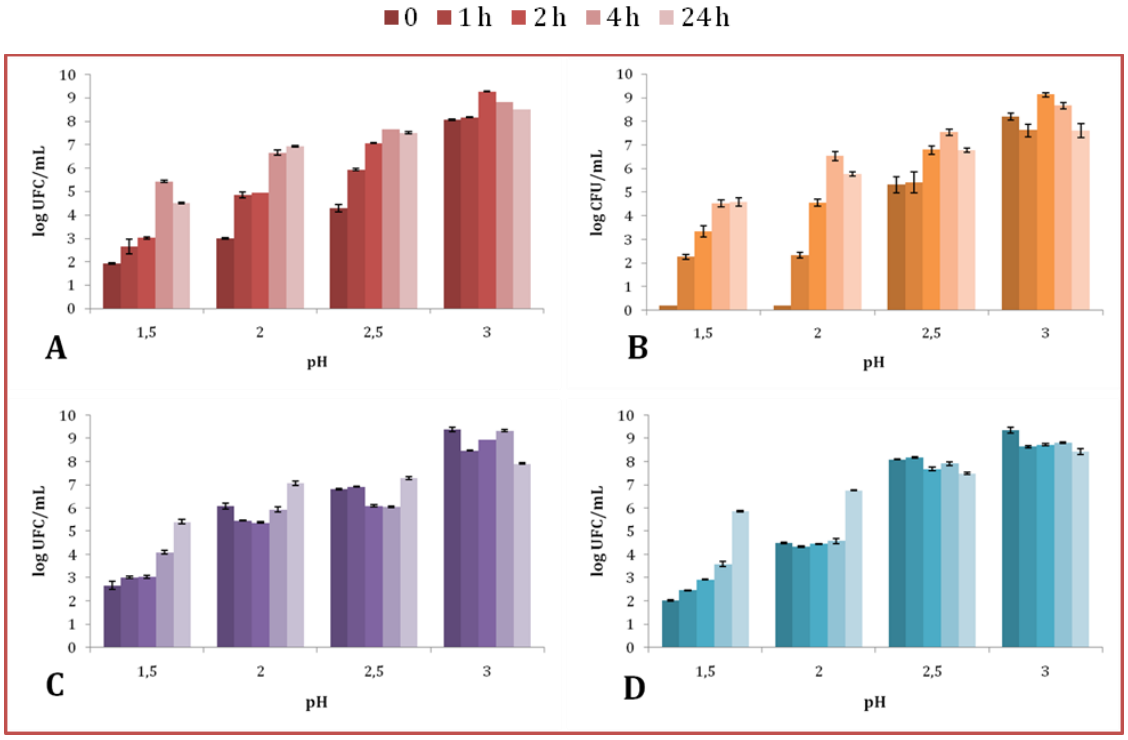
Cuando la cepa *E. mundtii* Tw278 se sometió a JGS (Fig. 1.5B) a pH 1,5, se observó una rápida disminución en el recuento de viables, hasta que no se detectó a los 60 min de incubación. A pH 2 ocurre algo similar hasta que no se detecta a los 120 min. Mientras que a pH 2,5 se observa una disminución de 3,56 unidades log UFC/mL al final de la incubación y a pH 3 es menor a 1 unidad log UFC/mL.

Figura 1.5 Recuento de *Enterococcus mundtii* Tw56(A), Tw278(B), Tw802(C) y Tw807(D) (log UFC/mL) después del tratamiento con jugo gástrico simulado con diferentes valores de pH por 120 min.



El efecto del ambiente ácido sobre las cepas seleccionadas de *E. mundtii* Tw56, Tw278 Tw802 y Tw807 depende del pH y del tiempo, y el paso de las condiciones gástricas al ambiente entérico aumentó el número de células viables (Fig. 1.6A, B, C, D), como lo observaron otros autores (Carvalho y col., 2009b; Ben Braïek y col., 2018; Guzmán Ortiz, 2021). Cabe señalar que las cepas seleccionadas seguían siendo viables incluso después de 24 h sin recibir ningún nutriente adicional, lo que demuestra su posibilidad de recuperación en el TGI y su potencial aplicación en alimentos funcionales.

Figura 1.6 Recuento de *Enterococcus mundtii* Tw56(A), Tw278(B), Tw802(C) y Tw807(C) (log UFC/mL) después del tratamiento con jugo gástrico simulado con diferentes valores de pH por 120 min, seguido del tratamiento con jugo entérico simulado con pH 8 por 24 h.



La producción de bacteriocina es una característica de las BL, ya que estos compuestos reducen las bacterias patógenas del TGI (Todorov y col., 2017). Varios estudios demostraron que *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* pueden sobrevivir con altas concentraciones de bilis de buey y bajo pH (Pinto y col., 2006; Mathara y col., 2008; Todorov & Dicks, 2008; Todorov y col., 2008; Carvalho y col., 2009b; Pan y col., 2009). Debido a estas características observadas en las bacteriocinas, su uso podría aumentar la vida útil y la seguridad de los alimentos funcionales.

Hay resultados similares en la literatura para otras cepas. Carvalho y col. (2009b) evaluaron la resistencia de las cepas *Lactobacillus casei* Shirota (Yakult) y *Lactobacillus casei* LC01 (Ch. Hansen) a pH ácido y observaron que esta resistencia es mayor cuanto

mayor es el pH. Los autores observaron que después del tratamiento con JES, volvieron a tener microorganismos cultivables después de 4 a 24 h. Braïek y col. (2018) observaron que las cepas *Enterococcus lactis* CQ y C43, aisladas de camarones crudos, presentaron una alta capacidad de tolerancia al tránsito gastrointestinal superior. Žugić Perović y col. (2020) observaron que 21 cepas de *Enterococcus faecium*, aisladas de salchichas fermentadas espontáneamente, mostraron un alto nivel de tolerancia a las condiciones ácidas de un TGI simulado. Fugaban y col. (2021) no observaron una disminución significativa en el número de cultivos viables de las cepas ST651ea, ST7119ea y ST7319ea de *Enterococcus faecium* después de someterlas a un TGI *in vitro*. Guzmán Ortiz (2021) observó que las bacterias aisladas de Kombucha (3 *L. mesenteroides*, 1*W. viridiscens* y 2 *S. hominis*) sometidas a las condiciones de un TGI *in vitro*, las cepas de *S. hominis*no son detectables luego de la fase gástrica (pH 3) ni en la fase intestinal (pH 7), mientras que las cepas de BL presentaron una sobrevivencia mayor al 80 % de su viabilidad inicial luego de ambos tratamientos.

Observaciones similares fueron reportadas por Amaral y col. (2017) indicando la alta tolerancia de los enterococos a las condiciones del tracto gastrointestinal, incluso en presencia de enzimas activas clave como se demostró *in vitro*. Además, la evaluación *in vitro* de la capacidad de supervivencia en condiciones gastrointestinales solo proporciona una predicción de cómo funcionan estas cepas en el sistema huésped, por lo que se deben realizar pruebas *in vivo* para confirmar la viabilidad de estas cepas en condiciones prácticas.

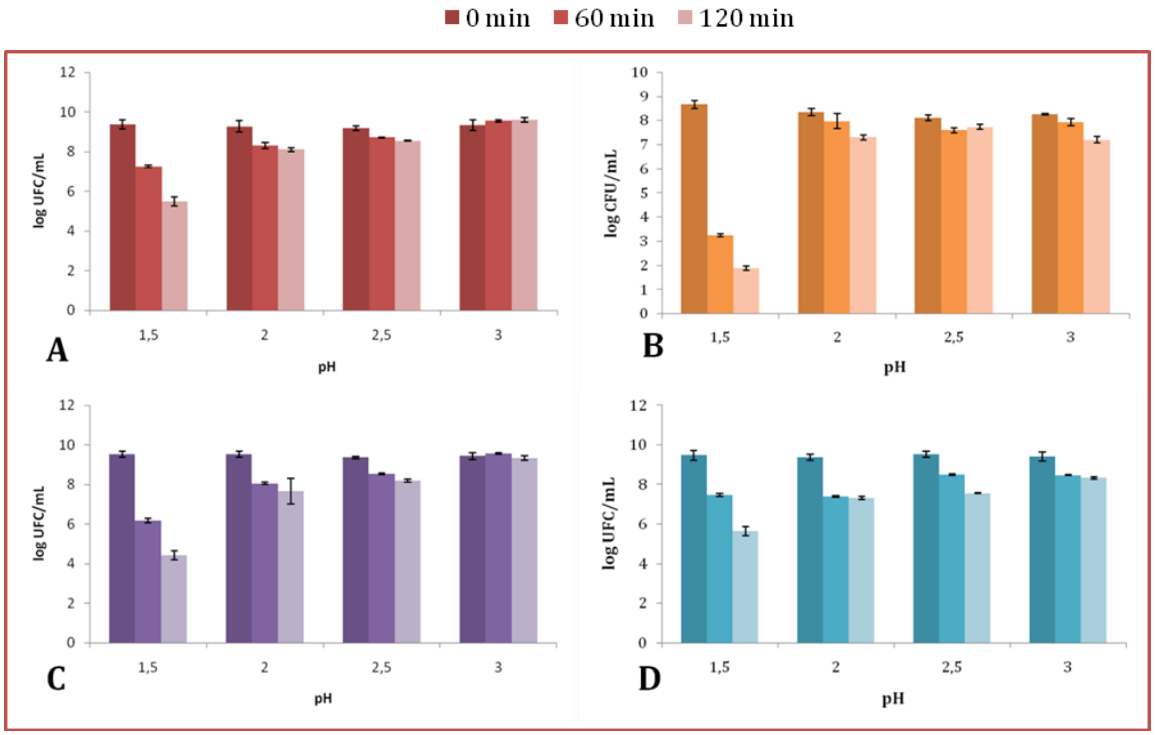
1.3.3.2. Evaluación de la sobrevida de las cepas de *E. mundtii*, resuspendidas en leche, a las condiciones de un TGI *in vitro*

Los enterococos son conocidos como iniciadores en la fermentación de alimentos o cultivos protectores, debido a sus características biotecnológicas (actividades proteolíticas y producción de enterocina). Los cultivos sometidos a las condiciones de un TGI pueden verse afectados por la exposición al pH y el tiempo de exposición y las sales biliares en los fluidos intestinales (Charteris y col., 1998; Kos y col., 2000). Cuando el pH del estómago es muy bajo (pH < 2,0) debido a una mala ingesta de alimentos, las bacterias benéficas pueden destruirse y no se producirán los efectos beneficiosos esperados, entonces las bacterias benéficas deben ingerirse con alimentos que contengan componentes con capacidad amortiguadora. Es por ello que se evaluó, la capacidad amortiguadora de la leche para aumentar la sobrevida de las cepas seleccionadas en un TGI *in vitro*.

Los resultados obtenidos demostraron el efecto protector de la leche sobre todo cuando el pH del JGS fue de 1,5 o 2. La mayor disminución en el recuento de viables se

observa en el cultivo del tratamiento a pH 1,5 (Fig. 1.7A, B, C, D), sin embargo, la misma es significativamente ($p<0,05$) menor que la observaba cuando las cepas fueron re suspendidas en NaCl (0,05 %, p/v), destacándose que la cepa *E. mundtii* Tw278 se detecta viable durante los 120 min de tratamiento en JGS (Tabla 1.1).

Figura 1.7 Recuento de *Enterococcus mundtii* Tw56(A), Tw278(B), Tw802(C) y Tw807(D) (log UFC/mL), resuspendidas en leche, después del tratamiento con jugo gástrico simulado con diferentes valores de pH por 120 min.



Nuevamente, se observa que la transferencia a JES dio como resultado la reversión parcial del efecto dañino del JGS para cultivos de pH 1,5. Carvalho y col. (2009b) también observaron que la intensidad de la protección de la leche para los cultivos de *L. casei* Shirota y *L. casei* LC1 fue más evidente a pH 1,5 y 2. Amaral y col. (2017) reactivaron cepas de *Enterococcus durans* y *Enterococcus faecium*, aisladas de queso, en leche UHT para ser sometidas a las condiciones de un TGI simulado. Observaron que la pérdida de viabilidad ocurre en la fase gástrica, pero se recupera en la fase entérica para la mayoría de las cepas evaluadas.

Figura 1.8 Recuento de *Enterococcus mundtii* Tw56(A), Tw278(B), Tw802(C) y Tw807(C) (log UFC/mL), resuspendidas en leche, después del tratamiento con jugo gástrico simulado con diferentes valores de pH por 120 min, seguido del tratamiento con jugo entérico simulado con pH 8 por 24 h.

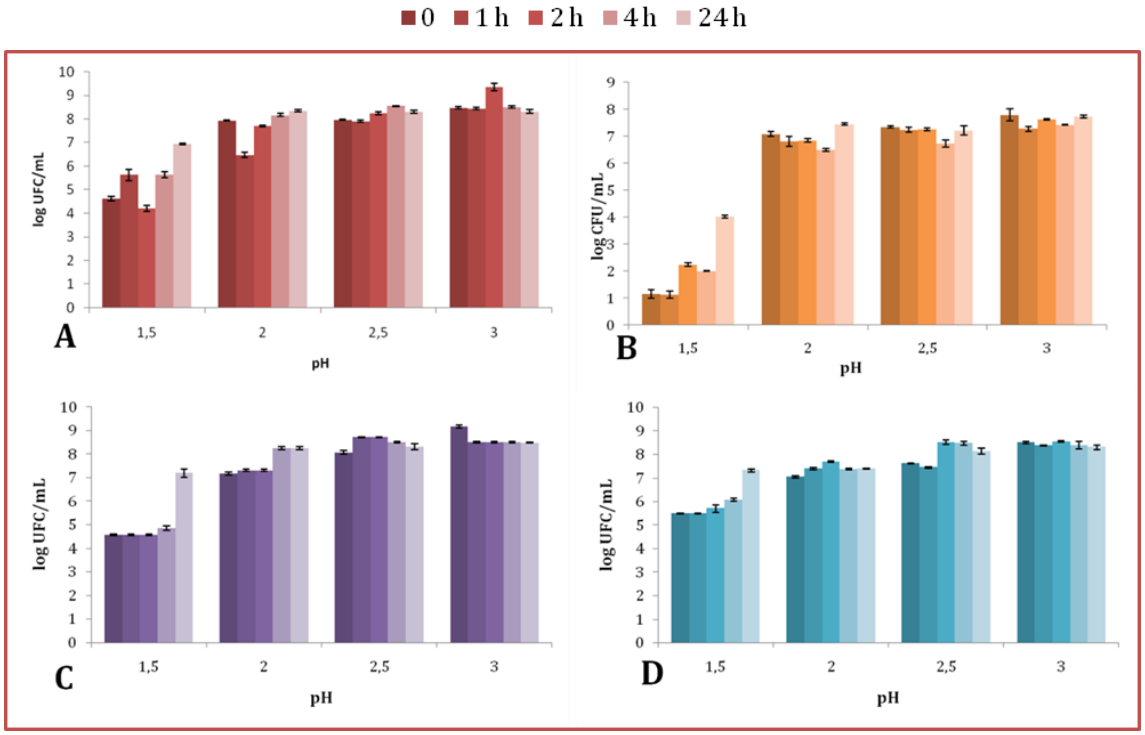


Tabla 1.1 Recuento de *Enterococcus mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807, resuspendidas o no en leche, después del tratamiento con jugo gástrico simulado con diferentes valores de pH por 120 min.

Medias de una misma fila y pH con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05).

Enterococcus mundtii	Tiempo (min)	pH							
		1,5		2		2,5		3	
		Sin leche	Con leche	Sin leche	Con leche	Sin leche	Con leche	Sin leche	Con leche
Tw56	0	8,93 ± 0,01^{a}	9,36 ± 0,23^{b}	9,05 ± 0,02^{a}	9,28 ± 0,28^{a}	9,10 ± 0,02^{a}	9,18 ± 0,13^{a}	9,09 ± 0,02^{a}	9,33 ± 0,26^{a}
	60	2,96 ± 0,02^{a}	7,25 ± 0,07^{b}	5,03 ± 0,04^{a}	8,32 ± 0,15^{b}	7,06 ± 0,02^{a}	8,71 ± 0,03^{b}	8,10 ± 0,02^{a}	9,55 ± 0,05^{b}
	120	1,56 ± 0,09^{a}	5,50 ± 0,23^{b}	1,56 ± 0,09^{a}	5,50 ± 0,23^{b}	4,87 ± 0,01^{a}	8,55 ± 0,03^{b}	8,16 ± 0,15^{a}	9,61 ± 0,12^{b}
Tw278	0	8,58 ± 0,17^{a}	8,66 ± 0,16^{a}	8,77 ± 0,20^{a}	8,35 ± 0,14^{b}	8,88 ± 0,14^{a}	8,11 ± 0,12^{b}	8,81 ± 0,23^{a}	8,26 ± 0,04^{b}
	60	< 10^{a}	3,25 ± 0,07^{b}	3,58 ± 0,04^{a}	7,97 ± 0,31^{b}	6,69 ± 0,21^{a}	7,59 ± 0,11^{b}	8,49 ± 0,33^{a}	7,94 ± 0,15^{a}
	120	< 10^{a}	1,89 ± 0,10^{b}	< 10^{a}	7,29 ± 0,10^{b}	5,32 ± 0,48^{a}	7,72 ± 0,11^{b}	8,30 ± 0,13^{a}	7,20 ± 0,12^{b}
Tw802	0	9,87 ± 0,01^{a}	9,53 ± 0,16^{b}	9,79 ± 0,01^{a}	9,53 ± 0,16^{b}	9,24 ± 0,06^{a}	9,37 ± 0,06^{a}	9,43 ± 0,08^{a}	9,44 ± 0,18^{a}
	60	3,01 ± 0,18^{a}	6,19 ± 0,11^{b}	6,38 ± 0,10^{a}	8,05 ± 0,06^{b}	9,54 ± 0,06^{a}	8,53 ± 0,05^{b}	9,85 ± 0,00^{a}	9,55 ± 0,04^{b}
	120	2,16 ± 0,15^{a}	4,42 ± 0,22^{b}	6,50 ± 0,45^{a}	7,66 ± 0,64^{a}	8,18 ± 0,07^{a}	8,20 ± 0,08^{a}	9,08 ± 0,14^{a}	9,34 ± 0,11^{a}
Tw807	0	9,50 ± 0,03^{a}	9,47 ± 0,24^{a}	9,42 ± 0,04^{a}	9,37 ± 0,16^{a}	9,68 ± 0,04^{a}	9,53 ± 0,15^{b}	9,32 ± 0,02^{a}	9,42 ± 0,24^{a}
	60	4,51 ± 0,03^{a}	7,46 ± 0,07^{b}	6,69 ± 0,01^{a}	7,38 ± 0,04^{b}	8,95 ± 0,04^{a}	8,49 ± 0,04^{b}	9,68 ± 0,03^{a}	8,49 ± 0,04^{b}
	120	2,78 ± 0,00^{a}	5,63 ± 0,23^{b}	5,18 ± 0,09^{a}	7,32 ± 0,06^{b}	8,00 ± 0,11^{a}	7,56 ± 0,02^{b}	9,09 ± 0,05^{a}	8,33 ± 0,05^{b}

1.4. Conclusiones Parciales

- Fueron seleccionadas 4 cepas de *Enterococcus mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 provenientes de la Patagonia (Argentina) productoras de sustancias antimicrobianas tipo bacteriocina, con gran capacidad antilisteria.
- *E. mundtii* Tw278 produceun compuesto con capacidad emulsionante.
- *E. mundtii* Tw56, Tw802 y Tw807 son viables en las condiciones de un TGI *in vitro*, incluso a pH de 1,5 y 2. Si bien, *E. mundtii* Tw278 no es detectable luego de 60 min, este efecto es revertido cuando el cultivo fue re suspendido en leche antes del tratamiento con JGS.
- Los resultados demuestran que *E. mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 podrían ser utilizados en aplicaciones biotecnológicas que requieran administración de las bacterias vivas por vía oral, aunque se requieren otros estudios acerca de su inocuidad.

Capítulo II

2.1. Introducción

Las tendencias actuales apuntan a reducir, reciclar, reutilizar y revalorizar desechos industriales con el propósito de minimizar los daños ambientales (Moldes y col., 2013). Actualmente, si observamos nuestros sistemas productivos vemos que aún se trabaja mediante el uso de recursos para transformarlos en nuevos productos y residuos, sin considerar el valor que tienen estos últimos. En términos de la industria, es crucial enfatizar que el uso de sustratos renovables ofrece una competencia inmensa con otros mercados (Satpute y col., 2017).

Aunque los bioemulsionantes y las bacteriocinas producidas por BL tienen múltiples ventajas, la comercialización de los mismos está restringida por el bajo rendimiento y el alto costo de producción, con materias primas que representan hasta el 30 % del costo total (Bali y col., 2016; Sabo y col., 2017). Por estas razones, la producción de estas biomoléculas a partir de materias primas de bajo costo podría contribuir a una mayor disponibilidad y competitividad de estas biomoléculas en el mercado (Banat y col., 2014; Colin y col., 2017; Rulli y col., 2019).

El uso rutinario de varios sustratos de desechos renovables y baratos de productos lácteos, destilería, agricultura, procesamiento de grasa animal, industria de procesamiento de alimentos, molinos de procesamiento de aceite, industria de procesamiento de frutas representa fuentes ricas en aceites, azúcares, minerales y vitaminas. A pesar de que estos hechos son ciertos, el bajo rendimiento de la producción de bioemulsionantes y bacteriocinas a escala comercial es una gran preocupación. Los altos insumos monetarios son indispensables para impulsar procesos de fermentación a gran escala. Hasta cierto punto, el uso de sustratos renovables ha brindado cierto alivio frente a los problemas relacionados con los costos (Banat y col., 2014).

Entre los diferentes productos lácteos, el suero de lechees el principal subproducto producido por la industria láctea, se obtiene después de la coagulación y la eliminación de la caseína durante la fabricación del queso (Brandelli y col., 2015).Durante muchos años, las industrias buscaron métodos de eliminación baratos, incluída la descarga en vías fluviales, sistemas del alcantarillado, océanos o campos, por lo cual, se volvió el residuo más contaminante de la industria láctea, debido tanto a su elevado contenido de materia orgánica como a la gran cantidad que se genera (Brandelli y col., 2015; Smithers, 2015). Cuando se vierte en la tierra, causa una grave contaminación en el medio ambiente circundante, afecta las características fisicoquímicas del suelo y, por lo tanto, reduce el rendimiento de los cultivos. Al ser vertido a cuerpos de agua reduce el nivel de oxígeno disuelto y dificulta la biodegradabilidad, lo que constituye un riesgo para la vida acuática (González-Siso, 1996).

Hoy en día, la eliminación de suero sin tratar en vías fluviales es ilegal en la mayoría de los países (Smithers, 2015); por lo tanto, se requiere un manejo adecuado de este subproducto antes de su descarga (Yadav y col., 2015). El tratamiento biológico de aguas residuales es el método más seguro para eliminar el suero, pero es muy costoso (Panesar y col., 2007).

El suero retiene más de la mitad (alrededor del 55 %) de los nutrientes totales de la leche (Panesar y col., 2007; Prazeres y col., 2012), convirtiéndolo en una alternativa económica y ventajosa como sustrato para producir compuestos de valor agregado por medios biológicos (Soba y col., 2019). La composición general del suero de leche es 75 % de lactosa, 12-14 % de proteínas solubles y 1-10 % de lípidos y sales minerales, que son esenciales para el crecimiento microbiano, especialmente para las BL (Panesar y col., 2007; Koutinas y col., 2009; Prazeres y col., 2012;Ramírez Navas, 2012).

Teniendo en cuenta los nutrientes presentes en el suero antes mencionados, este subproducto puede considerarse principalmente una fuente de carbono barata que puede reducir los costos asociados con el medio de cultivo de BL (Holzapfel, 2002). Más allá del punto de vista económico, el uso del suero de leche como componente del medio de BL puede considerarse una práctica ecológica, que es capaz de reducir los efectos relacionadas con su eliminación (Panesar y col., 2007).

El objetivo del presente capítulo fue determinar el espectro de inhibición de las 4 cepas de *E. mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 seleccionadas en etapas previas y optimizar las condiciones de producción de las biomoléculas producidas por las mismas a partir de suero de leche, un subproducto de la industria láctea.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Determinación del espectro antimicrobiano de las cepas de *Enterococcus* seleccionadas

Los SLC de las 4 cepas seleccionadas en el capítulo anterior, *E. mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 fueron evaluados para determinar su espectro de actividad contra otras cepas que causan el deterioro de los alimentos (Tabla 2.1), según la metodología de la sección 1.2.1.1.

2.2.2. Producción de bacteriocinas por *Enterococcus* en diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación

Los medios de cultivo empleados para la producción de bacteriocinas fueron los medios líquidos MRS_s, MRS_c, $LAPTg_s$ (Raibaud y col., 1963) y $LAPTg_c$. Los subíndices s y c

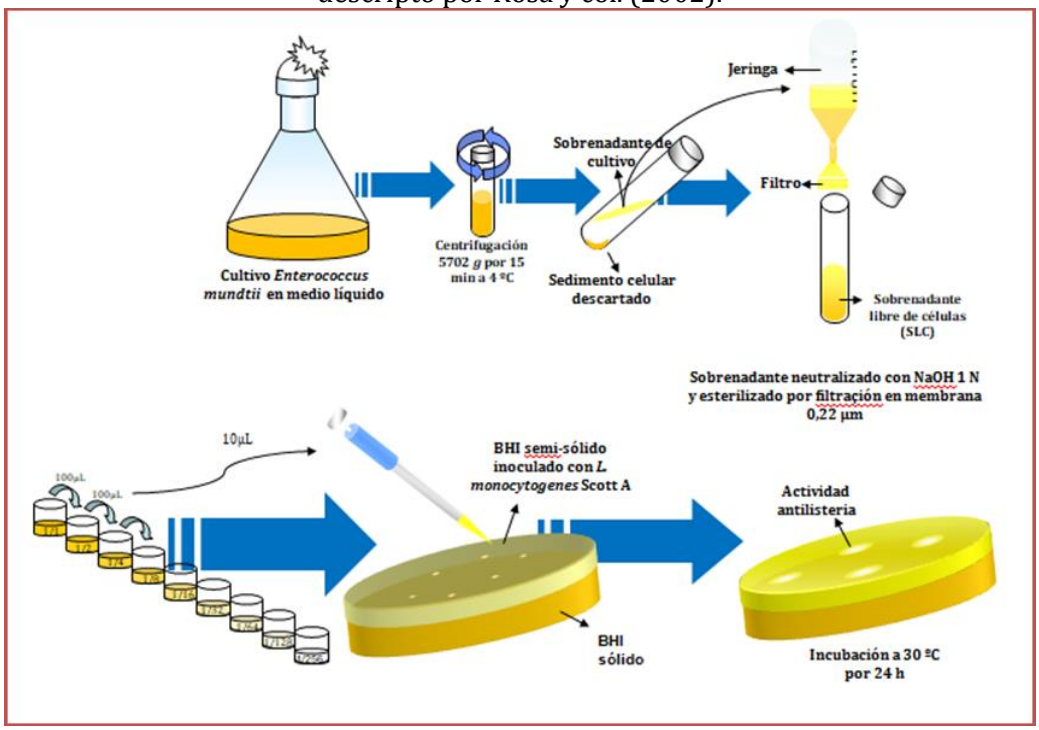
denotan sin o con cisteína (0,5 mg/mL) (Sigma, EE. UU.), respectivamente. Las temperaturas de incubación fueron 25, 30 y 37 °C, sin o con agitación (100 rpm). Los SLC se neutralizaron con NaOH 1 N (pH 6,5), calentados a 100 °C por 5 min y la cuantificación de la actividad antilisteria se realizó mediante la técnica de dilución crítica (Rosa y col., 2002) (Fig.2.1). Los SLC fueron diluidos en placas de micro titulación en las proporciones 1:2 hasta 1:2048, en solución salina estéril al 0,89 % (p/v). Diez microlitros de cada dilución fueron depositados sobre la superficie de una placa con BHI agar de acuerdo con la metodología descripta en la sección 1.2.1.1 (Farías y col., 1994). El título de la actividad antimicrobiana (Ecuación 2.1) es definido como la recíproca de la mayor dilución que presenta halo de inhibición, y expresado en unidades arbitrarias por mililitro (UA/mL).

Ecuación 2.1. Título de la actividad antimicrobiana expresado en Unidades Arbitrarias por mililitro.

Donde: V: volumen sembrado (mL); D: inversa de la mayor dilución que presente halo de inhibición.

$$UA/_{mL} = \frac{1}{V} \times D$$

Figura 2.1 Representación esquemática de la técnica de dilución crítica conforme con lo descripto por Rosa y col. (2002).



En una segunda etapa, se evaluó la producción de las sustancias tipo bacteriocina empleando como medio de cultivo diferentes diluciones de suero de leche (5 y 15 g/L), que constituye un subproducto de bajo costo y gran disponibilidad en la provincia de Tucumán.

2.2.3. Evaluación de la producción de bioemulsionante por *E. mundtii* Tw278 empleando diferentes fuentes de carbono

Para formular un medio de producción rentable, se sustituyó la glucosa del medio LAPTg por otras fuentes alternativas de carbono (Tabla 2.5): suero de leche (SL), vinaza y aceite usado, a una concentración final del 1 % (v/v). Una vez inoculados, fueron incubados a 25 °C por 24 h, luego de este tiempo se comprobó la producción de BE por la metodología descripta en la sección 1.2.1.2 y se empleó como control el SLC proveniente del medio LAPTg líquido (sin Tween 80).

2.2.4. Formulación de medios de producción con base de suero de leche

El suero de leche (SL) se obtuvo de una fábrica de productos lácteos ubicada en la provincia de Tucumán, Argentina. Además, los componentes del medio de producción $LAPT_{SL}$ fueron eliminados progresivamente (Tabla 2.6).

Los medios resultantes fueron inoculados con 100 µL de una suspensión *E. mundtii* Tw278 (DO_{610nm}: 0,896; UFC/mL: $1,3\times10^9$). Después de la incubación a 25 °C durante 24 h en condiciones estáticas, se registró el crecimiento bacteriano mediante la determinación de la densidad óptica a 610 nm (DO_{610nm}) y las UFC/mL. También se determinaron los valores de IE_{24} y S como se describe en la sección 1.2.1.2.

2.2.5. Evaluación del efecto del pH en la producción de bacteriocina y bioemulsionante

La producción de bacteriocina y bioemulsionante por *E. mundtii* Tw278 se llevó a cabo en un reactor de tanque agitado (STR) de 3 L en modo de operación por lotes (INFORS Labfors), que contenía 1,5 L de medio LAPTg líquido (sin Tween 80) y en otro que contenía 1,5 L de medio LAP_{SL}. El reactor se inoculó con 10 % (v/v) de un inóculo de 10^6UFC/mL; las condiciones de fermentación fueron 25 °C, 60 rpm, pH 6 y 1 vvm durante 24 h. El crecimiento y la producción de bacteriocina y bioemulsionante se midieron cada 3 h.

Las muestras retiradas se sometieron a diluciones decimales en agua con peptona estéril al 0,1 % (p/v), se colocaron en la superficie (100 µL) por duplicado en medio MRSsólido y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Se realizaron los conteos y los resultados para cada tiempo de muestreo se expresaron como la media de las unidades log UFC/mL.

La cantidad de bacteriocinas se determinó por la metodología descripta en la sección 2.2.2. Para determinar la producción de bioemulsionantesegún lo descripto en la sección 1.2.1.2.

2.3. Resultados y Discusión

2.3.1. Determinación del espectro de inhibición de las cepas de *E. mundtii*

Los espectros de inhibición fueron similares para las 4 cepas evaluadas (Tabla 2.1). Las cepas Gram negativas fueron resistentes a todos estos compuestos (Tabla 2.1). *E. mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 presentaron la mayor actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* Scott A. La actividad inhibidora de los SLC se probó en una amplia gama de microorganismos y fueron activos contra *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Enterococcus spp.* y *Lactobacillus plantarum* TwLb5 (Tabla 2.1).

La actividad antimicrobiana para las cepas indicadoras mostró pocas diferencias, donde algunas cepas tenían una producción de bacteriocinas más baja que otras, lo que es consistente con estudios previos (Aspri y col. 2017; Delcarlo y col. 2019).

Dado que la seguridad e inocuidad de las BL asociadas a los alimentos se ha aceptado durante mucho tiempo, se ha sugerido su empleo y/o el de sus metabolitos como bioconservantes, que formen parte de un sistema de "barreras" u "obstáculos" (Cleveland y col., 2001; Deegan y col., 2006), que permitan garantizar la seguridad y calidad higiénica, así como prolongar la vida útil de los alimentos que se consumen (Cleveland y col., 2001; Deegan y col., 2006).

Tabla 2.1 Espectro de inhibición de las cepas de *Enterococcus mundtii*.

Cepas Indicadoras	Actividad Antimicrobiana			
	***E. mundtii* Tw56**	***E. mundtii* Tw278**	***E. mundtii* Tw802**	***E. mundtii* Tw807**
***Listeria innocua* Tw 67**	+++	+++	+++	+++
***L. innocua* 6a**	+++	+++	+++	+++
***L. innocua* ATCC 33090**	++	+++	+++	+++
***L. monocytogenes* Scott A**	+++	+++	+++	+++
***L. monocytogenes* ATCC 7644**	+++	+++	+++	+++
***L. monocytogenes* 1908**	+++	+++	+++	+++
***L. monocytogenes* 1915**	+++	+++	+++	+++
***L. monocytogenes* 1599**	+++	+++	+++	+++
***Enterococcus faecalis* ATCC 29212**	++	++	++	++
***E. faecium* Van A**	++	++	++	++
***E. faecalis* Van B**	++	++	++	++
***E. gallinarum* Van C**	++	++	++	++
E. casseliflavus	++	+++	+++	+++
E. faecium	+++	++	+++	++
***Lactobacillus plantarum* TwLb 5**	+	++	++	++
Lactococcus lactis ATCC 11454	-	-	-	-
Lc. garvieae 03/8460	-	-	-	-
Lc. garvieae 03/8702	-	-	-	-
Lc. piscium 23.3.92	-	-	-	-
Streptococcus iniae MT 2376	-	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	-	-	-	-
Micrococcus luteus ATCC 15307	-	-	-	-
Escherichia coli ATCC 25922	-	-	-	-
E. coli ATCC 35218	-	-	-	-
Pseudomona aeruginosa ATCC 27853	-	-	-	-
Yersinia ruckerii 02/1607/Cb	-	-	-	-

2.3.2. Producción de bacteriocinas en diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación

Para las 4 cepas seleccionadas, se probaron diferentes medios de cultivo y condiciones para obtener la mayor producción de bacteriocinas. En la Tabla 2.2 se observa la actividad antimicrobiana de los SLC obtenidos en los diferentes medios con y sin adición de cisteína e incubados a 25, 30 y 37 °C por 24 h. La mayor actividad antilisteria de las

cepas *E. mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 también se confirmó en las condiciones probadas. La producción de bacteriocinas osciló entre 200 UA/mL y 819.200 UA/mL dependiendo de la cepa, la temperatura y el medio de cultivo utilizado. La menor producción de bacteriocinas se obtuvo a 37 °C, excepto para las cepas *E. mundtii* Tw802 y Tw807, donde la menor producción se observó a 25 °C, utilizando como medio de cultivo $LAPTg_c$.

Tabla 2.2 Producción de bacteriocinas (UA/mL) por cepas de *Enterococcus mundtii* bajo diferentes condiciones de incubación frente a *Listeria monocytogenes* Scott A
Donde $_s$: sin cisteína; $_c$: con cisteína (0,5 mg/mL)

E. mundtii	25 °C				30 °C				37 °C			
	$LAPTg_s$	$LAPTg_c$	MRS_s	MRS_c	$LAPTg_s$	$LAPTg_c$	MRS_s	MRS_c	$LAPTg_s$	$LAPTg_c$	MRS_s	MRS_c
Tw56	$4{,}1\ 10^5$	$2{,}0\ 10^5$	$2{,}0\ 10^5$	$4{,}1\ 10^5$	$1{,}0\ 10^5$	$8{,}2\ 10^5$	$6{,}4\ 10^3$	$1{,}0\ 10^5$	$3{,}2\ 10^3$	$1{,}3\ 10^4$	$6{,}4\ 10^3$	$1{,}3\ 10^4$
Tw278	$5{,}1\ 10^4$	$5{,}1\ 10^4$	$1{,}3\ 10^4$	$1{,}0\ 10^5$	$2{,}0\ 10^5$	$2{,}6\ 10^4$	$1{,}3\ 10^4$	$1{,}0\ 10^5$	$3{,}2\ 10^3$	$6{,}4\ 10^3$	$6{,}4\ 10^3$	$1{,}3\ 10^4$
Tw802	$1{,}3\ 10^4$	$8{,}0\ 10^2$	$2{,}0\ 10^5$	$6{,}4\ 10^3$	$8{,}2\ 10^5$	$8{,}2\ 10^5$	$1{,}0\ 10^5$	$1{,}3\ 10^4$	$3{,}2\ 10^3$	$1{,}6\ 10^3$	$2{,}6\ 10^4$	6400
Tw807	$2{,}6\ 10^4$	$8{,}0\ 10^2$	$1{,}0\ 10^5$	$1{,}6\ 10^3$	$4{,}1\ 10^5$	$2{,}0\ 10^5$	$2{,}6\ 10^4$	$5{,}1\ 10^4$	$3{,}2\ 10^3$	$1{,}6\ 10^3$	$5{,}1\ 10^4$	$1{,}3\ 10^4$

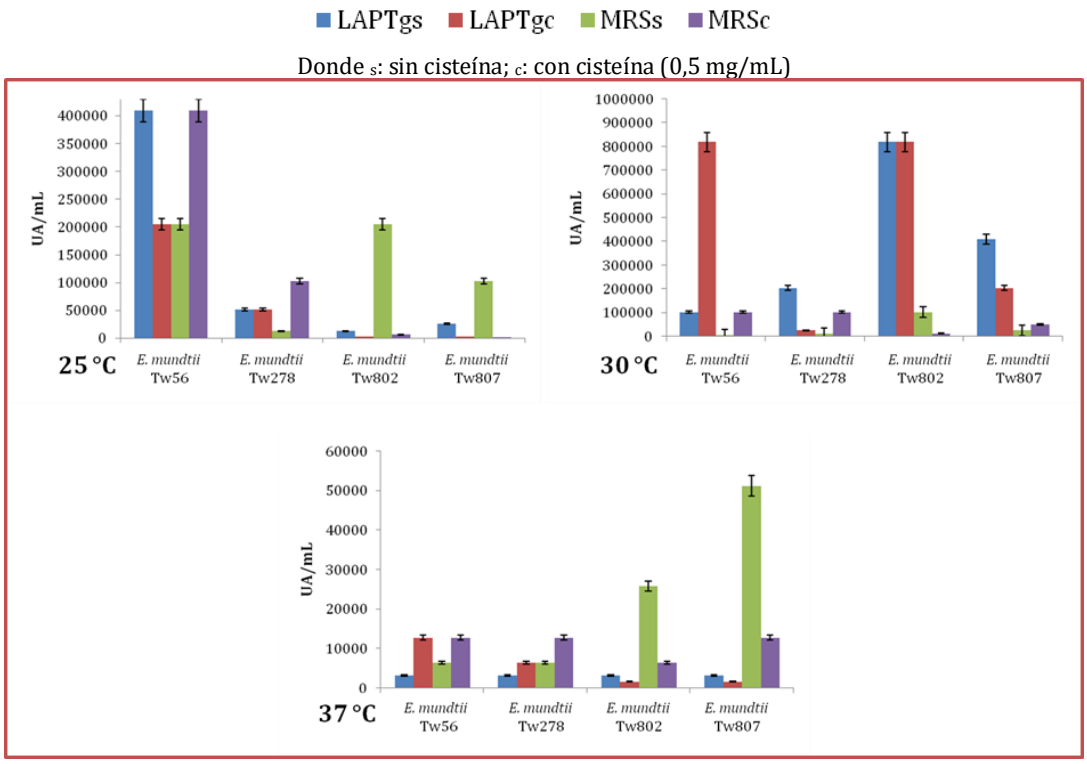
La máxima actividad antimicrobiana producida por las cepas estudiadas ocurrió entre 25 y 30 °C, utilizando medio LAPTg líquido, siendo éste un medio más económico que el medio MRS líquido.

Los resultados de este estudio indican que la mejor producción de bacteriocinas por parte de las BL seleccionadas ocurre a temperaturas entre 25 y 30 °C, las cuales no coinciden con la temperatura óptima de crecimiento bacteriano (37 °C). La producción de bacteriocina por BL en el alimento depende de una biosíntesis óptima pero no es paralela al crecimiento bacteriano, además de la interacción con los componentes de la matriz alimentaria (Malheiros y col., 2015; Engelhardt y col., 2018). Varios estudios demostraron que el crecimiento de las BL depende de la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes, esto se debe a que las BL son microorganismos que requieren medios ricos, condiciones apropiadas para su crecimiento y flora competitiva (Van den Berghe y col., 2006).

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los publicados por otros autores. Barbosa y col. (2014) determinaron que *Lactobacillus sakei* MBSa1 creció bien en medio MRS líquido a diferentes temperaturas (25, 30 y 37 °C) pero la temperatura óptima de producción de bacteriocina fue de 25 °C. Sousa y col. (2017) determinaron que la producción de bacteriocinas por parte de *Lactococcus lactis* CECT-4434 dependía de la temperatura de incubación, obteniendo los mejores resultados en un rango de 30-37 °C con o sin control de pH.

Además, se observó que la adición de cisteína al medio de cultivo puede inducir un aumento de la producción de bacteriocinas. Se verificó que la adición de 0,5 mg/mL de cisteína aumenta la actividad de las bacteriocinas detectables en hasta 16 veces en algunas de las condiciones evaluadas (Tabla 2.2-Fig. 2.2). Este dato coincide con lo reportado por Carvalho y col., quienes demostraron que la adición de cisteína al medio de cultivo puede inducir un aumento de la producción de bacteriocinas (datos no publicados). Este comportamiento está relacionado con la disminución del potencial redox del medio de cultivo (Vázquez y col., 2004), y por lo tanto demuestra que en condiciones de bajo nivel de oxígeno en el medio se puede mejorar la producción de bacteriocinas por las BL seleccionadas.

Figura 2.2 Producción de bacteriocinas por cepas de *Enterococcus mundtii* bajo diferentes condiciones de incubación frente a *Listeria monocytogenes* Scott A.



En la figura 2.2, se observa que a una temperatura de 25°C la mayor producción de bacteriocinas fue de 409.600 UA/mL para la cepa *E. mundtii* Tw56, empleando como medio LAPTg$_s$ líquido. Mientras que a 30°C (Fig. 2.2) fue de 819.200 UA/mL para *E. mundtii* Tw56 y *E. mundtii*Tw802, empleando los medios LAPTg$_c$ y LAPTg$_s$ líquidos, respectivamente. En contraste, a 37°C (Fig. 2.2) la máxima producción fue de 51.200 UA/mL para *E. mundtii* 807, empleando el medio MRS$_s$ líquido.

Se selecciono el medio LAPTg líquido (con y sin cisteína) y una temperatura de incubación de 30 °C para evaluar el efecto de la agitación sobre la producción de

bacteriocinas por las BL seleccionadas (Tabla 2.3). No se observaron aumentos en la producción de bacteriocinas con el uso de agitación durante la incubación. Esto puede deberse a las condiciones sin ajustes de atmósfera, mientras que el uso de cisteína favorece la producción de bacteriocinas, el empleo de la agitación aumenta la concentración de O_2 disuelto.

Tabla 2.3 Producción de bacteriocinas (UA/mL) por cepas de *Enterococcus mundtii* en los medios LAPTg$_s$y LAPTg$_c$, con agitación (100 rpm), a 30 °C frente a *Listeria monocytogenes* Scott A

Donde $_s$: sin cisteína; $_c$: con cisteína (0,5 mg/mL)

E. mundtii	Medios de Cultivo y condiciones de Incubación a 30 °C por 24 h	
	LAPTG$_s$,100 rpm	LAPTG$_c$,100 rpm
Tw56	102.400	204.800
Tw278	12.800	12.800
Tw802	819.200	409.600
Tw807	400	800

Posterior al estudio de la producción de bacteriocinas en los medios líquidos MRS y LAPTg con la evaluación de la temperatura, agitación y cisteína, se verificó la producción de bacteriocinas en suero de leche “Windy” (5 y 15 g/L). La producción de bacteriocinas observada posee actividades inferiores a las obtenidas en los medios anteriormente mencionados (Tabla 2.4).Este resultado concuerda con lo reportado por otros autores.Todorov y col. (2011) demostraron la capacidad de la cepa *L. plantarum* ST16, cuando se cultiva en MRS suplementado con diferentes nutrientes, para producir una bacteriocina con alta actividad antimicrobiana contra varios microorganismos. Sin embargo, cuando se cultivó en suero de leche, a pesar de la producción satisfactoria de biomasa, esta cepa no produjo bacteriocina.Sosa (2019), evaluó la actividad antimicrobiana de cepas de *Enterococcus* frente a *L. innocua* Tw67, empleando como medio de producción suero de leche, sin embargo, los títulos de actividad antimicrobiana resultaron inferiores con los obtenidos a partir del medio comercial MRS.

Este resultado puede deberse a que el suero de leche permite el crecimiento de la mayoría de las BL (Brinques y col., 2010; Panesar y col., 2010; Ünlü y col., 2015), pero al carecer de nitrógeno y otros componentes nutricionales, requiere suplementación para mantener satisfactoriamente la producción de bacteriocina (Briczinski y Roberts, 2002).

Además, algunas BL tienen un sistema proteolítico ineficiente y dependen en gran medida de suplementos externos para sintetizar péptidos y proteínas (Ummadi y Curic-Bawden, 2010; Pleissner y Venus, 2016).

Tabla 2.4 Producción de bacteriocinas (UA/mL) por cepas de *Enterococcus mundtii* en suero de leche Windy, frente a *Listeria monocytogenes* Scott A.

E. mundtii	Suero de Leche, 24 h a 30 °C	
	5 g/L	15 g/L
Tw56	400	400
Tw278	400	3200
Tw802	200	800
Tw807	200	800

2.3.3. Evaluación de la producción de bioemulsionante por *E. mundtii* Tw278 empleando diferentes fuentes de carbono

Para cualquier producto a base de fermentación, es fundamental que la disponibilidad del producto fermentado sea igual a la demanda del mercado. Cualquier industria involucrada en la producción de un compuesto en particular tiene como objetivo lograr el máximo beneficio con la mínima inversión, y la industria de BE no es una excepción. Sin embargo, la mayoría de los procesos de productos biotecnológicos necesitan insumos costosos. Así, en los procesos de fermentación en los que los componentes del medio representan una parte importante del costo del producto, la selección de materias primas baratas se vuelve importante para las empresas productoras (Banat y col., 2014; Sabo y col., 2017).

Tabla 2.5 Producción de bioemulsionante por *Enterococcus mundtii* Tw278 empleando diferentes fuentes de carborno.

Medios de Cultivo	Temperatura (°C)		
	25	**30**	**37**
LAPTg	47,6	0	0
$LAPT_{SL}$	61	0	0
$LAPT_{V}$	0	0	0
$LAPT_{A}$	0	0	0

La fuente de carbono es unode los componentes del medio más importante, ya que desempeña un papel fundamental en el crecimiento microbiano y en la producción de

metabolitos; el uso de sustratos de carbono de bajo costo es una de las metas más investigadas para rentabilizar el proceso. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó la producción de BE por *E. mundtii* Tw278 utilizando SL, vinaza y aceite usado, como fuentes de carbono alternativas a la glucosa. Los resultados indicaron que solo el SLC del medio $LAPT_{SL}$ mostró una apreciable capacidad emulsionante (IE_{24}=61 %) (Tabla 2.5), formando una emulsión compacta y estable con queroseno que retuvo la altura inicial luego de 7 días de reposo (S=100%).

2.3.4. Formulación de medios de producción con base de suero de leche

Aunque diferentes subproductos agroindustriales han sido reportados exitosamente en la síntesis de BE a partir de diversos microorganismos, es de destacar que los estudios de producción utilizando subproductos lácteos como materia prima son escasos en la literatura. Las industrias lácteas producen grandes cantidades de sueros (residuos de suero, suero de queso y suero de leche), todos los cuales están fácilmente disponibles como sustratos crudos para el crecimiento microbiano (Banat y col., 2014).

En la literatura consultada, se encuentran varios trabajos sobre el uso de suero de leche para la producción de BS/BE a escala industrial. Rodrigues y Teixeira (2008) informaron que *L. pentosus* CECT-4023 es una fuerte cepa productora de BS empleando este sustrato como fuente de carbono. La glicoproteína tipo BS producida por *L. agilis*, presenta una actividad emulsionante (IE_{24}) del 60 % con la utilización de suero de leche como medio de cultivo (Gudiña y col., 2015a).

Tabla 2.6 Matriz para un diseño factorial completo 2^3 y resultados experimentales.

	Factor				UFC/mL	IE_{24}	S (%)
	LA	P	T	SL			
1	+	+	+	+	$1{,}4\ 10^{9c}$	55 ± 0^{c}	100 ± 0^{c}
2	+	+	-	+	$1{,}3\ 10^{9c}$	55 ± 0^{c}	100 ± 0^{c}
3	+	-	+	+	$1{,}1\ 10^{9b,c}$	$45 \pm 0^{a,b}$	93 ± 0^{c}
4	-	+	+	+	$1{,}4\ 10^{9c}$	$50 \pm 0^{b,c}$	92 ± 6^{c}
5	+	-	-	+	$1{,}2\ 10^{9\,c}$	$50 \pm 0^{b,c}$	62 ± 6^{b}
6	-	+	-	+	$1{,}1\ 10^{9\,b,c}$	$52 \pm 6^{b,c}$	61 ± 10^{b}
7	-	-	+	+	$8{,}4\ 10^{8\,a,b}$	41 ± 2^{a}	13 ± 3^{a}
8	-	-	-	+	$8{,}1\ 10^{8\,a}$	$52 \pm 0^{b,c}$	17 ± 0^{a}

IE24: Índice de Emulsificación a las 24 h; S: estabilidad de la emulsión luego de 7 días de reposo.
LA: extracto de levadura (10 g/L); P: peptona de carne (15 g/L); T: tripteína (10 g/L): SL: suero de leche (10 g/L). Las anotaciones "+ y -" representan la "presencia o ausencia" de cada constituyente en el medio de producción.
Medias de una misma columna con una letra en común no son significativamente diferentes (p>0,05).

Con el fin de reducir aún más el costo de producción del BE de *E. mundtii* Tw278, los componentes de $LAPT_{LW}$ fueron eliminados progresivamente aplicando un diseño

factorial completo (2^3). La matriz correspondiente y los resultados experimentales en términos de valores de DO_{610nm}, UFC/mL, IE_{24} y S se muestran en la Tabla 2.6. Los principales efectos de los factores A (extracto de levadura), B (peptona) y C (triptona) y de sus interacciones, sobre los resultados experimentales se presentan en la Tabla 2.7. Como se esperaba, los cambios en la composición del medio afectaron significativamente el crecimiento microbiano y los valores de IE_{24}/S de los sobrenadantes (Tabla 2.6). Los valores P que se muestran en la Tabla 2.7 indican que la presencia de extracto de levadura y peptona tuvo un efecto positivo y significativo sobre el crecimiento microbiano y la estabilidad de la emulsión. Sin embargo, solo la presencia de peptona en el medio tuvo un efecto positivo significativo sobre elIE_{24}. Las interacciones de dos y tres factores no tuvieron efectos positivos significativos en ninguno de los parámetros evaluados. Con base en estos resultados, se seleccionó un medio que contenía extracto de levadura, peptona y suero de leche (medio LAP_{SL}) como el más apropiado para producir BE por *E. mundtii* Tw278. En tales condiciones, el rendimiento del producto microbiano fue de 270 mg/L, superior al obtenido en medio LAPTg. A su vez, la comparación entre ambos medios de producción reveló que el costo de la materia prima del medio LAP_{SL} fue aproximadamente un 47% menor que el del medio LAPTg.

Tabla 2.7 Efectos estimados de los componentes del medio de producción en los parámetros UFC/mL, IE_{24} y S.

Variables	UFC/mL		IE_{24} (%)		S (%)	
	Efecto	Valor T (valor p)	Efecto	Valor T (valor p)	Efecto	Valor T (valor p)
LA	0,162	8,7 (p<0,001)	2,300	1,94 (p=0,088)	54,500	23,65 (p≤0,001)
P	0,210	11,3 (p<0,001)	6,050	5,1 (p=0,001)	30,500	13,23 (p≤0,001)
T	0,042	2,29 (p=0,051)	-4,750	-4,01 (p=0,004)	3,000	1,30 (p=0,229)
LA*P	-0,072	-3,91 (p=0,004)	1,050	0,89 (p=0,402)	-8,000	-3,47 (p=0,008)
LA*T	-0,050	-2,70 (p=0,027)	2,250	1,90 (p=0,094)	12,500	-0,42 (p=0,001)
P*T	-0,062	3,37 (p=0,010)	3,500	-2,95 (p=0,018)	-10,500	-4,56 (p=0,002)
LA*P*T	0,005	0,27 (p=0,794)	-1,000	-0,84 (p=0,424)	-5,000	-2,17 (p=0,062)
$R\text{-}Sq_{(adj)}$	94,06 %		77,82 %		98,15 %	

IE24: Índice de Emulsificación a las 24 h; S: estabilidad de la emulsión luego de 7 días de reposo.
LA: extracto de levadura; P: peptona de carne; T: tripteína.

2.3.5 Evaluación del efecto del pH en la producción de bacteriocina y bioemulsionante

Los parámetros externos, como la composición del medio, la temperatura, el pH y el tiempo de incubación, pueden interferir con la producción y el desempeño efectivo tanto de los bioemulsionantes como de las bacteriocinas (Cortés-Sánchez y col., 2013).

Los resultados obtenidos en la producción simultánea de bacteriocina y bioemulsionante por *E. mundtii* Tw278 en los medios LAPTg (sin Tween 80) y LAP_{SL}, a pH libre y pH controlado (6) se observan en la Tabla 2.8.

En el medio LAPTg (sin Tween 80) la producción de bacteriocina alcanza un valor de $1{,}6x10^6$ UA/mL, a las 12 h de incubación, sin embargo, no se observa diferencia significativa ($p>0{,}05$) con respecto al producido en el medio sin ajuste de pH. El valor más alto de IE_{24} fue de 52,4 ± 0,1 a las 12 h de incubación, el cual es significativamente superior ($p<0{,}05$) al observado a pH libre, que fue de 47,6 ± 0,08, teniendo el control de pH un efecto positivo sobre la producción de bioemulsionante, pero no así sobre la producción de bacteriocina.

Tabla 2.8 Producción simultanea de bacteriocina (UA/mL) y bioemulsionante (IE_{24}) por *E. mundtii* Tw278 en los medios LAPTg (sin Tween 80) y LAP_{SL} a pH libre y controlado (6) a 25 °C por 24 h.

Condición	Tiempo (h)	LAPTg (sin Tween 80)			LAP_{SL}		
		log UFC/mL	UA/mL	IE_{24} (%)	log UFC/mL	UA/mL	IE_{24} (%)
Estufa (pH libre)	0	7,80 ± 0,03	$2\ 10^2$	0	7,71 ± 0,05	0	0
	3	8,86 ± 0,19	$5{,}1\ 10^4$	21 ± 0,8	8,70 ± 0,03	200	11,53 ± 1,97
	6	9,01 ± 0,23	$4{,}1\ 10^5$	45 ± 0,8	9,24 ± 0,06	800	21,63 ± 1,44
	9	8,86 ± 0,46	$1{,}6\ 10^6$	47,6 ± 0,1	9,20 ± 0,03	1600	38,83 ± 1,85
	12	9,20 ± 0,11	$1{,}6\ 10^6$	47,6 ± 0,08	8,73 ± 0,02	3200	55,50 ± 3,38
	24	9,07 ± 0,45	$1{,}6\ 10^6$	45 ± 0,8	8,56 ± 0,09	3200	60,97 ± 0,95
Fermentador (pH 6)	0	7,80 ± 0,03	$2\ 10^2$	0	7,71 ± 0,05	0	0
	3	9,03 ± 0,25	$1{,}6\ 10^3$	9,5 ± 0,1	8,86 ± 0,06	0	14,50 ± 2,11
	6	9,15 ± 0,38	$4{,}1\ 10^5$	23,8 ± 0,1	9,16 ± 0,54	200	31,45 ± 1,85
	9	9,56 ± 0,07	$4{,}1\ 10^5$	33,3 ± 0,1	9,29 ± 0,23	800	38,10 ± 2,44
	12	10,42 ± 0,02	$1{,}6\ 10^6$	52,4 ± 0,08	10,42 ± 0,02	1600	54,30 ± 1,81
	24	9,72 ± 0,22	$1{,}6\ 10^6$	50 ± 0,8	9,52 ± 0,08	1600	51,97 ± 1,79

Cepa indicadora: *Listeria monocytogenes* Scott A; sustrato hidrófobo: queroseno

En el medio LAP_{LW} la producción de bacteriocina alcanza un valor de $1{,}6x10^3$ UA/mL y de $3{,}2x10^3$ UA/mL, a las 12 h de incubación, con y sin ajuste de pH, respectivamente, siendo estos valores inferiores a los obtenidos en el medio LAPTg (sin Tween 80) bajo las mismas condiciones evaluadas. El valor más alto de IE_{24} fue de 52,3 ± 1,81 a las 12 h de incubación, el cual es significativamente menor ($p<0{,}05$) al observado a pH libre, que fue de 60,97 ± 0,95. En este caso, no se observo un efecto positivo del control de pH sobre la producción de ambos compuestos.

La bibliografía consultada muestra resultados ambiguos con respecto al control del pH sobre la producción de bacteriocinas y biosurfactante/bioemulsionante. Sousa y col.

(2017) no observaron diferencias significativas en la producción de bacteriocina por *Lactococcus lactis* CECT-4434 a 30 y 37 °C, sin o con control de pH (5-5,3), mientras que la producción de biosurfactante se vio afectada positivamente a 30 °C con control de pH ya 37 °C sin control de pH. Rodríguez y col. (2010) observaron que a 30 °C bajo control de pH a 6,8, esta misma cepa solo producía biosurfactante, demostrando la importancia del pH en la producción simultánea de biosurfactante y bacteriocina. Por otro lado, Ananou y col. (2020) determinaron que el control de pH 6-6,5 afectó positivamente la producción de bacteriocina por parte de la cepa *Enterococcus hirae* OS1. Ananou y col. (2008) demostraron que el control de pH a valores de 6,55-6,65 tuvo un efecto positivo en la producción de enterocina AS-48, obteniendo títulos significativamente mayores de actividad inhibitoria en comparación con los cultivos control sin control de pH.

2.4. Conclusiones Parciales

- La producción de bacteriocinas es mayor empleando como medio LAPTg.
- La máxima producción de bacteriocinas se obtuvo a una temperatura de incubación de 25-30 °C. Estos resultados indican la importancia del control de la temperatura, ya que la misma para la máxima producción de bacteriocinas por las BL seleccionadas no coincide con la temperatura óptima de crecimiento bacteriano.
- Se demostró la capacidad de *E. mundtii* Tw278 para producir bioemulsionante utilizando suero de leche como fuente de carbono de bajo costo. Además, se logró optimizarel medio de producción de bioemulsionante.
- Se determinó que el control de pH no tiene un efecto positivo sobre la producción de bioemulsionante o bacteriocina cuando se emplean los medios óptimos, LAP_{SL}y LAPTg (sin Tween 80), respectivamente.

Capítulo III

3.1. Introducción

La mayor parte de los estudios sobre la producción, caracterización, purificación y aplicación de las bacteriocinas y biosurfactantes/bioemulsionantes se han llevado a cabo en cepas aisladas de humanos, animales de cría y alimentos (Zendo y col., 2005; Belgacem y col., 2010; Özdemir y col., 2011). En los últimos años son numerosos los trabajos que reportan especies del género *Enterococcus*, productores de compuestos de interés biotecnológico, aislados de vísceras de peces, tanto de agua dulce como salada (Migaw y col., 2013; Araújo y col., 2015; Ghomrassi y col., 2016).

En este capítulo se evalúa la presencia de genes estructurales de enterocinas en las 4 cepas seleccionadas, el método de purificación de la bacteriocina producida por *E. mundtii* Tw56 y la caracterización y parcial purificación del bioemulsionante producido por *E. mundtii* tw278.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Screening de genes estructurales de enterocina por PCR

La presencia de genes estructurales de bacteriocinas presentes en el genoma de las bacterias estudiadas se realizó por PCR y los cebadores utilizados para la amplificación de enterocina A, B, P, L50A, L50B, mundticina KS, bacteriocina 96, bact 31, 1071 A /B, enterocina Q y HirJM 79 y las referencias correspondientes se enumeran en la Tabla 3.1. Las condiciones generales de PCR fueron descritas por Schelegueda y col. (2015).

La amplificación por PCR se llevó a cabo en un Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) usando 20 µL de una mezcla de reactivos que contienen 50 ng de ADN, 0,5 µM de cada cebador, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mMdesoxinucleótidostrifosfato, 1xPCR buffer y 1 U de Taq ADN polimerasa (Inbio-Highway, Argentina). Los ciclos usados fueron 95 °C por 5 min, 95 °C por 30 s, seguidos por 30 s de hibridación a la temperatura que se indica a continuación, 72 °C por 30 s por los siguientes 30 ciclos; y 72 °C por 5 min para el último ciclo. La temperatura de hibridación fue de 56 °C (para los cebadores de enterocinas B, P, L50A/B), 58 °C (para los cebadores de enterocina A) o 55 °C (para los cebadores de mundticina KS). Una alícuota de 4 µL de la mezcla de amplificación se combino con 1 µL de tampón de carga, y la preparación fue sometida a una electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % a 70V por 1 h.

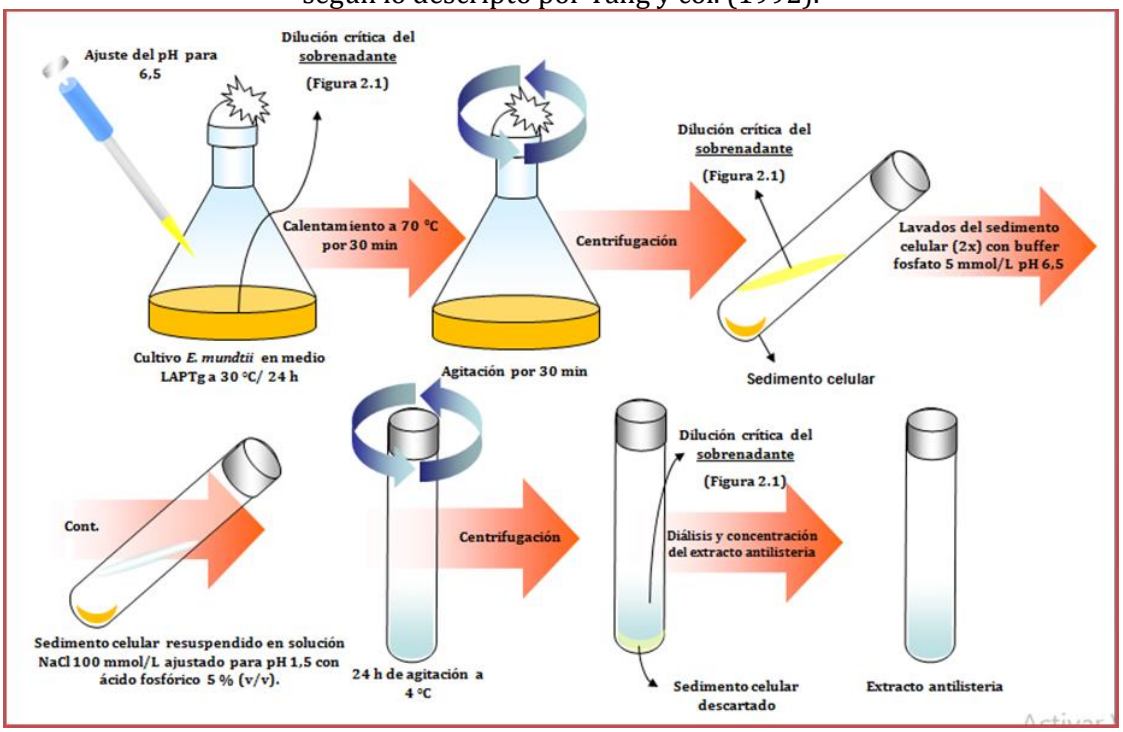
Tabla 3.1. Cebadores empleados para amplificación de genes de bacteriocina.

Enterocinas	Sequence (5´- 3´)	Size (pb)	Reference
Ent A	f: GGTACCACTCATAGTGGAAA r: CCCTGGAATTGCTCCACCTAA	138	De Vuyst y col., (2003)
Ent B	f: CAAAATGTAAAAGAATTAAGTACG r: AGAGTATACATTTGCTAACCC	201	De Vuyst y col., (2003)
Ent P	f: GCTACGCGTTCATATGGTAAT r: TCCTGCAATATTCTCTTTAGC	87	De Vuyst y col., (2003)
Ent LB50A	f: ATGGGAGCAATCGCAAAATTA r: TTTGTTAATTGCCCATCCTTC	274	De Vuyst y col., (2003)
Ent LB50B	f: ATGGGAGCAATCGCAAAATTA r: TAGCCATTTTTCAATTTGATC	274	De Vuyst y col., (2003)
Bact 96	f: GTGGAGAGGACGAAAGGAGA r: TTGATTAGTGGAGAGGACGGATTA	291	Henning y col., (2015)
Bact 31	f: CCTACGTATTACGGAAATGGT r: GCCATGTTGTACCCAACCATT	130	Özdemir y col., (2011)
1071 A/B	f: GGGGAGAGTCGGTTTTTAG r: ATCATATGCGGGTTGTAGCC	273	Martín y col., (2006)
EntQ	f: ATGAATTTTCTTCTTAAAAATGGTATCGCA r: TTAACAAGAAATTTTTTCCCATGGCAA	105	Belgacem y col., (2010)
mun KS	f: TGAGAGAAGGTTTAAGTTTTGAAGAA r: TCCACTGAAATCCATGAATGA	379	Zendo y col., (2005)
HirJM 79	f: ATGAAAAAGAAAGTATTAAAACATTGTGTTATTCTAGG r: ATAAGTTAAGCTTGTACTACCTTCTAGGTGCCCATGGACC	408	Almeida y col., (2011)

3.2.2. Purificación y caracterización de bacteriocinas por HPLC y espectrometría de masa

Se empleó el método descripto por Yang y col. (1992) (Fig. 3.1). La cepa *E. mundtii* Tw56 creció en LAPTg$_C$ que permitió el crecimiento y la producción de la bacteriocina hasta fase estacionaria temprana (~5.10^8 células/mL).

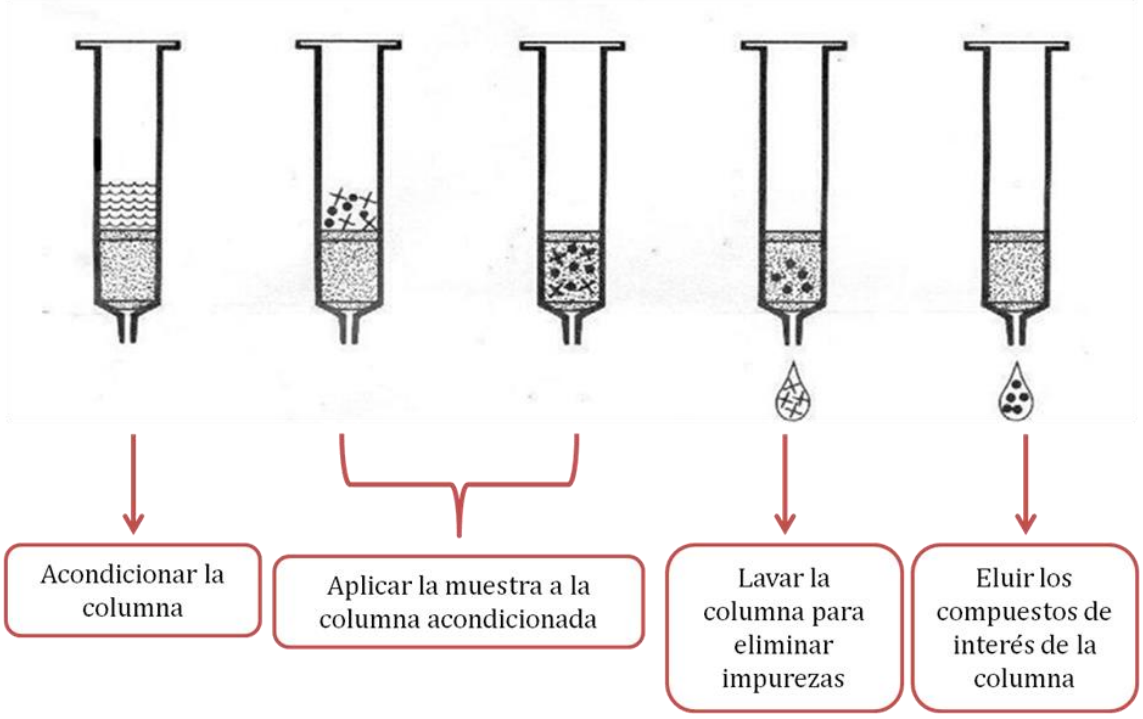
Figura 3.1 Representación esquemática de la técnica de extracción ácida de bacteriocinas según lo descripto por Yang y col. (1992).



El método consiste básicamente en adsorber las bacteriocinas que son secretadas al medio de cultivo a las mismas células productoras, ajustando el pH a un valor de 6,5 para después eliminar las células por calentamiento a 70 °C durante 30 min. Las células con las bacteriocinas adsorbidas fueron cosechadas por centrifugación y lavadas con tampón fosfato 5 mM pH 6,5 para ser centrifugadas nuevamente. Luego fueron tratadas con cloruro de sodio 100 mM a pH 1,5 y colocadas en agitación suave por 24 h a 4 °C para despegar las bacteriocinas. Por centrifugación se eliminaron las células, el sobrenandante obtenido fue neutralizado, filtrado y dializado a 4 °C por 24 h, lo obtenido fue denominado "extracto antilisteria".

El extracto antilisteria Tw56 se sembró en un cartucho C18 (Fig. 3.2), previamente lavado con agua bidestilada y fue eluído con concentraciones crecientes de metanol en agua empleando un gradiente escalonado (0, 20, 40, 60, 80 y 100%). Se evaporó el metanol de las fracciones que mostraron actividad antilisteria en un rotavapor calentando a 70 °C y 100 rpm, y luego resuspendidas en 1 mL de agua bidestilada con 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA) para ser sometidas a RP-cromatografía en HPLC. Se usó una columna µBondapack C18 (4,6 x 300 mm) y se eluyó con un gradiente lineal del 0-100 % de metanol. Las fracciones con actividad antilisteria fueron sometidas a una segunda cromatografía usando una columna WatersXTerra MS C8 de 5 µm (4,6 x 250 mm) eluida con un gradiente lineal de acetonitrilo (0-100%).

Figura 3.2 Representación gráfica de la siembra de una muestra en un cartucho C18.



La elución se siguió por absorbancia a 220 nm y se determinó la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas, para identificar aquellas en las cuales eluía la bacteriocina, por la metodología descripta en la sección 1.2.1.1. Las fracciones con actividad fueron concentradas y enviadas a analizar por espectrometría de masa (MS) en LANAIS PROEM - UBA CONICET (Buenos Aires, Argentina). Se retomaron en 50 µl de acetonitrilo 80 % TFA 0,1 % y una fracción de la misma (6 %) se utilizó para la adquisición del espectro por MALDI TOF TOF. La matriz utilizada fue ácido α-4-ciano-hidroxicinámico y un equipo MALDI TOF TOF 4800 plus de ABSciex, modo reflectrón.

3.2.3. Caracterización y propiedades del bioemulsionante producido por *E. mundtii* Tw278

Al SLC, que contenía albioemulsionante producido por *E. mundtii* Tw278 (en medio LAP_{SL} a 25 °C) se le adicionó el mismo volumen de etanol (1:1, v/v) y fue almacenado a 4 °C por 24 h para su precipitación. El mismo fue recuperado por centrifugación (5702 *g* durante 10 min) y re suspendido en un volumen 10 veces menor al original de agua destilada estéril. El extracto BE278fue liofilizado y se utilizó como fuente de bioemulsionante para las siguientes determinaciones.Adicionalmente se tomaron fotografías por microscopía óptica de cada emulsión, tomando la muestra una semana después de su formación. Finalmente, se analizó la distribución de tamaños de gotas en las diferentes emulsiones realizadas mediante un analizador de imágenes (ImageJ).

3.2.3.1. Naturaleza química

Para investigar el papel de los péptidos en la capacidad emulsionante del bioproducto, se trataron 990 µL del extracto BE278 con 10 µL de proteinasa K (30 U/mg) a 37 °C durante 4 h. Para explorar el papel de los lípidos, 900 µL del extracto BE278 se trataron con 100 µL de la lipasa comercial de Candida rugosa (100 U/mg) a 37 °C durante 1 h. La presencia de azúcar reductor se determinó después del hidrólisis de HCl a 100 °C durante 10 min utilizando el reactivo ácido dinitrosalicílico (Miller, 1969). Después de cada tratamiento, se determinaron los valores residuales de IE_{24} y se compararon con el extracto no tratado, que se consideró 100%. La concentración de proteína del extracto de BE se estimó en 595 nm usando BSA (fracción V) como patrón (Bradford, 1976).

3.2.3.2. Análisis infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

El bioemulsionanteBE278 liofilizado se mezcló con bromuro de potasio (1:100, p/p). A continuación, las mezclas se prensaron para obtener gránulos translúcidos. El espectro de absorción de infrarrojos del bioemulsionante se registró utilizando un

espectrofotómetro FT-IR en el rango de frecuencia de 4000–400 cm^{-1} (Jasco International Co., Tokio, Japón) para identificar los grupos funcionales.

3.2.3.3. Ensayo de citotoxicidad

Una muestra del extracto BE278 fue enviada a CERELA-CONICET, donde se realizó un estudio de su toxicidad utilizando la línea celular Caco-2 (células de cáncer de colon humano) como organismo de prueba. La viabilidad de estas células se analizó exponiéndolas al agente emulsionante mediante la técnica del MTT [bromuro de (4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazolio] (Sigma Aldrich, St Louis, EE. UU.). El MTT es un compuesto soluble en agua que se convierte en formazán púrpura insoluble a través de deshidrogenasas mitocondriales en células viables (Buyukozturk y col., 2010). Las células ($1x10^5$células/mL) se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos con 200 µL de DMEM [Medio Eagle modificado por Dulbecco (de Gibco)] por pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C y CO_2 al 5% durante 7 días, y el medio de cultivo se reemplazó cada 3 días antes de realizar el ensayo de citotoxicidad. Después de retirar el medio de cultivo, las células se enjuagaron dos veces con solución salina balanceada de Hank (HBSS) y se expusieron a 200 µL de medio de cultivo/agente emulsionante (1:1, v/v) a 37 °C durante 3 h. Los controles de ensayo consistieron en células incubadas solo con medio de cultivo (Control de Viabilidad, CV) y células incubadas solo con agua (Control de Agua,CA). Después de eso, las células se enjuagaron dos veces con HBSS y luego se incubaron con la solución de MTT en medio de cultivo (0,3 mg/mL) a 37 °C durante 3 h. Los cristales de formazán se solubilizaron añadiendo 100 µl de sulfuro de dimetilo. Se midió la absorbancia de los pocillos a 570 nm y se determinaron los porcentajes de viabilidad con respecto al CV, que se consideró 100% de viabilidad celular.

3.2.3.4. Ensayo de estabilidad

La estabilidad delbioemulsionanteBE278 expuesto a diferentes temperaturas, pH y concentraciones de NaCl se evaluó midiendo el IE_{24} residual frente al queroseno. La resistencia térmica se probó exponiendo cada agente a 37, 45, 60, 80 y 100 °C durante 1 h (incubación a temperatura ambiente: control de temperatura). La estabilidad a diferentes valores de pH se evaluó incubando cada agente emulsionante con 1 M de los siguientes tampones: ácido fosfórico (pH 2,1), ácido cítrico-Na_2HPO_3 (pH 3, 4 y 5), Na_2HPO_3–NaH_2PO_3 (pH 6, 7, y 8), y Na_2CO_3–$NaHCO_3$ (pH 9 y 10), a 37 °C durante 1 h (incubación en agua destilada: control de pH). La resistencia a la salinidad se probó exponiendo el extracto BE278 a NaCl al 5, 10, 15 y 20 % (p/v), a 37 °C durante 1 h (incubación en ausencia de sal:

control de salinidad). Luego de cada tratamiento, se verificó la actividad emulsionante según lo descripto en la sección 1.2.1.2.

3.2.3.5. Capacidad emulsionante

Se realizó un ensayo para evaluar la capacidad delbioemulsionante BE278 para emulsionar diversos compuestos hidrofóbicos tanto de origen sintético (queroseno, diesel y aceite motor) como de origen natural (aceites de girasol, soja, oliva, canola y uva). Los valores de IE_{24} y S se calcularon para cada sustrato como se describe en la sección 1.2.1.2.

3.2.3.6. Ensayo de vesículas unilaminares gigantes

Se realizaron experimentos con vesículas unilaminares gigantes (GUV, por sus siglas en inglés) de POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) para evaluar el efecto del bioemulsionante producido en las membranas biológicas. Las GUV se prepararon utilizando el método de electroformación (Angelova y Dimitrov, 1986). Brevemente, se esparcieron alícuotas de 20 µL de una solución de fosfolípidos de 1 mg/mL en cloroformo sobre la superficie de dos vidrios conductores recubiertos con óxido de indio y estaño (ITO). Después de la evaporación del disolvente, se colocó un espaciador de teflón entre los dos vidrios revestidos para formar una cámara cerrada que se llenó con la solución de expansión (sacarosa 0,2 M). Las placas se sometieron a un campo eléctrico alterno de 2 V y 10 Hz de frecuencia durante 1 h. La solución que contenía las GUV se recolectó y se diluyó 10 veces en una solución de glucosa 0,2 M (osmolaridad medida en un osmómetro Osmomat Gonotec 030) que contenía concentraciones crecientes delbioemulsionanteBE278 liofilizado(0,14, 0,28, 0,57 y 2,34 mg/mL). Las muestras se observaron inmediatamente por microscopía óptica en un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200 (Jena, Alemania) equipado con una cámara digital Zeiss AxioCam (Jena, Alemania). Se utilizó un objetivo Ph2 63x en modo contraste de fase y fluorescencia (iluminación con lámpara de mercurio HBO 103W con filtro ajustado con excitación a 540-552 nm y banda de emisión a 575-640 nm). En este último, se emplearon POPC GUV que contenían 0,2% en moles de DOPE-Rodamina.

1.2.4. Análisis de los datos

Todos los experimentos se realizaron tres veces y cada ensayo independiente se realizó por duplicado. Los resultados se expresan como la media. El programa Microsoft® Officce Excel® 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Estados Unidos) se utilizó para construir los gráficos. Los datos experimentales se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95 %.

Los efectos principales y la interacción entre los componentes del medio de producción se evaluaron mediante un diseño factorial completo 2^3. La notación "+" y "-" se utilizó para representar la "presencia" o "ausencia" de cada componente en el medio.

3.3. Resultados y Discusión

3.3.1. Screening de genes estructurales de enterocina por PCR

Se realizaron amplificaciones por PCR en el ADN genómico de *E. mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 para averiguar la presencia de genes de bacteriocinas estructurales en el genoma de las BL seleccionadas. El gen estructural de la enterocina KS se amplificó en el genoma de las 4 cepas. El gen estructural de la enterocina B estuvo presente en las cepas *E. mundtii* Tw802 y Tw807. En cambio, ninguno de los genes estructurales de las enterocinas A, P, L50A, Q, Bact 96, 31, 1071 A/B y HirJM 79 pudo amplificarse.

Las metodologías moleculares son importantes en los estudios de antagonismo porque permiten la identificación de genes codificadores de bacteriocinas y secuencias de genes que codifican metabolitos antimicrobianos. La secuenciación genética con el perfil enzimático de las bacteriocinas en este estudio demostró la presencia de genes estructurales de bacteriocinas que codificaban para mundticina KS, a lo observado por otros autores (Ogaki, 2016; Delcarlo y col., 2019).

3.3.2. Purificación y caracterización de bacteriocinas por HPLC y espectrometría de masa

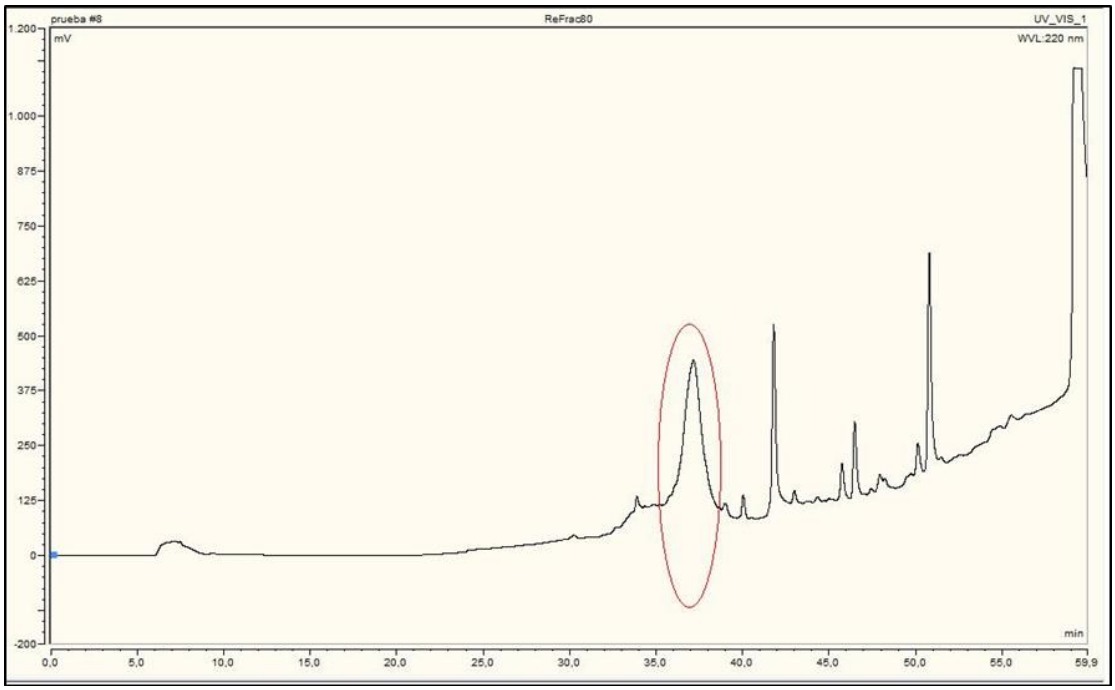
Las bacteriocinas son secretadas en el medio de cultivo, pero debido a sus características catiónicas y sus puntos isoeléctricos altos, una gran proporción permanece unida a la pared celular de las bacterias productoras. El tratamiento agresivo de las células, como el calentamiento por 30 min a 70 °C y la exposición a pH 1,5 por 24 h, constituyen estrategias para liberar las proteínas de la pared sin causar la ruptura celular (Rosa y col., 2002; Fimland y col., 2006).

Para conseguir una mejor purificación de la bacteriocina producida por *E. mundtii* Tw56 se llevó a cabo RP-HPLC como se indica en la sección 3.2.3. Se realizaron dos corridas de HPLC del extracto antilisteria de *E. mundtii*Tw56, obtenido según lo descripto en la sección 3.2.3. En primer lugar, se utilizó una columna µBondapack C18 (Waters) eluída con un gradiente lineal del 0-100% de metanol. Las fracciones con actividad antimicrobiana se concentraron y luego de evaporar el metanol se sometieron a una

segunda cromatografía en diferentes condiciones a fin de asegurar su pureza. Para ello se empleó una columna WatersXTerra MS C8 de 5 µm (4,6 x 250 mm) eluída con un gradiente lineal de 0-100% de acetonitrilo (Fig. 3.3). Ambas corridas se llevaron a cabo usando un flujo de 0,5 mL/min. La elución se siguió por absorbancia a 220 nm y se determinó la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas para identificar aquellas en las cuales eluía la bacteriocina.

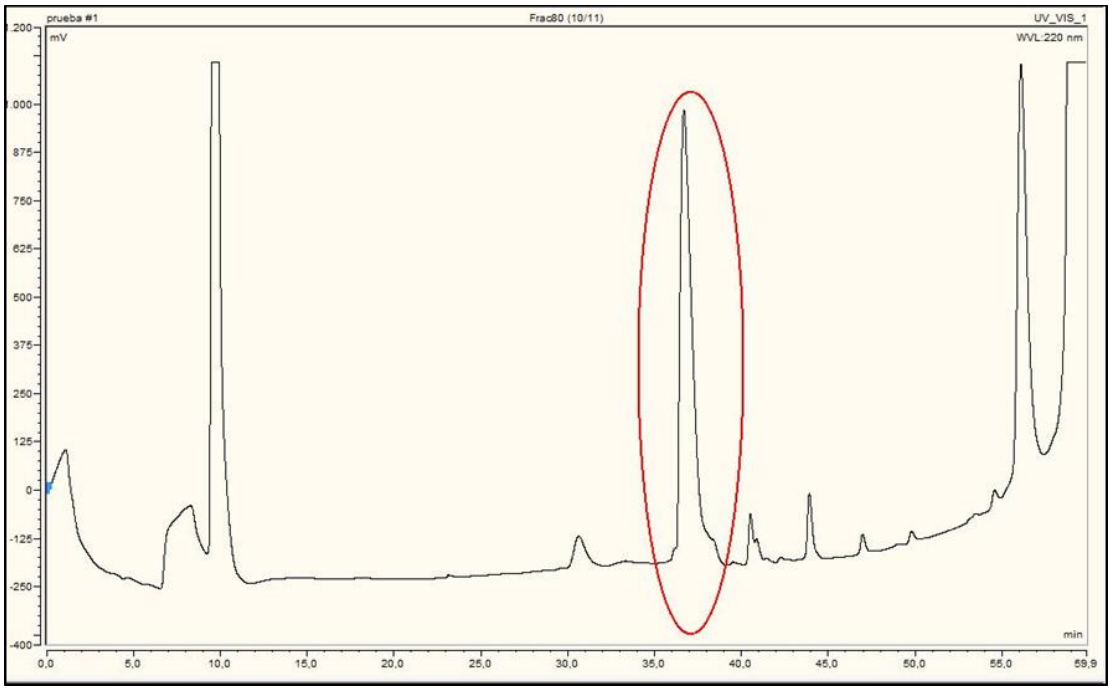
La figura 3.3 corresponde a la recromatografía en la columna C8, donde se observa un pico que eluye con un tiempo de retención de 37,5 min que presentó actividad antilisteria. Las fracciones con actividad fueron concentradas y enviadas a analizar por espectrometría de masa (MS) en LANAIS PROEM - UBA CONICET (Buenos Aires, Argentina). Sin embargo, no se pudo observar por ninguna señal que pudiera corresponder a un péptido antibacteriano.

Figura 3.3 Segunda corrida en HPLC de la fracción 80% del extracto antilisteria de *Enterecoccus mundtii* Tw56.



Posteriormente se realizó una segunda extracción ácida del sobrenadante de la misma cepa, *E. mundtii* Tw56. Se realizó el mismo tratamiento que se detalló antes para la muestra con la diferencia que la primera corrida de HPLC se llevó a cabo usando la columna XTerra C8 ya descripta. En la figura 3.4 se puede ver también un pico bien diferenciado que eluye con el mismo tiempo de retención de 37,5 min que fue enviado para realizar MS y análisis de aminoácidos, los cuales se encuentran en proceso.

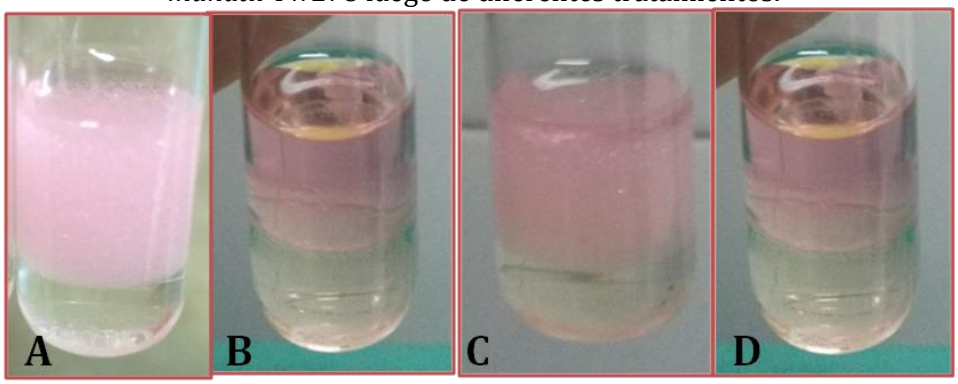
Figura 3.4 Corrida en HPLC de la Fracción 80% del extracto antilisteria de *Enterococcus mundtii* Tw56.



3.3.3. Caracterización y propiedades del bioemulsionante BE278 producido por *E. mundtii* Tw278

En cuanto a la naturaleza química, el bioemulsionante producido en medio LAP_{LW} retuvo el 100% de su capacidad emulsionante después del tratamiento lipolítico, mientras que la digestión con proteinasa K e hidrólisis ácida lo destruyó por completo (Fig. 3.5). Estos resultados sugieren que esta biomolécula podría tener tanto fracciones de proteína como de azúcar. El análisis cuantitativo del extracto BE278 reveló una concentración de proteína de 4,7 g/L y 0,92 g/L de azúcares reductores.

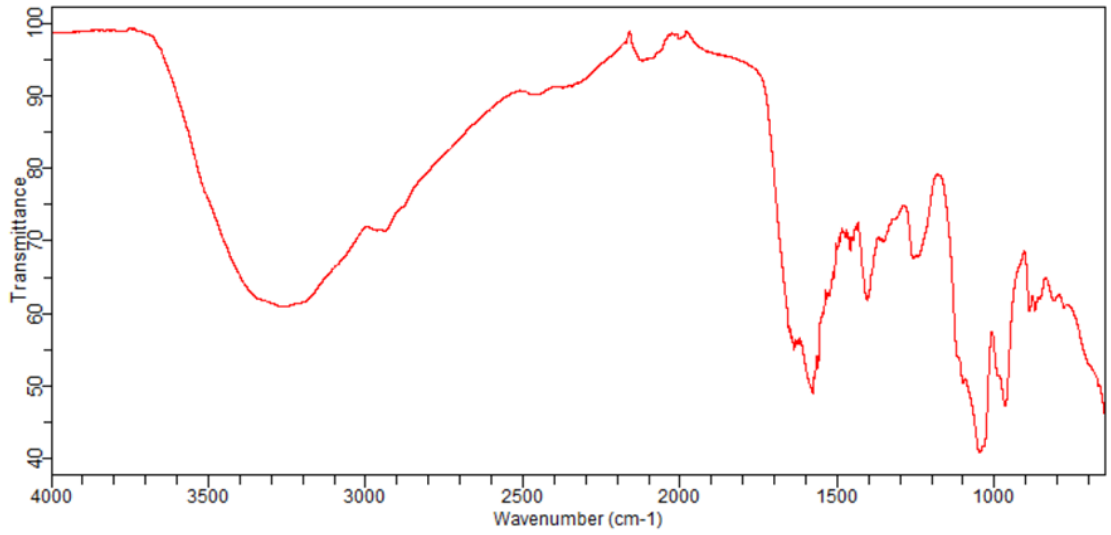
Figura 3.5 Caracterización del bioemulsionante BE278 producido por *Enterococcus mundtii* Tw278 luego de diferentes tratamientos.



A: Control positivo; B: BE tratado con proteinasa K; C: BE tratado con lipasa; D: BE tratado con HCl.

El espectro obtenido por FTIR (Fig. 3.6) revela una posible combinación de carbohidratos y proteínas, lo que concuerda con los resultados obtenidos con los ensayos previos. Además, muestra el perfil característico de los BS/BE extraídos de BL (Moldes y col., 2013; Vecino y col., 2013; Gudiña y col., 2015a; Vecino y col., 2015; Lara y col., 2020). Se observa una banda ancha en el rango 3500-3200 cm^{-1} que puede deberse al solapamiento del estiramiento del enlace intra e inter O-H de las moléculas de azúcar presentes y a la presencia de NH_2 de aminoácidos. La banda débil a 2900 cm^{-1}, así como la de 1403 y 1385 cm^{-1} detonan la presencia de estiramiento C-H correspondientes a grupos CH_2 y CH_3 de cadenas alifáticas. Una banda a 1630 cm^{-1} debido al estiramiento de C=O (Amidas I) y otra a 1570 cm^{-1} de las vibraciones de flexión de enlaces N-H (Amidas II). Además, aparece una banda a 1057 cm^{-1} (estiramiento de enlaces C-O), característica de los polisacáridos.

Figura 3.6 Espectro IR del bioemulsionante BE278 producido por *Enterococcus mundtii* Tw278.



3.3.3.1. Evaluación de la toxicidad y estabilidad del bioemulsionante producido por *E. mundtii* Tw278

Teniendo en cuenta que las moléculas anfifílicas, como los tensioactivos y los emulsionantes, pueden afectar la integridad de las membranas biológicas, en el presente trabajo se evaluaron los efectos tóxicos potenciales del bioemulsionanteBE278 utilizando como prueba la línea celular Caco-2. Los porcentajes de viabilidad celular obtenidos después de 3 h de exposición se muestran en la Tabla 3.2. Cabe destacar que la viabilidad celular obtenida después de la exposición albioemulsionante no difirió significativamente de la del control con agua(CA).

Tabla 3.2 Viabilidad de las células Caco-2 expuestas al bioemulsionante producido por *Enterococcus mundtii* Tw278.

Muestra	Viabilidad Celular (%)
BE	86,88 ± 6,78[b]
CV	100 ± 0,00[a]
CA	78,58 ± 1,38[b]

BE: bioemulsionante producido por *E. mundtii* Tw278 en medio LAP_{SL}; CV: control de viabilidad; CA: control de agua.

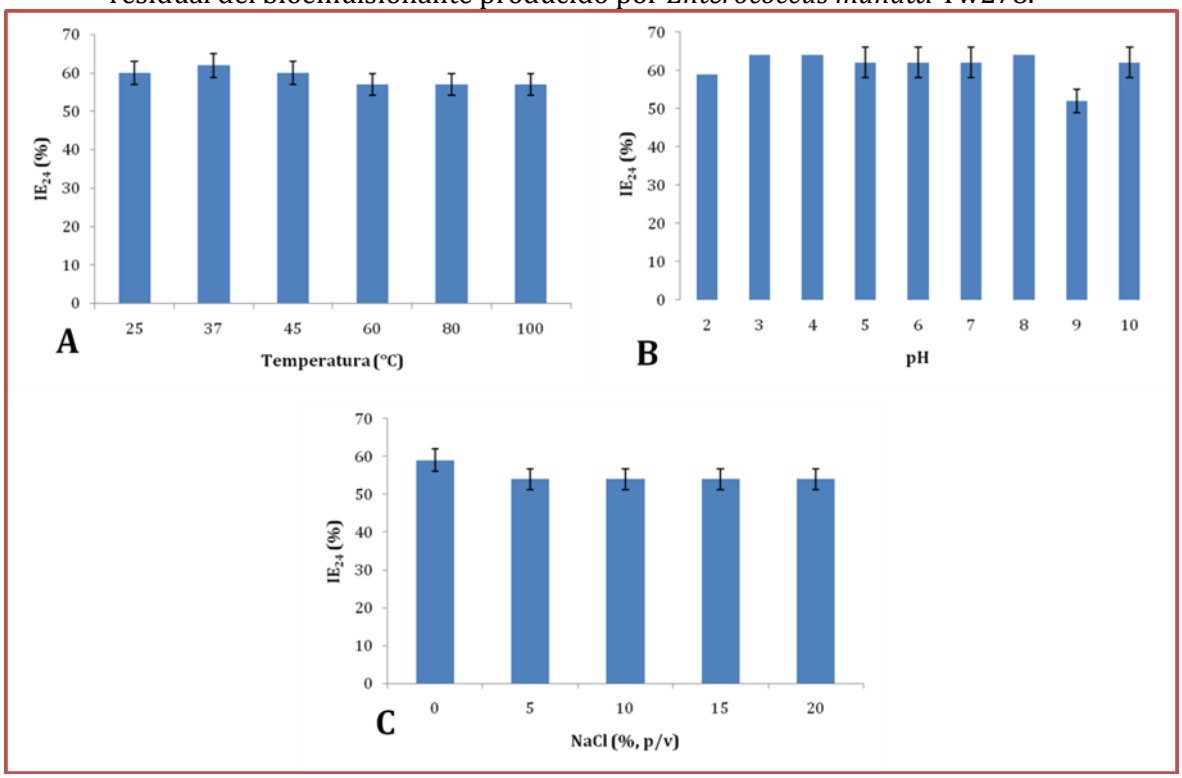
A menudo se supone que la mayor seguridad de los productos biológicos es una consecuencia directa de su origen natural. No obstante, cualquier intervención planificada en entornos naturales requiere estudios previos de toxicidad dela biomolécula para la evaluación de los riesgos asociados a su uso rutinario (Kar y col., 2020; Soltani y col., 2021).

Los resultados del control de la toxicidad dependen en gran medida de los organismos de prueba utilizados. Las células Caco-2 se han utilizado ampliamente como modelo de transporte intestinal y estudios de toxicidad debido a su alta permeabilidad y sensibilidad (Chen y col., 2016); por lo tanto, cumplen con los requisitos para ser utilizados como un indicador confiable para probar la seguridad de cualquier sustancia. Los hallazgos concuerdan con los estudios de toxicidad informados en la literatura. Por ejemplo, Camacho-Chab y col. (2013) evaluaron la toxicidad de un bioemulsionante producido por *Microbacterium* sp. MC3B-10 (Microbactan) y dos tensioactivos sintéticos no iónicos (Triton X-100 y Tween 80). El efecto de letalidad causado al 50% de una población de *Artemia salinanauplii* utilizada como organismo indicador se expresó como la concentración letal (CL50), que fue de aproximadamente 100 ± 3,8 µg/mL para Triton X-100 y >1000 µg/mL para Microbactan. Por otro lado, la línea celular de fibroblastos de ratón (ATCC L929) fue útil para realizar una evaluación comparativa de la citotoxicidad de un biosurfactante producido por *Lactobacillus helveticus* a partir de suero de queso y el surfactante iónico dodecilsulfato de sodio (SDS) (Sharma y col., 2014). Los autores informaron una viabilidad de alrededor del 43 % a 6,25 mg/mL para el biosurfactante y del 35,99 % para SDS. Del mismo modo, Gudiña y col. (2015b) evaluaron la toxicidad del bioemulsionante producido por *Paenibacillus* sp. #510 y de tres tensioactivos químicos (Glucopone® 650, Findet® 1214 N/23 y LAS) usando *V. fisheri* como organismo de prueba. También se encontró que el producto biológico presentaba una menor toxicidad contra la bacteria bioluminiscente que los tensioactivos sintetizados químicamente.

La conformación y los grupos funcionales de las biomoléculas están influenciados por factores como el pH, la temperatura y la concentración de sal. Sin embargo, la estabilidad de un producto bajo una amplia gama de condiciones ambientales es un

atributo muy deseable, ya que determina en gran medida sus aplicaciones. Por lo tanto, en el presente trabajo también se evaluaron los efectos de la temperatura, el pH y la concentración de sal en la estabilidad del bioemulsionanteBE278(Fig. 3.7). Se observó que el bioemulsionante producido fue termoestable, con IE_{24} residual sin cambios en comparación con el control para todas las temperaturas probadas (Fig. 3.7A). Este resultado concuerda con el estudio de Hayder y col. (2014), quienes informaron sobre la estabilidad del BE producido por la actinobacterium *Streptomyces* sp. SS20 después de ser calentado a 100 °C. Del mismo modo, Gudiña y col. (2015b) encontraron que el tratamiento térmico a 100 °C no redujo la actividad del BE obtenido de *Paenibacillus* sp. #510. En un estudio reciente, Rulli y col. (2019) también destacaron la termoestabilidad de un BE producido por una cepa ambiental de *Bacillus* en un rango de temperatura de 25 a 100 °C. Por el contrario, otros emulsionantes microbianos como el producido por *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 a partir de glicerol/L-asparagina o el Microbactan obtenido a partir de *Microbacterium* sp. MC3B-10 fueron reportados como sensibles a los cambios de temperatura (Colin y col., 2013; Camacho-Chab y col., 2013).

Figura 3.7 Efecto de la temperatura (A), pH (B) y concentración de sal (C) sobre el IE_{24} residual del bioemulsionante producido por *Enterococcus mundtti* Tw278.



BE: Bioemulsionante producido por Enterococcus mundtti Tw278 en medio LAP_{SL}.
Las barras representan la desviación estándar calculada a partir de al menos tres experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA).

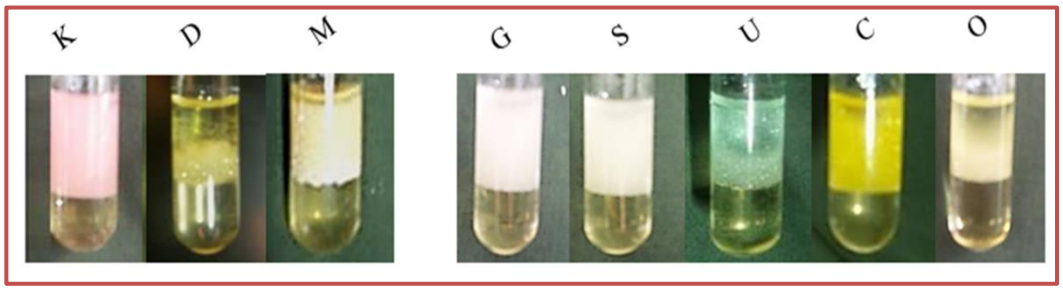
Con respecto a los efectos del pH, el IE_{24} residual no sufrió cambios significativos en comparación con el control para todos los valores probados (Fig. 3.7B). Una respuesta muy variable de los bioemulsionantes, en términos de estabilidad frente a los cambios de pH, se encuentra en la literatura. Por ejemplo, algunas biomoléculas exhibieron una mayor capacidad emulsionante a pH ácido (Hayder y col., 2014), mientras que otros tuvieron un desempeño óptimo en condiciones alcalinas (Khopade y col., 2012; Camacho-Chab y col., 2013). En otros casos, los bioemulsionantes solo fueron estables a valores de pH neutro (Vecino Bello y col., 2012) o se presentaron como productos muy estables en un amplio espectro de pH, como lo producido por *E. mundtii* Tw278 (Colin y col., 2013; Gudiña y col., 2015b; Rulli y col., 2019).

Los efectos de la concentración de NaCl en el IE_{24} residual del bioemulsionanteBE278 se muestran en la Fig. 3.7C. El bioemulsionante retuvo más del 90% de la capacidad emulsionante detectada en el control (ausencia de sal) para todas las concentraciones ensayadas. Esta tolerancia al NaCl podría aumentar el rango de aplicaciones dela biomolécula, incluso en condiciones de altas concentraciones de sal. Algunos bioemulsionantes fueron reportados en la literatura como tolerantes a concentraciones de NaCl de hasta 200–300 g/L (20–30 %, p/v) (Monteiro y col., 2010; Gudiña y col., 2015b). Sin embargo, las propiedades emulsionantes de otras biomoléculas se inhibieron significativamente, incluso a concentraciones de NaCl inferiores a 100 g/L (10 %, v/v) (de Sousa y Bhosle, 2012; Khopade y col., 2012; Camacho-Chab y col. al., 2013; Hayder y col., 2014).

3.3.3.2. Capacidad emulsionante frente a diferentes sustratos hidrófobos

En el presente trabajo se evaluaron las propiedades emulsionantes del bioemulsionante BE278 contra diferentes sustratos hidrófobos (Fig. 3.8).

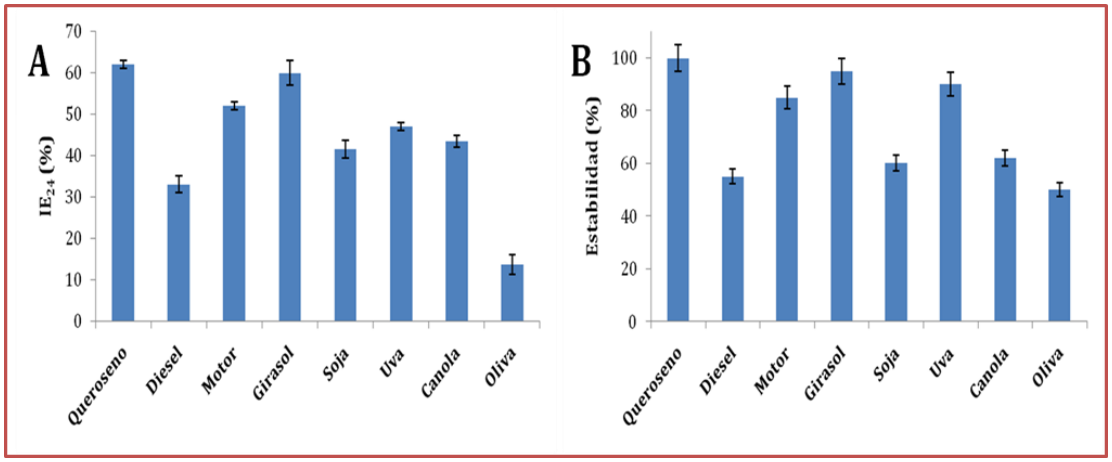
Figura 3.8 Emulsiones formadas empleando el bioemulsionante producido por Enterococcus mundtii Tw278 frente a diferentes sustratos hidrófobos.



K: queroseno; D: diesel; M: aceite de motor; G: aceite de girasol: S: aceite de soja: U: aceite de uva; C: aceite de canola;O: aceite de oliva.

Los valores de IE_{24} y S para cada sustrato se muestran en la Fig. 3.9. El bioemulsionanteBE278 mostró una capacidad diferente según el sustrato hidrófobo. Para los hidrocarburos, un promedio de IE_{24} de 62 ± 1 % para queroseno, 52 ± 1 % para aceite de motor y 33 ± 2 % para diésel (Fig. 3.9A). Para los sustratos naturales, el bioemulsionante exhibió unIE_{24} de 60 ± 3% para aceite de girasol, 47 ± 1 % para aceite de uva, 43,5 ± 1,5 % para aceite de canola, 41,6 ± 2,19 % para aceite de soja y 13,7 ± 2,4 % para aceite de oliva (Fig. 3.9A). En cuanto a los valores de S, el bioemulsionanteBE278 formó emulsiones estables con queroseno, aceite de motor, de girasol y de uva, presentando valores superiores al 80 % tras un reposo de 7 días (Fig. 3.9B). Para los demás sustratos, formó emulsiones estables, reteniendo al menos el 50 % de la altura inicial de la emulsión después del período de reposo (Fig. 3.9B).

Figura 3.9 Índices de emulsificación (A) y estabilidad de las emulsiones (B) ensayadas frente a diferentes sustratos hidrófobos.



Además del poder emulsionante de un determinado producto, otra característica muy deseable es su capacidad para formar emulsiones estables con una amplia variedad de sustancias hidrófobas. Esta característica se logra a través de la estrecha vinculación del bioemulsionante con los sustratos hidrofobos dispersos en un ambiente acuoso, y está involucrada en la prevención de mecanismos como la sedimentación, la agregación o la coalescencia, que de otro modo descompondrían una emulsión (Bautista Villarrealy Álvarez Nava, 2019).

La estabilización de la emulsión se ha atribuido a la gran cantidad de grupos reactivos expuestos en las estructuras de los bioemulsionantes (Uzoigwe y col., 2015). A su vez, el número de grupos reactivos depende de la naturaleza química del bioproducto, la cual se ve afectada por el microorganismo productor y las condiciones de producción (Colin y col., 2013; 2017). Se ha demostrado que las proteínas presentes en los bioemulsionantes desempeñan un papel importante en la emulsificación con

hidrocarburos y aceites, tanto como potenciadores en un complejo polisacárido-proteína como emulsionantes independientes (Navon-Venezia y col., 1995; Yadavy col., 2012; Markande y col., 2013). Los presentes resultados demostraron que el bioemulsionante de *E. mundtii* Tw278 producido en el medio LAP_{SL} tiene una gran capacidad para formar emulsiones estables con diferentes sustratos hidrófobos, por lo que representa un candidato potencial para ser utilizado en una variedad de aplicaciones biotecnológicas e industriales.

Otros autores realizaronestudios de la capacidad emulsionante de productos microbianos y sintéticos, encontrando respuestas muy variables según cada producto y el tipo de sustrato ensayado. Por ejemplo, Monteiro y col. (2010) reportaron que las actividades emulsionantes sobre tolueno de las biomoléculas obtenidas de las cepas de levadura *Trichosporon montevideense* CLOA70 y *T. loubieri* CLV20 no variaron estadísticamente de los surfactantes sintéticos comerciales Tween 80 y Triton X-100. Sin embargo, Camacho-Chab y col. (2013) encontraron que estos dos productos comerciales eran más eficientes que el microbactan de *Microbacterium* sp. MC3B-10 en sustratos emulsionantes sintéticos (benceno, xileno, aceite de motor, crudo y aceite mineral) y naturales (aceites de girasol, maíz y oliva). Vázquez-Vázquez y col. (2017), encontraron mayor capacidad emulsionante dela biomolécula de *Acinetobacter bouvetii* UAM25 que la de Triton X-100, cuando se probó frente a hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, pireno y fenantreno) o sus mezclas. Rulli y col. (2019) también reportaron la mejor capacidad emulsionante de una biomolécula sintetizada por una cepa de *Bacillus* en comparación con los agentes comerciales SDS, Tween 80 y goma arábiga, cuando se probó contra hidrocarburos (queroseno, tolueno y cloroformo), pesticidas organoclorados (lindano, metoxicloro y clordano) y aceites usados.

Por último, se observaron las emulsiones formadas por el SLC y del extracto concentrado (10x) frente a aceite de girasol, a los 7 días de haberse formulado, a través de un microscopio óptico, usando la lente 10x (Fig. 3.10). Los valores de IE_{24} obtenidos fueron 61,76 ± 4,16 %y 64,71 ± 1,40 %, respectivamente, con una S del 95 %.

Como se observa en la Fig. 3.11, las emulsiones formadas por el BE 278 se pueden considerar emulsiones polidispersas, ya que están compuestas por gotitas con diferentes tamaños de partícula, observando una menor dispersión en la distribución del tamaño de las mismas cuando se emplea el concentrado 10x, con un rango comprendido entre 25 y 50 μm. El tamaño medio de las partículas de las emulsiones oscila entre 100 nm y 100 μm (McClements y col., 2009; Tran, 2011), por lo que la emulsión formada por el concentrado 10x se encuentra dentro de este rango. Sin embargo, esto no es condicionante, ya que algunas de estas pueden llegar a presentar tamaños tanto superiores como inferiores a los

descritos (McClements y col., 2009; Tran, 2011) como lo observado en el caso de la emulsión obtenida con el SLC.

Figura 3.10 Fotografías microcóspicas de las emulsiones formadas por el SLC (A) y del extracto concentrado 10x (B) del bioemulsionante BE278 producido por *Enterococcus mundtii* Tw278 frente a aceite de girasol.

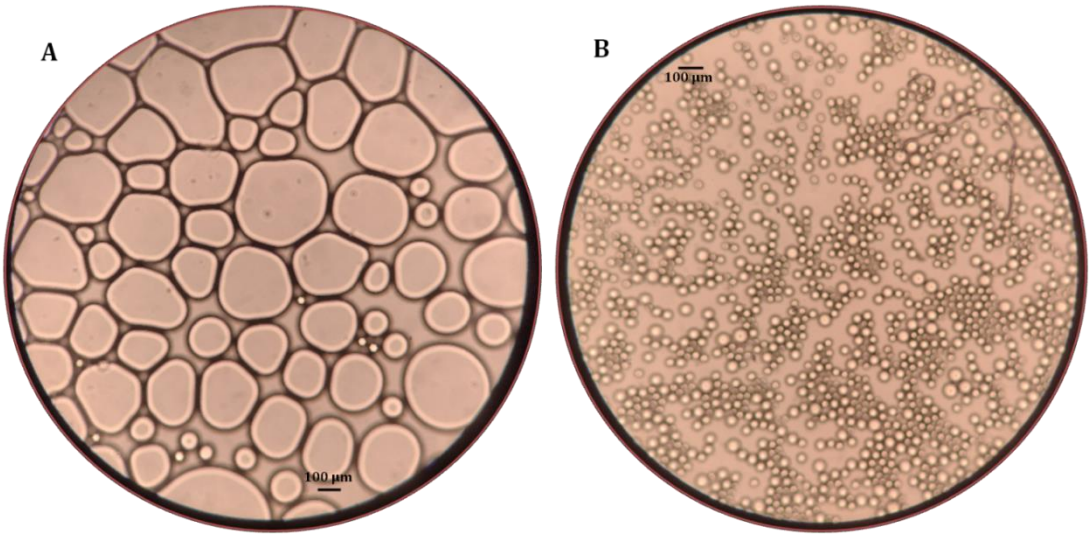
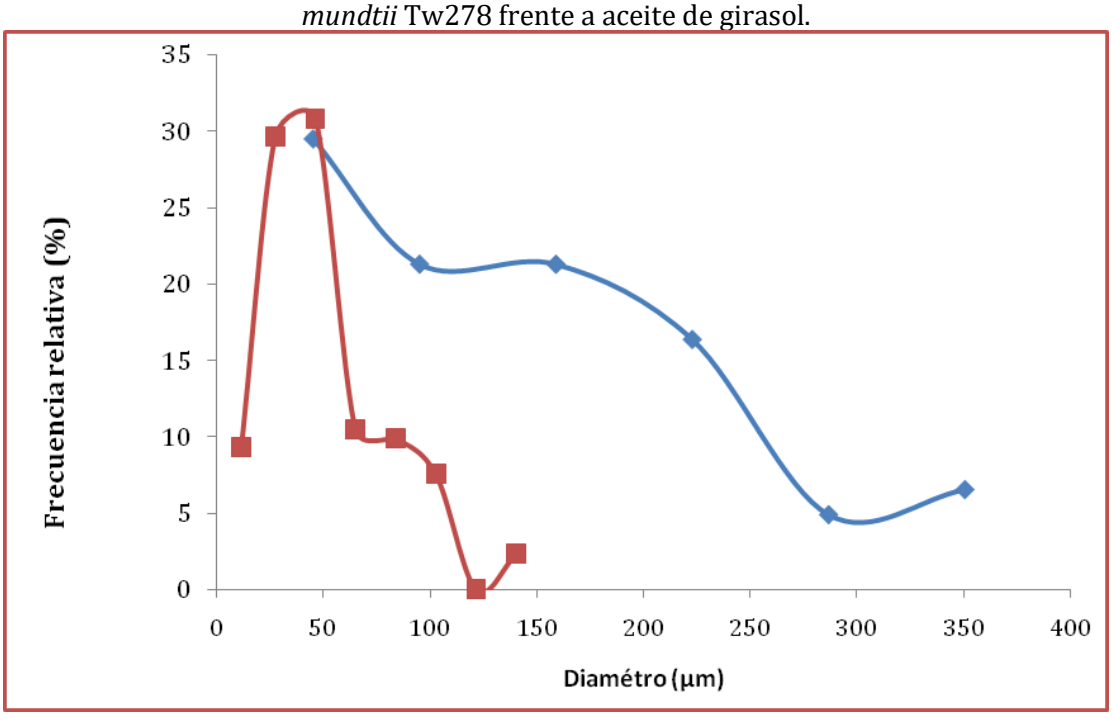


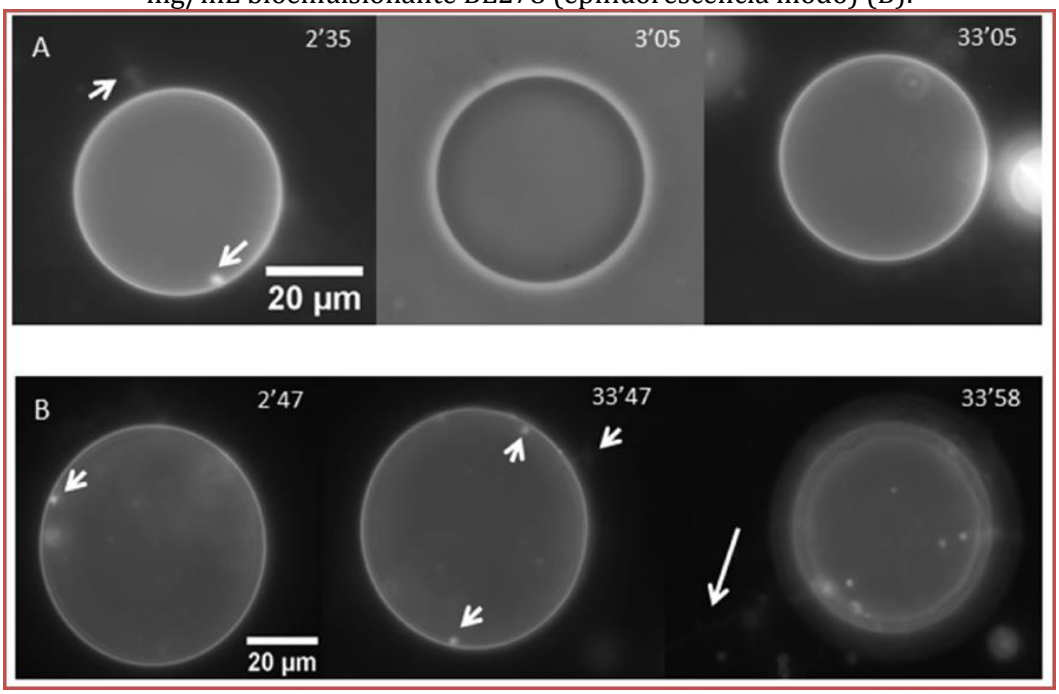
Figura 3.11 Distribución del tamaño de las partículas de las emulsiones formadas por el SLC y el extracto concentrado 10x del bioemulsionante BE278 producido por *Enterococcus mundtii* Tw278 frente a aceite de girasol.



3.3.3.3. Efecto bioemulsionante en vesículas unilamelares gigantes

En el presente trabajo, se utilizó contraste de fase y microscopía de fluorescencia para detectar, en tiempo real, cualquier cambio topológico inducido por el bioemulsionante BE278 de *E. mundtii* Tw278 en POPC GUV (Fig. 3.12).

Figura 3.12 Secuencia representativa de POPC-GUV en contacto con 0,28 mg/mLbioemulsionante BE278 (epifluorescencia y modos de contraste de fase) (A), 2,34 mg/mL bioemulsionante BE278 (epifluorescencia modo) (B).



El tiempo representa el tiempo de incubación y las flechas indican la formación de brotes y filamentos de membrana. La última imagen del panel B muestra el GUV desenfocado para enfatizar la emisión de filamentos largos que permanecen unidos al GUV original como respuesta a la influencia de BE en la bicapa lipídica.

Los efectos dela biomolécula sobre la membrana fueron sutiles a las concentraciones probadas. De hecho, 0,14 mg/mL de bioemulsionante no provocaron modificaciones significativas en las GUV, que se mantuvieron estables durante 30 min de observación continua. Cuando las GUV se incubaron con 0,28 y 0,57 mg/mL de bioemulsionante, aparecieron pequeños brotes en la superficie de la membrana después de 3 min de contacto (Fig. 3.10A). Este resultado indica un aumento en la curvatura espontánea de la membrana, lo que podría estar asociado con la perturbación en la membrana externa inducida por el bioemulsionante, generando una diferencia en el área entre los foliolos. Finalmente, el aumento de la concentración de bioemulsionante hasta 2,34 mg/mL promovió la aparición de yemas, pero en mayor medida, mostrando la formación de largos filamentos unidos a la vesícula original después de un tiempo transcurrido de alrededor de 30 min (Fig. 3.10B). En todos los casos, las perturbaciones observadas fueron remodeladas rápidamente por la bicapa lipídica, ya que las GUV

permanecieron estables después. Los presentes resultados muestran que el efecto delbioemulsionante sobre la membrana biológica tuvo diferentes niveles dependiendo de la concentración ensayada. Sin embargo, la integridad de la membrana se conservó en el rango de concentración delbioemulsionante estudiado y no se detectó su solubilización. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Sudbrack y col. (2011), quienes encontraron que la tasa de incorporación de cualquier agente químico o biológico en una membrana y el cambio de forma inducido por ese agente dependen de la composición de la membrana y de la naturaleza del agente (Sudbrack y col., 2011). Un parámetro clave en la interacción de cualquier agente con las bicapas lipídicas es la velocidad de cambio del agente a través de la membrana, que depende en gran medida de su carácter anfifílico. Por ejemplo, Sudbrack y col. (2011) estudiaron los efectos sobre los POPC GUVs de dos agentes con diferente carácter anfifílico: Triton X-100 y el surfactante aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS). Los autores también encontraron distintas características de interacción de estos agentes con las bicapas, que se reflejaron en diferentes cambios morfológicos de las vesículas lipídicas. Mientras que la tasa de flip-flop casi instantánea del Triton X-100 (~0,5 s) aseguró su rápido equilibrio entre ambas láminas, provocando un aumento significativo en el área de la bicapa, SDS exhibió una tasa de flip-flop lenta debido a su grupo de cabeza cargado (minutos a horas); por lo tanto, solo se insertó en la monocapa externa. La incorporación asimétrica de moléculas de SDS impuso una tensión en la bicapa, lo que provocó un aumento en la curvatura espontánea hacia afuera, como se observó para el bioemulsionante de *E. mundtii* Tw278 en el presente trabajo.

A partir de nuestro estudio, se concluyó que los POPC GUV se utilizarán como un sistema de tamaño celular que sigue las modificaciones de membrana temporales inducidas por el bioemulsionante. Este hallazgo puede ser clave para el estudio de la dinámica de varios procesos de relevancia biológica que involucran bicapas lipídicas, incluido el acceso al sustrato hidrófobo por parte de las células microbianas.

Las emulsiones alimenticias son sistemas de composición, estructura y dinámicacomplejas y son variados los factores que contribuyen a sus propiedades en conjunto.Mucho del conocimiento que se tiene acerca de estos complejos sistemas se hadesarrolladoa partir de estudios sobre sistemas modelo sencillos; sin embargo, en losúltimos años hasurgido la necesidad de elucidar los factores que determinan laspropiedades de productosalimenticios basados en emulsiones reales. Por esta razón, los investigadores estánabordando ahora aspectos más complejos de este tipo de alimentos, tales como lasinteracciones entre ingredientes, los efectos de las condiciones de procesado y lascondiciones para la estabilidad de fases (Kosegarten-Conde y Jiménez-Munguía, 2012; Freire Rodríguez, 2018; Paz Yépez, 2019).

3.4. Conclusiones Parciales

- Fue detectado el gen estructural para la bacteriocina mundticina KS en las 4 cepas seleccionadas. Además, se detectó el gen de la enterocina B en las cepas de *E. mundtii* Tw802 y Tw807.
- El bioemulsionanteBE278 obtenido demostró ser un producto no tóxico sobre células Caco2 y estable, con capacidad emulsionante sobre diferentes sustratos hidrófobos.
- Tanto las pruebas químicas como el análisis por FTIR, demuestran que el bioemulsionanteBE278 producido está compuesto por carbohidratos y proteína.
- El bioemulsionanteBE278 producido provocó modificaciones temporales en los POPC GUV, lo que demuestra su papel crítico en la ocurrencia de procesos que involucrarían a las membranas biológicas. Sin embargo, se necesitan más estudios sobre la interacción bioemulsionante-POPC GUV para explorar expresamente el papel de los bioemulsionantes en el acceso al sustrato hidrófobo a través de las membranas microbianas.

Capítulo IV

4.1. Introducción

4.1.1. Carne y productos cárnicos

El consumo per cápita de carne en países en vías de desarrollo se ha duplicado desde 1980, lo que se debe a que en los últimos años ha existido un enorme crecimiento demográfico, las preferencias alimentarias han cambiado y los ingresos han aumentado; por lo que, para el 2050 la producción de carne mundial se duplicará (FAO, 2019).

La carne y los productos cárnicos se consideran una fuente importante de proteínas, zinc, hierro y aminoácidos esenciales (FAO, 2019). Esta se define como un músculo esquelético y sus tejidos asociados (incluidos los nervios, tejidos conectivos, vasos sanguíneos, piel, grasa) son considerados inocuos y aptos para el consumo humano (Bohrer, 2017). La calidad de la proteína está determinada por las cantidades relativas de aminoácidos esenciales, es decir, aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano (Van Mierlo y col., 2017). Los tejidos profundos de los animales sacrificados en condiciones de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) son estériles desde el punto de vista práctico (Guerrero y Taylor, 1994; Rodríguez, 1996). Por ello, el perfil microbiológico de la carne fresca presentado a los consumidores es la suma de los cuidados durante las operaciones de faena, condiciones de almacenamiento, transporte y distribución.

La carne (principalmente la cruda) además de ser altamente susceptible a deterioro, también puede constituir un vehículo para la propagación de ETAs (Bhandare y col., 2007). Durante el sacrificio y procesamiento, todos los tejidos potencialmente comestibles pueden estar sujetos a contaminación por diversas fuentes, ya sea interna o externa al animal. En animales vivos, las superficies en contacto con el medio ambiente albergan una variedad de microorganismos, por lo que en muchas ocasiones los contaminantes se derivan de la piel del animal, o bien, de aquellos presentes en heces. Sin embargo, se ha determinado que las carnes procesadas son más susceptibles a contaminarse con microorganismos patógenos durante las diferentes etapas de su procesamiento (Datta y col., 2012). La presencia de patógenos en la cadena de producción de un alimento, aún en bajos números, es indeseable y se considera como la mayor causa de enfermedades gastrointestinales alrededor del mundo (McDonald y Sun, 1999).

Para tratar de determinar la calidad microbiológica de la carne, frecuentemente se utiliza la búsqueda y cuantificación de microorganismos indicadores, los cuales, aunque pueden no ser patógenos, su presencia indica la probabilidad de que también pueden estar presentes microorganismos patógenos (Wolffs y Radstrom, 2006). Estas determinaciones incluyen el recuento de bacterias mesófilas, coliformes totales, bacterias del grupo *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Estreptococos fecales* y *Aeromonas* sp. (Algino y col.,

2009); aunque también se ha sugerido incluir en este rubro de indicadores a bacterias como *Listeria* spp., *Enterococcus* y Bifidobacterias (Gill y Jones, 1995; Delcenserie y col., 2008).

Los microorganismos patógenos que históricamente se han asociado a brotes por el consumo de carne, incluyen *Salmonella* sp., *E. coli* O157:H7 y no-O157 productoras de toxina shiga (STEC), *Listeria* sp., *Campylobacter* sp., *Clostridium perfringens* y *Yersinia*sp., aunque los primeros tres se ha reportado que actualmente son los más importantes como patógenos en carne de res (Koohmaraie y col., 2005). Se ha establecido que para algunos microorganismos tales como *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Clostridium* spp, las principales medidas para lograr su control se enfocan en intervenciones durante las últimas etapas de la producción de la carne (Nørrung y col., 2009).

Dada la importancia de esta situación las agencias de vigilancia en temas de salud y control de enfermedades de los Estados Unidos como FDA, Food Safety and Inspection Service (FSIS) del United States Department of Agriculture (USDA) y los CDC, han caracterizado bajo una de las categorías a los alimentos listos para el consumo que tienen un alto riesgo de asociarse con listeriosis debido a que facilitan el crecimiento del microorganismo causante. El FSIS agrupa en cárnicos y aves, los alimentos como salchichas, ensaladas, patés, perros calientes, salamis, peperonis, jamones cocidos, jamones curados, prosciutto, rollos de carne, carnes en tajadas, carnes para untar, carnes cortadas en porciones, carnes molidas, hamburguesas, presas de pollo, nuggets de pollo, tajadas de jamón de carne de pollo y de pavo, pizzas, rollos de huevo, sándwiches, ensaladas y otros (FSIS, 2017).

4.1.2. Yogur

El yogur es un alimento lácteo fermentado con una alta densidad nutricional, altamente consumido en todo el mundo (Panahiy col., 2017), su consumo está ligado a hábitos saludables, confiriendo beneficios a la salud humana por su alto contenido en calcio, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales (Xavier y col., 2014). En el mercado se encuentra una gran variedad de presentaciones disponibles, las mismas difieren en textura (líquido, firme, suave), contenido de grasa (de lujo, bajo en grasa, prácticamente sin grasa) y sabores (natural endulzado o no, saborizado con frutas, con cereales) (Shah, 2003; McKinley, 2005).

Se elabora tradicionalmente a partir de la fermentación de la leche, espontánea o inducida (Widyastuti y col., 2014). Básicamente, el yogur se puede clasificar en dos grupos, que son el yogur de cultivo estándar y el bioyogur (Pandey y col., 2017). El yogur estándar normalmente se fabrica a partir de las cepas de cultivo iniciador convencionales, *L.*

delbrueckii subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* (Arena y col., 2015). Mientras tanto, el bioyogur se complementa con cepas probióticas como *Bifidobacterium* y *L. acidophilus* que, según se afirma, tienen numerosos beneficios para la salud y deberían permanecer vivas en cantidades adecuadas (Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001; Weerathilakey col., 2014; Baltova y Dimitrov, 2014; Chen y col., 2017).

El yogur se puede fabricar con o sin suplementos de derivados naturales de la leche (leche descremada en polvo, caseinatos o crema, concentrados de suero), la adición de azúcares (ejemplo: sacarosa, fructosa) y estabilizantes (pectina, almidón, gelatina, alginato) y mayor cantidad de sólidos en la leche mediante la adición de grasas y proteínas para alterar la textura y el sabor (Lee y Lucey, 2010). Por ejemplo, las proteínas y las grasas se agregan comúnmente para combatir los defectos en la textura,propiedades físicas y sensación en la boca del yogur bajo en grasa (Laiho y col., 2017). Mientras tanto, los estabilizadores de hidrocoloides como la carragenina, la gelatina, la goma xantana y el almidón modificado a menudo se agregan para mejorar la textura, la apariencia, la viscosidad, la consistencia, la sensación en la boca y para evitar la separación del suero en el yogur (Nguyen y col., 2017).

En general, los beneficios para la salud de los productos alimenticios fermentados se pueden clasificar en dos grupos, que son la función nutricional y la función fisiológica (Bell y col., 2017). El efecto nutricional está relacionado con la función de los alimentos en el suministro de suficientes nutrientes, mientras que la función fisiológica se relaciona con los beneficios profilácticos y terapéuticos (Marco y col., 2017). El consumo de yogur se ha asociado a la mejora del metabolismo de la lactosa, propiedades antimutagénicas, propiedades anticancerígenas, control de la hipertensión, estimulación del sistema inmunitario y la mejora de la enfermedad inflamatoria intestinal (Unal y Akalin, 2012; Shakerian y col., 2015) En respuesta a la conciencia de los consumidores de estos dos beneficios imperativos, los fabricantes están explotando la demanda produciendo variedades de productos alimenticios fermentados con propiedades funcionales adicionales (Siró y col., 2008). Los alimentos funcionales son actualmente parte del nuevo nicho de mercado y la industria continúa expandiéndose con ingredientes naturales como los motores más influyentes (da Silva y col., 2016;Balthazar y col., 2017; Granato y col., 2017). En particular, el procesamiento innovador de productos de yogur funcional incluye la adición de probióticos, prebióticos o su combinación, y la incorporación de varios componentes bioactivos de fuentes naturales para mejorar los valores nutricionales, el perfil sensorial, las características fisicoquímicas y reológicas, aumentar la seguridad microbiológica, así como para proporcionar propiedades terapéuticas (Fazilah y col., 2018).

Por otro lado, según los datos de la literatura consultada (Szczawiński y col., 1998; Lefoka, 2009) se puede concluir que *L. monocytogenes* tiene condiciones desfavorables para el crecimiento en yogur. Sin embargo, estas bacterias pueden sobrevivir en el producto final por un tiempo definido dependiendo del tipo deproducto, sus características (por ejemplo, pH, microflora competitiva), condiciones de almacenamiento (temperatura) y otras circunstancias ambientales. Cironey col. (2013) demostraron que bacterias patógenas como *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *E. coli* y *S. enteritidis* pudieron sobrevivir al proceso de fermentación durante la producción de yogur y no fueron inactivados por niveles bajos de pH seguidos de almacenamiento en frío durante al menos 20 días. Esto implica que cuando *L. monocytogenes* está presente en gran cantidad en la leche cruda, algunas células pueden sobrevivir al proceso de producción del yogur y representar un peligro grave para la salud de los consumidores.

En otras palabras, la presencia de *Listeria* en el yogur puede ser el resultado de una leche cruda de muy mala calidad, un tratamiento térmico inadecuado de la leche o una recontaminación como resultado del uso de aditivos contaminados y/o una higiene deficiente durante el procesamiento y el envasado (Dzwolak y col., 2000).

Por lo que deben implemenarse medidas que aseguren la calidad microbiológica de los alimentos, satisfaciendo la demanda de los consumidores por alimentos libres de conservantes químicos. Entre ellas, como se mencionó anteriormente se encuentra el empleo de bacteriocinas. Sin embargo, se debe tener en cuenta los efectos de posibles interacciones antagonistas entre los diferentes aditivos presentes cuando se adiciona una bacteriocina a un alimento (Bouttefroy y col., 2000), debido a que, en las matrices alimenticias, la actividad de la bacteriocina podría ser afectada por(Gänzle y col., 1999):

I. Cambios en la solubilidad y carga de las bacteriocinas.

II. Unión de las bacteriocinas a componentes del alimento.

III. Inactivación por proteasas.

IV. Cambios en la envoltura celular del microorganismo en estudio como respuesta a factores medioambientales.

Por lo expuesto, en el presente capítulo se evaluó la capacidad inhibitoria de los extractos antilisteria, así como de la producción *in situ* por las cepas de *E. mundtii* seleccionadas en diferentes modelos alimentarios, para controlar la población de *L. monocytogenes* Scott A.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Modelos Alimentarios

L. monocytogenes Scott A fue reactivada en medio líquido BHI a 37 °C por 18h. Después de la incubación, el cultivo fue centrifugado a 4618*g* por 10min, a 10 °C, removido el sobrenadante y las células lavadas en solución salina 0,85 % (v/v) estéril fueron utilizadas como inóculo de 10^3-10^4 UFC/mL o UFC/g, según corresponda, de *L. monocytogenes* Scott A en un modelo alimentario. Se probaron tres modelos alimentarios: PENG (Alves y col., 2003), de carne vacuna emulando hamburguesas (Acuña y col., 2015) y de yogur (Corbalán y col., 2021).Se trabajó con la incorporación del extracto antilisteria obtenido según la metodología descripta en la sección 3.2.2 vs el agregado del cultivo productor para inducir la producción de bacteriocinas *in situ* en los 3 modelos alimentarios.En las fracciones inoculadas con las cepas *E. mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 se verificó la producción de bacteriocina por la técnica descripta en la sección 2.2.2.

4.2.1.1. Evaluación de *E. mundtii* Tw56, Tw802, Tw807 y sus extractos antilisteria frente a *L. monocytogenes* Scott A en modelos alimentarios PENG y carne, emulando hamburguesas

El **modelo alimentario PENG** (Alves y col., 2003)está compuesto de 1,8 % de peptona, 1,2 % de extracto de carne, 0,6% de extracto de levadura, 2,0 % de almidón, 4 % de NaCl y 0,5% de D-glucosa, una vez pesados y diluidos, se sometió a calor para lograr la solubilización del almidón y luego se esterilizó en autoclave (121 °C, 15 min). Fue dividido en 13 fracciones de 15 mL. Cada una de las fracciones fue rotulada con letras de la A a la M, respectivamente y recibió el tratamiento detallado en la Tabla 4.1. Finalmente, las fracciones fueron almacenadas a 4 °C durante 15 días, se tomaron muestras en el día inicial, 5, 10 y 15 días para realizar el recuento de BL y de *L. monocytogenes* Scott A según lo descripto por Campos y col. (1997). Para los recuentos de UFC/mL se empleó el medio Oxford sólido(Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) para *L.monocytogenes* Scott A (37 °C por 48 h), MRS agar adicionado con 6,5 % (p/v) de NaCl y pH 5,5 para *E.mundtii* Tw56, Tw802 y Tw807(37 °C por 48 h).

Tabla 4.1. Diseño experimental para modelo alimentarioPENG.

Fracciones	*Listeria monocytogenes* Scott A (10^4 UFC/mL)	BL (10^7 UFC/mL)			Extracto antilisteria (10^4 UA/mL)		
		E. mundtii Tw56	*E. mundtii* Tw802	*E. mundtii* Tw807	Tw56	Tw802	Tw807
A control (+)	+	-	-	-	-	-	-
B control (-)	-	+	-	-	-	-	-
C control (-)	-	-	+	-	-	-	-
D control (-)	-	-	-	+	-	-	-
E control (-)	-	-	-	-	+	-	-
F control (-)	-	-	-	-	-	+	-
G control (-)	-	-	-	-	-	-	+
H	+	+	-	-	-	-	-
I	+	-	+	-	-	-	-
J	+	-	-	+	-	-	-
K	+	-	-	-	+	-	-
L	+	-	-	-	-	+	-
M	+	-	-	-	-	-	+

En el **modelo alimentario de carne**, emulando hamburguesas, las mismas fueron preparadas a partir de carne adquirida en una carnicería local. En primer lugar, se procedió a retirar en un flujo laminar, 5 mm (aproximadamente) de la superficie de la carne para reducir el número inicial de microbiota residente. La carne de res se cortó asépticamente en trozos pequeños con un cuchillo afilado esterilizado. Dado que la mayoría de los productos cárnicos procesados contienen cloruro de sodio para unir ingredientes, estabilizar y mejorar el sabor y el color, se agregó 1 % (p/p) de NaCl (Acuña y col., 2015). Luego, la carne picada fue fraccionada y colocada en bolsas estériles. Finalmente, cada bolsa fue inoculada de acuerdo a las fracciones detalladas en la Tabla 4.2. Las bolsas fueron mezcladas manualmente. Las hamburguesas se pesaron asépticamente (10 g) y se formaron a mano. Finalmente, fueron almacenadas en placas de Petri estériles a 4 °C por 15 días. Se realizaron recuentos de células viables a los 0, 1, 3, 5, 7, 10 y 15 días.

Cada hamburguesa (10 g) preparada anteriormente (A-N) se diluyó con 90 mL de agua peptonada estéril 0,1 % (p/v) y se homogeneizó durante 2 min manualmente. Se prepararon diluciones decimales y se sembró 1 mL de cada una en placas con los medios descriptos a continuación para cada cepa. Para los recuentos de UFC/g se empleó el medio Oxford sólido para *L. monocytogenes* Scott A(37 °C por 48 h), MRS agar adicionado con 6,5 % (p/v) de NaCl y pH 5,5 para *E.mundtii* Tw56, Tw802 y Tw807 (37 °C por 48 h) y finalmente PCA(Plate Count Agar**,** con la siguiente composición en g/L: peptona, 5,0; extracto de levadura, 2,5; glucosa, 1,0; agar 15; pH 7 ± 0,2) para mesófilos totales (30 °C por 48 h).

Tabla 4.2 Diseño experimental para modelo alimentariode carne vacuna, emulando hamburguesas.

Fracciones	*L.isteria monocytogenes* Scott A (10^4 UFC/g)	BL (10^7 UFC/g)			Extracto antilisteria (10^4 UA/g)		
		E. mundtii Tw56	*E. mundtii* Tw802	*E. mundtii* Tw807	Tw56	Tw802	Tw807
A control (-)	-	-	-	-	-	-	-
B control (+)	+	-	-	-	-	-	-
C control (-)	-	+	-	-	-	-	-
D control (-)	-	-	+	-	-	-	-
E control (-)	-	-	-	+	-	-	-
F control (-)	-	-	-	-	+	-	-
G control (-)	-	-	-	-	-	+	-
H	-	-	-	-	-	-	+
I	+	+	-	-	-	-	-
J	+	-	+	-	-	-	-
K	+	-	-	+	-	-	-
L	+	-	-	-	+	-	-
M	+	-	-	-	-	+	-
N	+	-	-	-	-	-	+

4.2.1.2. Evaluación de *E. mundtii* Tw278 y extracto antilisteria frente a *L. monocytogenes* Scott A en un modelo alimentario de yogur

El **modelo alimentario de yogur** se llevó a cabo mediante un diseño factorial completo (Tabla 4.3). Yogur natural fue elaborado a partir de leche pasteurizada (contenido graso 3 %, La Serenisima S.A., Buenos Aires, Argentina), la cuál se inoculó según las fracciones indicadas en la Tabla 4.3. Luego, se realizó la incubación a 42 °C por 8 h y posterior almacenamiento a 4 °C por 15 días.Se tomaron muestras en diferentes tiempos de almacenamiento (0, 0,3, 5, 10 y 15 días) para evaluar el conteo de células viables. Para los recuentos de UFC/g, se empleó Oxfordsólido para *L. monocytogenes* Scott A (37 °C durante 48 h), MRS agar adicionado con NaCl al 6,5 % (p/v) y pH 5,5 para *E.mundtii* Tw278 (37 °C durante 48 h), MRS agar pH 5,3 para *L. bulgaricus* (37 °C por 48 h) y finalmente MRS agar adicionado de 3 g/L de sales biliares para *S. termophilus* (37 °C durante 48 h).

4.2.1.2.1 Evaluación de Parámetros Fisicoquímicos. Los valores de pH de todas las fracciones se midieron con un medidor de pH (HI 9020, HANNA Instruments, Argentina). Las muestras de yogur se homogeneizaron en agua destilada con una proporción de 1:9 para la determinación del ácido titulable total (TTA) según lo descrito por Fazilah y col. (2019). Se utilizó la ecuación 4.1 para determinar el porcentaje de TTA en cada muestra.

Tabla 4.3 Diseño experimental para modelo alimentario de yogur

Fracciones	*Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842	*Streptococcus termophilus* b01	*Listeria monocytogenes* Scott A	*Enterococcus mundtii* Tw278	Extracto antilisteria Tw278
A	+	+	-	-	-
B	+	+	+	-	-
C	+	+	-	+	-
D	+	+	-	-	+
E	+	+	+	+	-
F	+	+	+	-	+

Ecuación 4.1. Acidez Titulable Total (ATT)

$$\text{Á}\boldsymbol{cido\ l\acute{a}ctico}\ (\%) = \boldsymbol{Df \times V\ NaOH \times 0,1\ N \times 0,009 \times 100}$$

Donde: Df: factor de dilución; V: volumen de NaOH requerido para neutralizar las muestras de yogur; N: normalidad del NaOH.

La sinéresis se determinó mediante un procedimiento de centrifugación (Santillán y Vélez, 2019), se centrifugaron 10 g de muestra a 1710,6$g$durante 20 min a 10 °C. La sinéresis se estimó como el suero liberado sobre el peso original (Ecuación 4.2).

Ecuación 4.2. Determinación de sinéresis de las muestras de yogur.

$$Sinéresis = \left(\frac{Peso\ supernadante}{Peso\ yogur}\right) \times 100$$

4.2.2. Análisis de los datos

Todos los experimentos se realizaron tres veces y cada ensayo independiente se realizó por duplicado. Los resultados se expresan como la media. El programa Microsoft® Officce Excel® 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Estados Unidos)se utilizó para construir los gráficos. Los datos experimentales se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95%.

4.3. Resultados y Discusión

L. monocytogenes se encuentra comúnmente en carnes, verduras y leche y es un importante patógeno transmitido por los alimentos que causa varios síndromes clínicos. La listeriosis se ha asociado con el consumo de una variedad de alimentos, incluidos quesos blandos, productos cárnicos y vegetales (Schlech y Acheson, 2000). Como se ha mencionado anteriormente, la capacidad de *Listeria* para crecer en una amplia gama de temperaturas (1 a 45 °C), pH bajo y la alta tolerancia a la sal dificulta su control en los alimentos (Aspri y col., 2017). Por lo tanto, el uso de bacteriocinaspara controlar *Listeria* sp. en los alimentos es un medio prometedor, ya sea producido *in situ* o agregado en las diferentes matrices alimentarias.

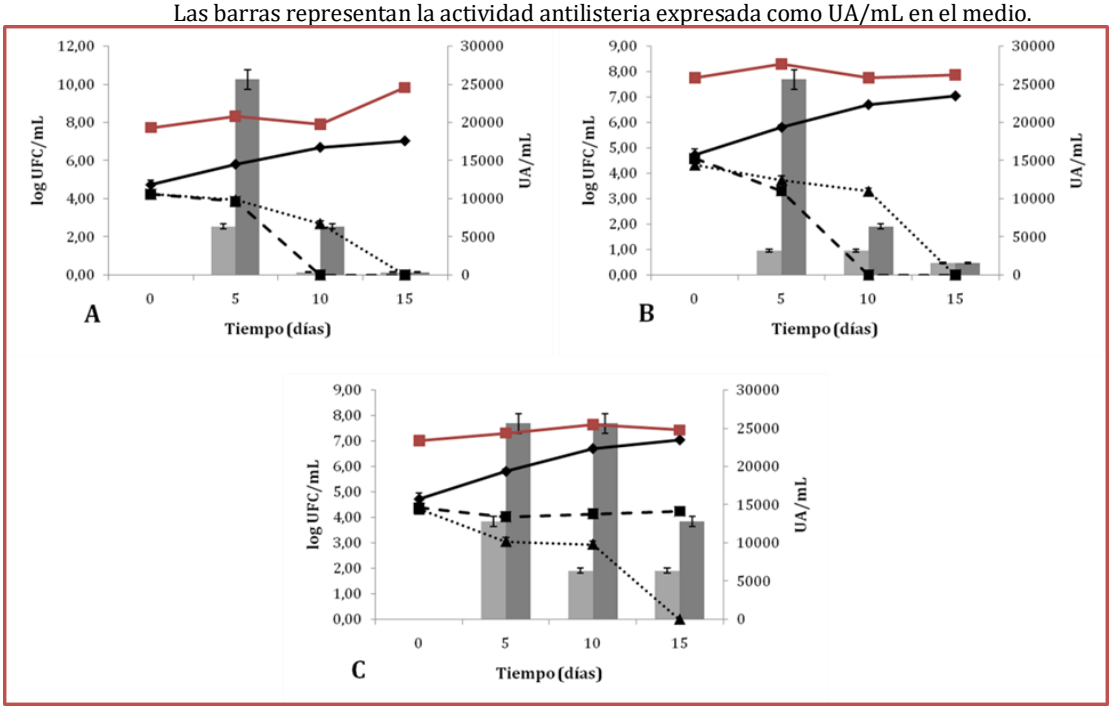
4.3.1. Modelo PENG y Hamburguesas

La carne y los productos cárnicos son muy sensibles al deterioro microbiano debido a sus propiedades ecológicas (a_w, pH y nutrientes) (Galvez y col., 2014).

Las figuras 4.1 y 4.2 muestran el efecto de extractos de cultivos bacteriocinogénicos o co-inoculación de *Enterococcus*, productores de bacteriocinas frente a *L.monocytogenes* Scott A en modelos alimentarios PENG y de carne vacuna, emulando hamburguesas, incubados a 4 °C.

En PENG, el control de *Listeria* se incrementó ~ 3 unidades log UFC/mL con respecto al día 0 (Fig. 4.1). En presencia de los extractos antilisteria producidos por *E. mundtii* (Tw56 o Tw802) se observó una notable disminución de las unidades log UFC/mL del recuento de células viables de *L. monocytogenes* Scott A hasta no ser detectada el día 10 de tratamiento y manteniéndose así hasta la finalización del ensayo (Fig. 4.1 A y B). En presencia del extracto antilisteria producido por *E. mundtii* Tw807, los recuentos de *L. monocytogenes* Scott A no mostraron diferencias significativas con respecto al día 0 (Fig. 4.1C). Cuando se inoculó *L. monocytogenes* Scott A en presencia de 10^7 (UFC/mL) de *E. mundtii* Tw56, Tw802 o Tw807 los recuentos de *Listeria* disminuyeron progresivamente hasta no ser detectadoa los 15 días (Fig. 4.1 A, B y C).

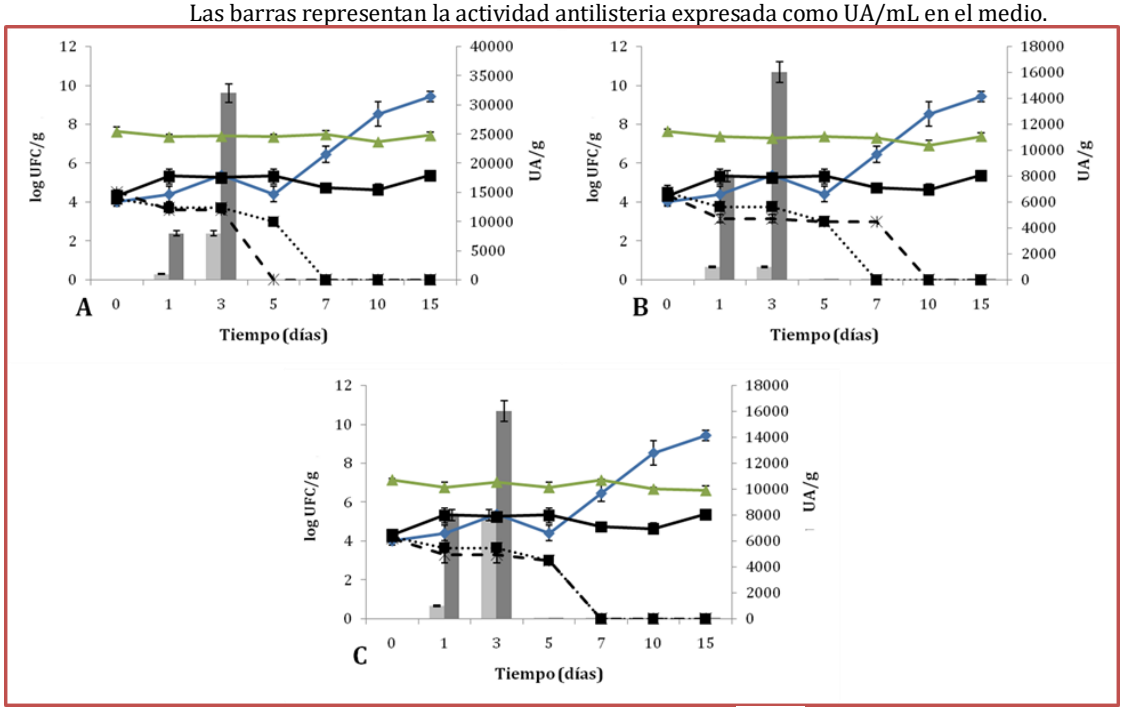
Figura 4.1 Evaluación de la capacidad inhibitoria de las cepas de *Enterococcus mundtii* Tw56(A), Tw802(B) y Tw807(C) o de sus extractos antilisterias (10^4 UA/mL) frente a *Listeria monocytogenes* Scott A, en modelo alimentario PENG a 4 °C por 15 días.
Las líneas representan el recuento de células viables (logaritmo de las UFC/mL).
Las barras representan la actividad antilisteria expresada como UA/mL en el medio.



El recuento de *L. monocytogenes* Scott A, en el modelo de carne vacuna emulando hamburguesas, del control almacenado a 4 °C fue de 4,0 log UFC/g y se mantuvo igual hasta el día 15 (Fig. 4.2). En presencia del extracto antilisteria producido por *E. mundtii* Tw56, no se observó crecimiento de *Listeria* desde el día 5 de almacenamiento en refrigeración hasta el final del ensayo.Mientras que, en presencia del extracto antilisteria producido por *E. mundtii* Tw807 se produjo una disminución hasta que *Listeria*no pudo ser detectadadesde el día 7. En presencia del extracto antilisteria producido por *E. mundtii* Tw802, no fue detectada desde el día 10. Por otro lado, se encontró que las cepas bacteriocinogénicas fueron capaces de producir bacteriocina (1.000 UA/g) bajo estas condiciones de refrigeración (Fig. 4.2).

Figura 4.2 Evaluación de la capacidad inhibitoria de las cepas de *Enterococcus mundtii* Tw56(A), Tw802(B) y Tw807(C) o de sus extractos antilisterias (10^4 UA/mL) frente a *Listeria monocytogenes* Scott A, en modelo alimentario de carne vacuna, emulando hamburguesas, a 4 °C por 15 días.

Las líneas representan el recuento de células viables (logaritmo de las UFC/mL).
Las barras representan la actividad antilisteria expresada como UA/mL en el medio.



Actividad *in situ* de *E. mundtii* Tw56(A), Tw802(B), Tw807(C); Actividad*in situ*, en presencia de *L. monocytogenes* Scott A, de *E. mundtii* Tw56(A), Tw802(B), TW807(C); Mesófilos totales; *Enterococcus mundtii* Tw56(A), Tw802(B), Tw807(C); *Listeria monocytogenes* Scott A; *L. monocytogenes* Scott A co-inoculada con *E. mundtii*Tw56(A), Tw802(B), Tw807(C); *L. monocytogenes* Scott A en presencia de extracto antilisteria Tw56(A), Tw802(B), Tw807(C).

Las bacteriocinas se pueden utilizar para la bioconservación de alimentos (adición de cepas productoras de bacteriocinas o bacteriocinas purificadas o semipurificadas) y la estrategia de su aplicación a los alimentos depende de los componentes presentes en la matriz alimentaria, de manera que no afecten la actividad antimicrobiana, debido a la

característica anfifílica y alto contenido de aminoácidos hidrófobos presentes en la bacteriocina, y su degradación proteolítica por enzimas en la matriz alimentaria (Favaro y col., 2015; O'Connor y col., 2015; Ahmad y col., 2017; Favaro yTodorov, 2017).

En las fracciones donde *L.monocytogenes* Scott A estaba co-inoculada con alguna de las cepas bacteriocinogénicas, no se detectaron células viables a partir del día 7, manteniéndose así hasta el final del ensayo (Fig. 4.2). Además, se pudo constatar la producción *in situ* de bacteriocinas por parte de estas cepas (Fig. 4.2), bajo las condiciones evaluadas, siendo el mayor valor observado de 32.000 UA/g en la fracción I. Sin embargo, no pudo detectarse dicha actividad a partir del día 5 hasta el final del ensayo.

En este trabajo se observó que los extractos antilisteria de cepas de *E. mundtii* mostraron una actividad inhibitoria similar e incluso mejor contra *L. monocytogenes* Scott A que el tratamiento con las respectivas cepas bacteriocinogénicas (*E. mundtii* Tw56, Tw802 y Tw807) en modelos alimentarios almacenados y refrigerados a 4 °C durante 15 días. Estos resultados coinciden con lo observado por Carvalho y col. (2018), quienes atribuyen esta mayor capacidad de los extractos antimicrobianos para inhibir y eliminar *Listeria*, debido a que no se requiere un tiempo de adaptación de las cepas bacteriocinogénicas para iniciar la producción de compuestos antimicrobianos a pesar de que la producción de bacteriocina *in situ* podría ser inhibida por los componentes de los alimentos y el almacenamiento (Urso y col., 2006). Otros estudios han evaluado la producción de bacteriocinas por BL directamente en diferentes matrices alimentarias o el efecto en el control de bacterias patógenas al añadir bacteriocinas purificadas o semipurificadas a los alimentos (Aspri y col., 2017; Lianou y col., 2017; Delcarlo y col., 2019). Blanco y col. (2016) evaluaron el efecto de cultivos iniciadores o starter en la industria cárnica, mostraron como el cultivo *Lactobacillus skey* y *Staphiloccoocus carnosus* pueden reducir *in vitro* hasta 2,4 unidades log UFC de *L.monocytogenes*.

En conclusión, *E. mundtii* Tw56, *E. mundtii* Tw802 y *E. mundtii* Tw807 se caracterizaron por no presentar factores de virulencia, amplio espectro de actividad antimicrobiana, estabilidad en un amplio rango de temperatura y pH, sensibilidad a proteasas digestivas, capacidad de producir bacteriocinas en un alimento modelo a temperatura de refrigeración y con excelentes propiedades funcionales. Además, redujeron el crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A en modelos de alimentos cárnicos a 4 °C tanto cuando se aplicaban como extracto libre de células como cuando se co-inoculaban en alimentos. Las características de *E. mundtii* Tw56, *E. mundtii* Tw802 y *E. mundtii* Tw807 los apuntan como candidatos a bioconservadores en alimentos y potencial empleo como bacterias benéficas para su administración por vía oral.

Aunque la ingesta de BL no representa ningún peligro para la salud, para utilizarlas como cultivos protectores o starter, debe tomarse en cuenta que no todas ellas poseen el status legal de GRAS ("Generally Recognised as Safe") según la FDA (Food and Drug Administration) de EEUU, o de QPS 32 ("Qualified Presumption of Safety") por la EFSA (Talon y Leroy, 2011). Esto se debe a que algunas no cumplen con todos los criterios para su inclusión (taxonomía, familiaridad, patogenicidad y destino de uso). Por otro lado, una BL no podría considerarse segura para uso alimentario si se ha visto implicada en procesos infecciosos (como el Lactobacillus rhamnosus, en raras ocasiones), aun cuando no se haya comprobado que su ingesta produce alguna enfermedad (European Food Safety Authority (EFSA), 2007).Es por ello, que es importante investigar sobre la seguridad y virulencia de las cepas.Sin embargo, este comportamiento está relacionado con la tensión y no involucra a todo el género (Franz y col., 2003). Como ejemplo, Eaton y Gasson (2001) determinaron que *Enterococcus* transmitido por alimentos poseía menos determinantes de virulencia que las cepas médicas. Por otro lado, los enterococos tienen una larga historia de uso seguro. Por ejemplo, se han aplicado en la producción de quesos, debido a su capacidad para producir características sensoriales deseadas y bacteriocinas que pueden actuar contra patógenos transmitidos por alimentos (Giraffa, 2003). Finalmente, es importante resaltar que *Enterococcus mundtii*, generalmente no presentan factores de virulencia (Giraffa, 2003; Schelegueda y col., 2016).

La bacteriocina más empleada para bioconservación de productos cárnicos y contra patógenos como*L.monocytogenes* es la nisina en concentraciones de 38.400 UI/g a 800 UI/g, o bien combinada con 2% de NaCl (Pawar y col., 2000). Sin embargo, al bajar las temperaturas de refrigeración, la efectividad de la nisina es baja. También se ha evaluado la actividad antilisteria de la nisina A y la pediocina AcH en carne de cerdo cruda, considerando a la nisina A más efectiva (Murray y Richard, 1997).Varios autores han informado que la inactivación de patógenos transmitidos por alimenos por bacteriocinas puede diferir mucho dependiendo de la matriz alimentaria utilizada (Muñoz y col., 2007; Silva y col., 2018). Lo que demuestra, la importancia de comprobar la efectividad de los extractos antilisteria en diferentes modelos alimentarios, siendo el extracto antilisteria Tw56 el más efectivo para controlar la población de *L. monocytogenes* Scott A en un modelo alimentario de carne, emulando hamburguesas.

En la literatura se encuentran reportes de la efectividad de otras bacteriocinas (diferentes a la nisina) para ser empleadas como bioconservantes de productos cárnicos, que coinciden con los resultados obtenidos. En carne de cerdo picada y paté de hígado de cerdo, jamón y pechuga de pollo, la adición de enterocinas A y B muestran elevados efectos anti-listeria (Aymerich y col., 2000). Teniendo en cuenta su actividad antimicrobiana

contra *Listeria* spp., se ha demostrado que la pediocina (producida por *P. acidilactici*) mitiga el crecimiento de microorganismos de deterioro durante el almacenamiento en la industria cárnica, así como también es eficaz contra *L. monocytogenes* en carne de res, pavo y jamón rebanado (da Costa y col., 2019). Al igual que la pediocina, la bacteriocina semipurificada BacTN635 (producida por *L. plantarum* TN635) también ha demostrado ser muy activa contra los microorganismos que deterioran la pechuga de pollo y la carne de res (Smaoui y col., 2014).

Además, se ha documentado la potencia de la aplicación combinada de varias bacteriocinas, incluidas las bacteriocinas de la subclase IIa, *L. fermentum* ACA-DC179 y cultivos bioprotectores de *E. faecium* PCD71, para inhibir L. monocytogenes en varios productos cárnicos (Silva y col., 2018). En jamón horneado se aplica una mezcla modelo de varias bacteriocinas: enterocinas A y B, sakacina K, pediocina AcH o nisina, y se demuestra que actúan sinérgicamente en combinación con alta presión hidrostática para reducir o inhibir microorganismos (Garriga y col., 2002). Lo que demuestra la necesidad de futuros ensayos para probar la capacidad inhibitoria de una mezcla de estos extractos antilisteria o la combinación con barreras de obstáculos para garantizar la inocuidad y aumentar así la vida de estante de los alimentos.

4.3.2. Modelo de Yogur

La leche y los productos lácteos pueden albergar una variedad de microorganismos y pueden ser fuentes importantes de patógenos transmitidos por los alimentos. La presencia de los mismos puede provenir del contacto directo con fuentes contaminadas en el ambiente de la granja lechera y/o la excreción de la ubre de un animal infectado (Oliver y col., 2005). Los brotes transmitidos por la leche y los productos lácteos representan del 2 al 6% de los brotes bacterianos transmitidos por los alimentos informados por los sistemas de vigilancia de varios países (De Buyser y col., 2001).

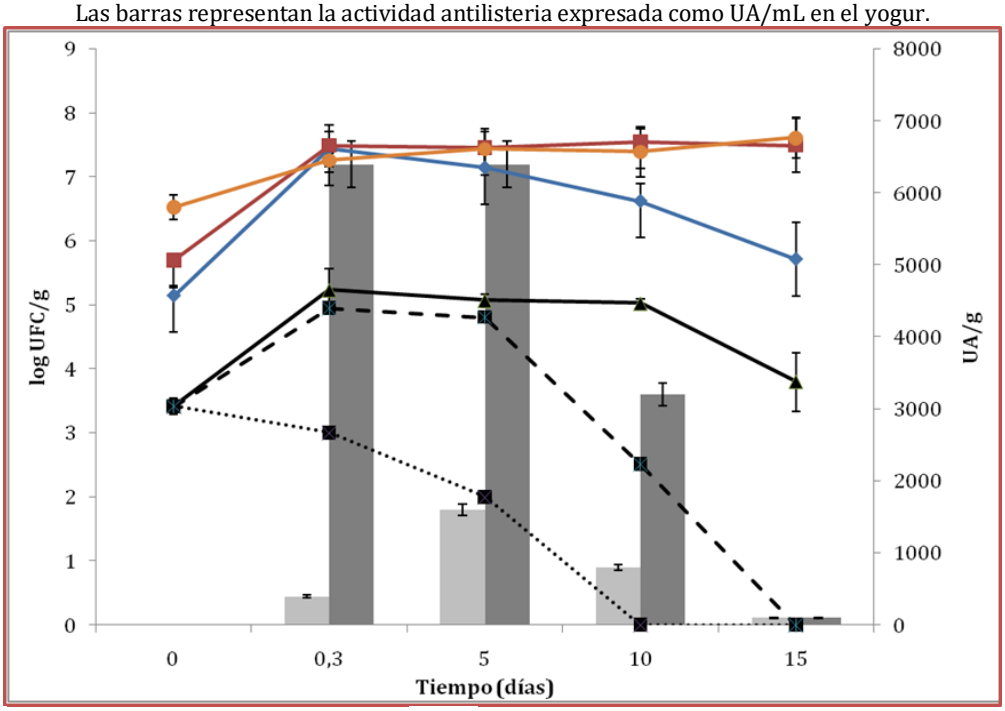
El recuento de células viables del cutivo starter (*L. bulgaricus* ATCC 11842 y *S. termophilus* b01) inicialmente fue de 5 log UFC/g, al final de la fermentación se registró un aumento de aproximadamente 2 unidades log UFC/g (Fig. 4.3). Luego, el conteo de *L. bulgaricus* ATCC 11842 va dismuyendo, mientras que el de *S. termophilus* b01, se mantuvo constante durante los 15 días del experimento.

El recuento de *L. monocytogenes* Scott A, en el día 0 fue de 3,4 log UFC/g, luego de la fermentación (8 h) a 42 °C alcanza un valor de 5,2 log UFC/g, no se observó diferencia significativa con el recuento del día 5, pero luego disminuye 2 unidades logarítmicas el día 10 y permanece igual hasta el día 15.

En presencia del extracto antilisteria producido por *E. mundtii* Tw278 o en co-inoculación con la cepa productora de bacteriocinas, el recuento de *L. monocytogenes* Scott A disminuye progresivamente hasta dejar de detectarse el día 15 y 10, respectivamente.

Se evaluó la producción de bacteriocinas (Fig. 4.3)y se observó que *E. mundtii* Tw278 produce la bacteriocina *in situ*(Fig. 4.3), siendo la mayor producción evaluada de 3.200 UA/g, en la fracción E (día 10), mientras que en la fracción C el valor máximo fue de 800 UA/g.

Figura 4.3 Evaluación de la capacidad inhibitoria de *Enterococcus mundtii* Tw278 o de sus extractos antilisteria (10^4 UA/g) frente a *Listeria monocytogenes* Scott A, en modelo alimentario de yogur a 4 °C por 15 días.
Las líneas representan el recuento de células viables (logaritmo de las UFC/mL).
Las barras representan la actividad antilisteria expresada como UA/mL en el yogur.



Actividad *in situ* de *E. mundtii* Tw278; Actividad*in situ* en presencia de *L. monocytogenes* Scott A; Lactobacillus bulgaricus ATCC 409; *Streptococcus termophilus* b01; *Enterococcus mundtii* Tw278; *Listeria monocytogenes* Scott A; *L. monocytogenes* Scott A co-inoculada con *E. mundtii* Tw278; *L. monocytogenes* Scott A en presencia de extracto antilisteria Tw278.

Los resultados obtenidos sugieren que el uso de *E. mundtii*Tw278, así como el de su extracto antilisteria en la fermentación del yogur mejorará la prevención de la supervivencia y del crecimiento de *L. monocytogenes* durante el procesamiento y almacenamiento. Se han reportado trabajos con resultados similares a los observados. Benkerroum y col. (2002) demostraron que el empleo de *S. thermophilus* B bacteriocinogénico en la elaboración de yogur reduce el recuento de *L. monocytogenes*a niveles indetectables entre las 8 y 24 h. Zuniga-Estrada y col. (1995) han demostrado que *L. monocytogenes*es eliminada completamente en yogur fermentado con un iniciador

bacteriocinogénico en 8 h, mientras que Massa y col. (1991) han demostrado que era necesario un período de 48 h para la eliminación completa del patógeno cuando se usaba el mismo nivel de contaminación (es decir, 10^3UFC/g). La discrepancia en el tiempo necesario para reducir las unidades formadoras de colonias de *L. monocytogenes* por debajo del nivel detectable parece depender de la cepa de *Listeria* y de la acción sinérgica entre la bacteriocina y la acidez.

Los enterococos se encuentran de forma natural en algunos productos lácteos, ya que se utilizan como cultivos iniciadores y, a menudo, forman parte de la microbiota de los quesos artesanales (Domingos-Lopes y col., 2017). Además, se demostró que algunas cepas de enterococos bacteriocinogénicos carecen de muchos de los factores de virulencia (Jaouani y col., 2015). De Vuyst y col. (2003) sugirieron que las especies de *Enterococcus* podrían usarse de manera segura en los alimentos si los genes de virulencia estuvieran ausentes. En consecuencia, varios estudios también han empleado enterococos productores de enterocina en sistemas alimentarios (Lauková y Czikková, 1999;Muñoz y col., 2007; Pingitore y col., 2012; Vandera y col., 2017). También se encontró en la literatura consultada informes sobre modelos alimentarios de leche, yogur y otros alimentos lácteos, contaminados artificialmente con *L. monocytogenes*, donde se evaluaron la capacidad inhibitoria de cepas bacteriocinogénicas (producción *in situ*) o la incorporación de bacteriocinas purificadas o semipurificadas.

Lauková y Czikková (1999) informaron un efecto inhibidor de la enterocina purificada CCM 4231 (3.200 UA/mL) sobre el crecimiento de *S. aureus* y *L. monocytogenes* en leche descremada y yogur. Morgan y col. (2001) demostraron que una preparación en polvo de lacticina 3147 es eficaz para el control de *Listeria* y *Bacillus* en fórmulas de leche infantil, yogur natural y requesón. Sin embargo, las altas concentraciones de polvo de lacticina utilizadas(10% del peso del producto), fueron consideradas impracticables y no económicas por los mismos autores (Morgan y col., 2001).Muñoz y col. (2007) probaron la eficacia de la enterocina AS-48 para el control de estafilococos en leche descremada. Observaron un efecto bactericida proporcional a la concentración de bacteriocina (10-50 μg ml−1), pero no lograron la eliminación completa de estafilococos para ninguna de las concentraciones probadas. Esta eficacia aparentemente menor de AS-48 en la leche en comparación con el medio de cultivo podría atribuirse a una mayor retención de las moléculas de bacteriocina por parte de los componentes de la leche y una difusión más lenta (Muñoz y col., 2007).Arqués y col. (2011) observaron la reducción de los recuentos de *L. monocytogenes* en leche por debajo del límite de detección a las 4 y 24 h por el efecto combinado de dos bacteriocinas, la reuterina y la enterocina AS-48.

Pinguitore y col. (2012) investigaron dos cepas de enterococos bacteriocinogénicos (*Enterococcus mundtii* CRL35 y *Enterococcus faecium* ST88Ch) aisladas de quesos. Se inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* en quesos Minas que contenían *E. mundtii* hasta 12 días de almacenamiento a8 °C. Esta bacteria mostró un efecto bacteriostático ya que los recuentos de *Listeria* se mantuvieron similares al inóculo inicial. Se encontró que la cepa de *E. faecium* era menos efectiva, ya que el efecto bacteriostático se produjo solo después de 6 días a 8°C.

Vandera y col. (2017) investigaron el uso de múltiples cepas bacterianas productoras de enterocina que poseen los genes estructurales de enterocina entA, entB y entP. Algunas cepas exhibieron un efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes* en leche cruda incubada a 37°C durante 6 h.

Coelho y col. (2014) examinaron el efecto inhibitorio de las cepas de *E. faecalis*, productoras de enterocina, contra *L. monocytogenes* en el queso fresco. Demostraron que la inoculación de la leche con cepas bacteriocinogénicas de *E. faecalis* reduce los recuentos de *L. monocytogenes* en 3 a 4 unidades logarítmicas en el queso fresco en comparación con el control. La combinación de dos productores de enterocina optimizó la reducción de los recuentos de *Listeria* en queso fresco, disminuyendo este patógeno en 4 log UFC/gen los primeros 3 días de almacenamiento y por 5 log UFC/g en el día 7.

El pH inicial, anterior a la fermentación del yogur, de las diferentes fracciones fue de 6,80 ± 0,08. Después de la fermentación, se encontró que el pH disminuyó en todas las muestras de yogur, en un rango de 4,37 ± 0,08 a 4,48 ± 0,01, valores correspondientes a las fracciones F y A, respectivamente. Todas las fracciones de yogur mostraron una disminución en los valores de pH después de 5 días, que se mantuvo estable hasta el final del período de almacenamiento (Fig. 4.4). Los valores de acidez se encontraron en el rango de 0,74 a 0,93 (Fig. 4.5), durante el tiempo de almacenamiento, los cuales se encuentran dentro del rango permitido por el Código Alimentario Argentino (CAA, Ley 18284, Capítulo VIII, 2006).

Los valores de sinéresis obtenidos en este estudio oscilan entre el 50 y el 56% (Fig. 4.6). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Díaz-Jiménez y col. (2004), quienes obtuvieron valores entre 45 y 65%. Mientras que los obtenidos para yogures comerciales por Hernández Carranza (2004) son mayores, ya que se encuentran en el rango de 66,46 a 82,01% para Danone y Nestlé, respectivamente. Cabe destacar, que no se observó separación de suero entre las muestras durante el tiempo de almacenamiento, lo que puede considerarse una ventaja, ya que la percepción visual de la separación de suero disminuye la calidad y las posibilidades de aceptación del yogur por parte de los consumidores (Lee & Lucey, 2010).

Figura 4.4 Valores de pH obtenidos para las diferentes fracciones del modelo alimentario de yogur.

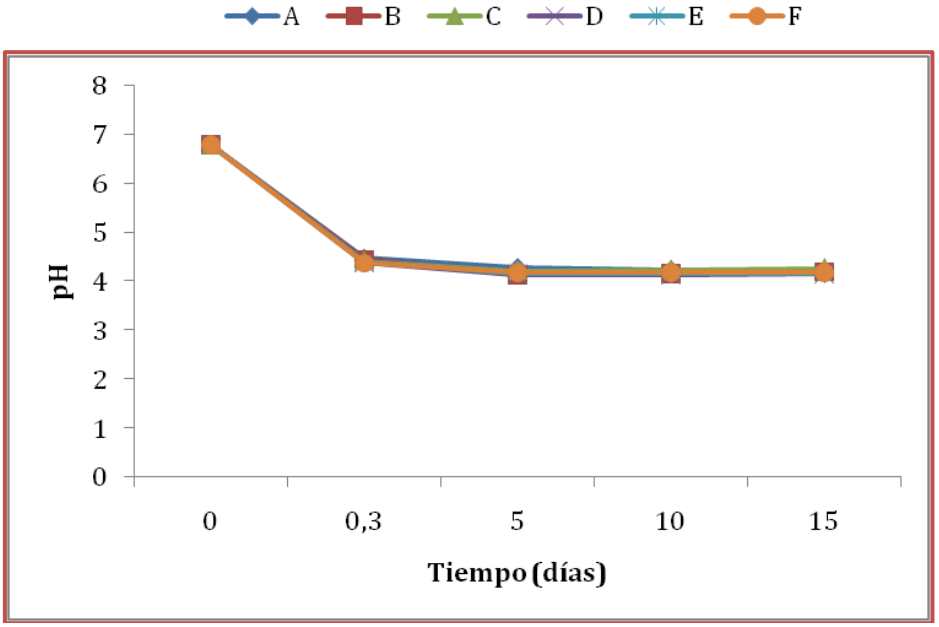
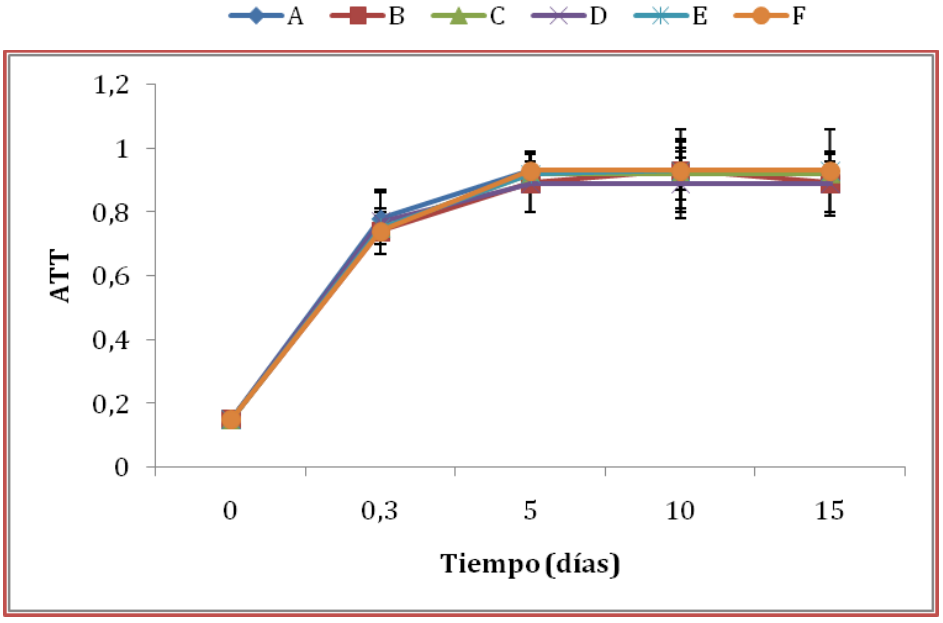


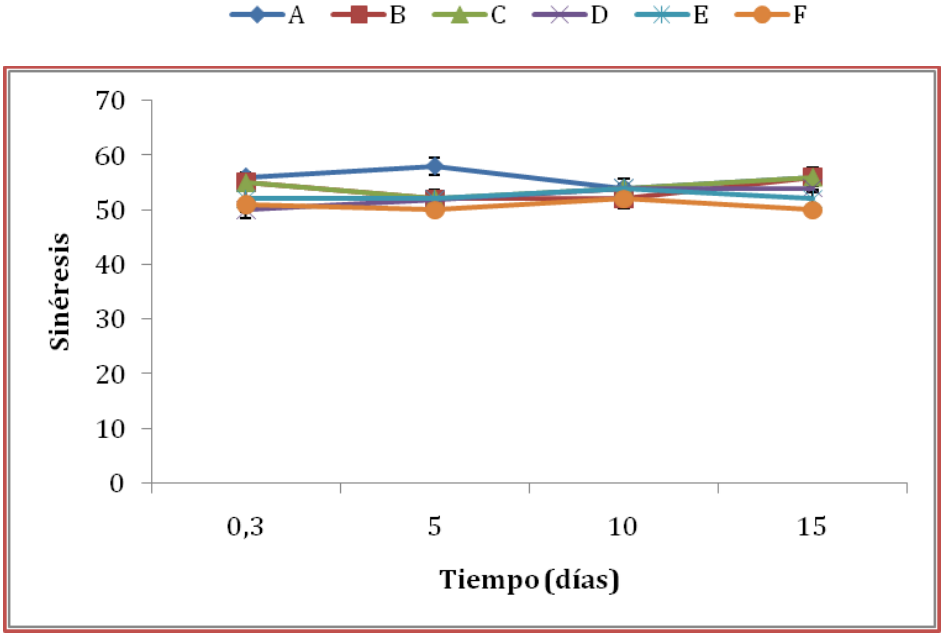
Figura 4.5 Acidez titulable total (ATT) de las diferentes fracciones del modelo alimentario de yogur.



El avance de los conocimientos científicos sobre los peligros que provocan las ETAs y de los riesgos que dichos peligros representan para los consumidores, junto con la capacidad de adoptar intervenciones adecuadas, deberían permitir a los gobiernos y al sector privado reducir significativamente los riesgos relacionados con la alimentación, mejorando la salud pública, desarrollando sistemas eficaces de inocuidad de los alimentos y manteniendo la confianza de los consumidores en el suministro alimentario, con lo cual

se podría establecer un sólido cimiento normativo para el comercio nacional e internacional de alimentos (FAO, 2007).

Figura 4.6 Valores de sinéresis de las fracciones del modelo alimentario de yogur.



El empleo de bacteriocinas en alimentos tiene varias limitaciones para su aplicación. Las bacteriocinas no tienen un amplio rango de acción. Son activas contra cepas estrechamente relacionadas y generalmente son ineficaces contra microorganismos deteriorantes y las bacterias Gram negativas patógenas. Por lo tanto, desde el punto de vista de la seguridad, no es posible confiar únicamente en el efecto antimicrobiano de las bacteriocinas. Para superar esto, es necesaria una tecnología de combinación de obstáculos. Varios estudios han reportado efectos aditivos o sinérgicos entre bacteriocinas, varios antimicrobianos y tecnologías emergentes de procesamiento como alta presión hidrostática (HHP), pulsos eléctricos, campos magnéticos, irradiación, etc. Estas tecnologías de preservación mejoran la actividad antibacteriana de las bacteriocinas y las bacterias Gram negativas, normalmente insensibles a las bacteriocinas tales como *E. coli* o *Salmonella* se vuelven sensibles (Nollet y Toldrá, 2006).

La eficacia de las bacteriocinas añadidas directamente a los alimentos puede disminuir debido a varios factores, como la adsorción de péptidos a ciertos componentes como partículas de grasa, poca solubilidad, inactivación por procesos de oxidación o pH, degradación por enzimas o distribución desigual en la matriz alimentaria, entre otros (Johnson y col., 2018; Silva y col., 2018). Estas causas pueden explicar porque observamos una disminución más lenta en el recuento de las UFC/mL de *L. monocytogenes* Scott A

cuando la fracción de yogur recibió el tratamiento con el extracto antilisteria comparado con la fracción en la cual la bacteriocina fue producida *in situ* (Fig. 4.3).

En el marco normativo internacional del Codex Alimentarius y en línea con la política de seguridad alimentaria a nivel global se establecen diferentes criterios microbiológicos en función de dos factores de riesgo: la susceptibilidad de la población a la que se destina el alimento y la posibilidad que el alimento favorezca o no el crecimiento del patógeno durante su vida útil. En la Unión Europea (UE), se establece un máximo de 100 UFC/g durante la vida útil de los productos no destinados a la población de riesgo (niños, ancianos, mujeres embarazadas o inmunodeprimidos), independientemente de si el patógeno puede o no crecer en los productos. Por otro lado, la legislación de países como Estados Unidos y Japón en un principio era muy restrictiva, ya que establecían una política de "tolerancia cero" (ausencia en 25g) frente a este patógeno, exigiéndolo tanto en alimentos cárnicos listos para consumo, como en el ambiente de producción. No obstante, estos países han ido flexibilizando su normativa, usando únicamente el criterio de "tolerancia cero" para los productos listos para consumo donde Listeria es capaz de crecer (ICEX, 2014) (García y Bermejo, 2014). Uno de los primeros factores que determina el nivel de tolerancia, es la forma en que será consumido el alimento. Así es como la mayoría de los países que cuentan con regulación para este patógeno, establecen límites para los alimentos listos para consumir (ALC) o también conocidos como ready to eat (RTE).

Aunque la introducción directa constituye el método estándar para la aplicación de antimicrobianos en productos alimenticios, esta técnica podría causar interacciones no deseadas con los componentes de los alimentos y una distribución ineficiente en la matriz alimentaria, reduciendo la eficacia antimicrobiana. La inclusión de bacteriocinas en recubrimientos comestibles funcionalizados es una opción interesante ya que solo se utiliza la cantidad mínima de antimicrobiano y no se incorpora como aditivo alimentario directo (Yildirim, 2011). Las películas se forman preferentemente a partir de polímeros naturales (polisacáridos, proteínas, poliésteres, lípidos) que actúan como matriz continua y como soporte de sustancias como antimicrobianos, antioxidantes, colorantes, aromas, etc., convirtiéndose en "películas activas o funcionalizadas" (Cagri y col., 2004). Además de la biodegradabilidad de sus componentes, los recubrimientos activos se distinguen por la retención superficial de los principios activos, la difusión controlada, la retención de una alta concentración del aditivo donde sea necesario y la posibilidad de actuar junto con otros métodos de conservación (refrigeración, atmósfera controlada, etc.). Lo que plantea la posibilidad de nuevos estudios para analizar la incoporación de los extractos antilisteria en recubrimientos funcionalizados.

4.4. Conclusiones Parciales

- E. mundtii Tw56, Tw802, Tw807, así como sus extractos antilisteria fueron capaces de inhibir el crecimiento y eliminar de los modelos alimentarios PENG y de carne vacuna, emulando hamburguesas a 4 °C por 15 días, al patógeno alimentario *L. monocytogenes* Scott A.
- El extracto antilisteria de la cepa de *E. mundtii* Tw56 es un candidato prometedor para ser utilizado como bioconservante en productos cárnicos.
- *E. mundtii* Tw278, así como su extracto antilisteria, fueron capaces de disminuir, hasta no ser detectada la presencia de *L. monocytogenes* Scott A en elmodelo alimentariode producción a 42 °C por 8 h y almacenamiento de yogur a 4 °C por 15 días, sin afectar los parámetros físico-químicos del mismo.

Conclusiones Finales

- *E. mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 producen sustancias antimicrobianas tipo bacteriocinas, con gran capacidad antilisteria. *E. mundtii* Tw278 produce además un compuesto con capacidad emulsionante.

- *E. mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807 podrían ser utilizadas en aplicaciones biotecnológicas que requieran administración de las bacterias vivas por vía oral.

- La mayor producción de bacteriocinas por estas cepas es empleando como medio LAPTg y una temperatura de incubación de 25-30 °C.

- Se optimizó el medio de producción de bioemulsionante BE278 producido por *E. mundtii* Tw278, empleando suero de leche como fuente de carbono de bajo costo.

- El control de pH (6) no tiene un efecto positivo sobre la producción de bioemulsionante BE278 o bacteriocina cuando se emplean los medios óptimos, LAP_{SL} y LAPTg, respectivamente.

- El gen estructural de mundticina KS se detectó en las 4 cepas de *E. mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807. El de la enterocina B sólo en *E. mundtii* Tw802 y Tw807.

- El bioemulsionante BE278 está compuesto por carbohidratos y proteína. Demostró ser una biomolécula no tóxica y estable con capacidad emulsionante sobre diferentes sustratos hidrófobos.

- El bioemulsionante BE278 provocó modificaciones temporales en las POPC-GUV, lo que demuestra su papel crítico en la ocurrencia de procesos que involucrarían a las membranas biológicas.

- Las cepas *E. mundtii* Tw56, Tw278, Tw802 y Tw807,así como sus extractos antilisteriatienen una aplicación potencial para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* Scott A en alimentos.

Proyecciones

- Futuras investigaciones podrían centrarse en probar diferentes concentraciones de los extractos antilisteria para optimizar su empleo, evaluar combinaciones con otras bacteriocinas que permitan aumentar el espectro antimicrobiano y realizar su microencapsulación para mejorar su biodisponibilidad.

- Evaluar la capacidad del bioemulsionante BE278 purificado o semipurificado producido por *E. mundtii* Tw278 en diferentes sistemas modelos, por ejemplo, en modelo alimentario de yogur para disminuir los valores de sinéresis.

- Realizar análisis sensoriales de los modelos alimentarios de carne, emulando hamburguesas y el de yogur.

- Realizar estudios fisicoquímicos y estructurales del bioemulsionante BE278 y estudiar la relación estructura-función.

- Identificar y caracterizar las bacteriocinas producidas por las diferentes cepas bacterianas empleadas en esta tesis.

Producción Científica

Parte de los resultados experimentales de este trabajo dieron lugar a las siguientes presentaciones:

Control of Listeria monocytogenes in simulated meat gravy by bacteriocins of lactic acid bacteria. Autores: Gómez, JS; Vallejo, M; Marguet, E; Bellomio, A; Perotti, NI; Carvalho, KG. SIBAL V Internacional Symposium on Lactic Acid Bacteria, CERELA, Tucumán, Argentina, 2016. Presentación de Trabajo Modalidad Póster.

Producción de bioemulsificantes por *Enterococcus mundtii* 278. Aplicación potencial para la remoción de contaminantes hidrofóbicos.Autores: Gómez, JS; Gianni de Carvalho, K; Vallejo, M; Marguet, E; Perotti, NI; Colin VL. III Workshop Latinoamericano sobre PGPR, en Temuco, Pucón, Chile, 2016. Presentación de Trabajo Modalidad Póster.

Producción de Compuestos Antimicrobianos por *Enterococcus mundtii* Tw278 para aumento de la seguridad microbiológica en alimentos. Autores: Gómez, JS; Vallejo, M; Marguet, E; Perotti, NI; Gianni de Carvalho, K. VI Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria; III Simposio Argentino de Inocuidad Alimentaria, en Buenos Aires, Argentina, 2018. Presentación de Trabajo Modalidad Póster.

Characterization of the emulsifying activity of *Enterococcus mundtii* 278 culture supernatant: Studies of Stability and Toxicity.Autores: Gómez, JS; Gianni, K; Del Gobbo, LM; Vallejo, M; Marguet, E; Perotti, NI; Colin, VL. XIII Congreso Argentino de Microbiología General, Argentina, 2018. Presentación de Trabajo Modalidad Póster.

Control de la población de *Listeria monocytogenes* Scott A en modelo alimentario de Hamburguesas.Autores: Gómez, JS; Pereira, CE; Vallejo, M; Marguet, E; Gianni de Carvalho, K. V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos, en Buenos Aires, Argentina, 2019. Presentación de Trabajo Modalidad Póster.

Parte de los resultados experimentales de este trabajo dieron lugar a las siguientes publicaciones:

Production and properties of a bioemulsifier obtained from a lactic acid bacterium. Gianni de Carvalho, K.; Gómez, J.E.; Vallejo, M.; Marguet, E.R.; Perotti, N.I.; Donato, M.; Itri, R.; Colin, V.L. Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 183 (2019). https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109553

Assessment of the bioprotective potential of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in ground beef. Gómez, J.S.; Parada, R.B.; Vallejo, M.; Marguet, E.R.; Bellomio, A.; Perotti, N.; de Carvalho, K.G. Archives of Microbiology (2021), 203: 1427-1437. https://doi.org/10.1007/s00203-020-02118-0

Bibliografía

Abanoz, H.S. & Kunduhoglu, B. (2018) Antimicrobial activity of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* KT11 against some pathogens and antibiotic-resistant bacteria. *Korean J Food Sc Anim Resour*., 38(5): 1064.

Abee, T.; Klaenhammer, T.R. & Letellier, L. (1994) Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:1006–1013.

Abriouel, H.; Omar, N.B.; Molinos, A.C.; López, R.L.; Grande, M.J.; Martínez-Viedma, P.; Ortega, E.; Cañamero, M.M. & Galvez, A. (2008) Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int. J. Food Microbiol.*, 123: 38-49.

Acuña, L.; Corbalan, N.S.; Fernandez, I.C.; Morero, R.D.; Barros-Velazquez, J. &Bellomio, A. (2015) Inhibitory Effect of the Hybrid Bacteriocin Ent35-MccV on the Growth of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in Model Food. *Syst Food Bioprocess Techno*, 8: 1063–1075. Doi: 10.1007/s11947-015-1469-0

Agencia Santafesina de Seguridad Alimentaria (2017) Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Disponible en: https://www.assal.gov.ar/eta/

Ahmad, V.; Khan, M.S.; Jamal, Q.M.S.; Alzohairy, M.A.; Al Karaawi, M.A. & Siddiqui, M.U. (2017) Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agricultura and food preservation. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 49(1): 1-11. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.016

Al-Asady, A.K.; Majeed, G.H. & Al-Waely, W.A. (2016) Study of rhamnolipids cytotoxixity, inhibitory effect on some microorganisms and applying in food products. *Int. J. Bio-Technol. Res.*, 6(3): 1-8.

Algino, R.; Badtram, G.; Ingham, B. & Ingham, S. (2009) Factors Associated with Salmonella Prevalence on Pork Carcasses in Very Small Abattoirs in Wisconsin. *J. Food Protect.*, 72(4): 714-721.

Allende, A.; Tomás-Barberán, F.A. & Gil, M.I. (2006) Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends Food Sci Technol.*, 17(9), 513-519.

Allerberger, F. & Wagner, M. (2010) Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin. Microbiol. Infect.*, 16 (1): 16-23.

Almeida, T.; Brandao, A.; Muñoz-Atienza, E.; Gonc, A.; Carmen Torres, A.; Igrejas, G.; Hernández, P.E.; Herranz, C.; Cintas, L.M. & Poeta, P. (2011) Identification of bacteriocin genes in enterococci isolated from game animals and saltwater fish. *J. Food Protect.*, 74: 1252-1260. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-016

Al-Seraih, A.; Belguesmia, Y.; Baah, J.; Szunerits, S.; Boukherroub, R. & Drider, D. (2017) Enterocin B3A–B3B produced by LAB collected from infant faeces: potential utilization in the food industry for *Listeria monocytogenes* biofilm management. *Antonie Van Leeuwenhoek*., 110(2):205-219.

Alvarez Ordóñez, A.; Broussolle, V.; Colin, P.; Nguyen The, C. & Prieto, M. (2015) The adaptive response of bacterial food-borne pathogens in the environment, host and food: Implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.*, 213: 99-109.

Alvarez-Sieiro, P.; Montalbán-López, M.; Mu, D. & Kuipers, O.P. (2016) Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100: 2939-2951.

Alves, V.F.; Lavrador, M.A.S. & De Martinis, E.C.P.P. (2003) Bacteriocin exposure and food ingredients influence on growth and virulence of *Listeria monocytogenes* in a model meat gravy system. *J. Food Safety*, 23: 201-217. Doi: 10.1111/j.1745-4565.2003.tb00363.x

Alzamora, S.M.; Lopez-Malo, A. & Tapi, M.S. (2000) Minimally Processed Fruits and Vegetables: Fundamental Aspects and Applications. Aspen, Gaithersburg, pp. 1–9.

Amaral, D.M.F.; Silva, L.F.; Casarotti, S.N.; Nascimento, L.C.S. & Penna, A.L.B. (2017)*Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. *J. Dairy Sci.*, 100(2): 933-949. doi: 10.3168/jds.2016-11513

Ananou, S.; Muñoz, A.; Gálvez, A.; Martínez-Bueno, M.; Maqueda, M. & Valdivia, E. (2008) Optimization of enterocin AS-48 production on a whey-based substrate. *Int. Dairy J.*, 18(9): 923-927. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.02.001

Ananou, S.; Lofti, S.; Azdad, O. & Nzoyikorera, N. (2020) Production, Recovery and Characterization of an Enterocin with Anti-Listerial Activity produced by *Enterococcus hirae* OS1. *Appl. Food Biotechnol.*, 7(2): 103-114. doi: 10.22037/afb.v7i2.27582

Andrewes, F.W. & Horder, T.J. (1906) A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet*, 168:708–713.

Angelova, M.I. & Dimitrov, D.S. (1986) Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 81: 303–311.

Araújo, C.; Muñoz-Atienza, E.; Hernández, P.E.; Herranz, C.; Cintas, L.M.; Igrejas, G. & Poeta, P. (2015) Evaluation of *Enterococcus* spp from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum), feed, and rearing environment against fish pathogens. *Foodborne Pathog. Dis.*, 12: 311-322. doi: 10.1089/fpd.2014.1906

Arena, M.P.; Caggianiello, G.; Russo, P.; Albenzio, M.; Massa, S., Fiocco, D.; Capozzi, V. & Spano, G. (2015) Functional starters for functional yogurt. *Foods*, 4: 15-33. doi: 10.3390/foods4010015

Arqués, J.L.; Rodríguez, E.; Nuñez, M. & Medina, M. (2011) Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. *Food Control*, 22: 457-461. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.09.027

Aspri, M.; O'Connor, P.M.; Field, D.; Cotter, P.D.; Ross, P.; Hill, C. & Papademas, P. (2017) Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. *Int. Dairy J.*, 79: 1-9. doi: 10.1016/j.idairyj.2017.04.008

Axelsson, L. (1998) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S. & von Wright, A. (eds). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects 2nd Edition. New York: Marcel Dekker Inc., 1-72.

Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker, 139, 1-66.

Aymerich, T.; Garriga, M.; Ylla, J.; Vallier, J.; Monfort, J. & Hugas, M. (2000) Application of Enterocins as Biopreservatives against *Listeria innocua* in Meat Products. *J. Food Protect.*, 63(6): 721-726.

Bagde, P. & Vigneshwaran, N. (2019) Improving the stability of bacteriocin extracted from *Enterococcus faecium* by immobilization onto cellulose nanocrystals. *Carbohyd Polym*., 209: 172-180.

Balciunas, E.M.; Castillo Martinez, F.A.; Todorov, S.D.; Franco, B.D.G.M.; Converti, A. & Oliveira, R.P.S. (2013) Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*, 32(1): 134-142. doi: 10.1016/j. foodcont.2012.11.025

Bali, V.; Panesar, P.S. & Bera, M.B. (2016) Trends in utilization of agro-industrial byproducts for production of bacteriocins and their biopreservative applications. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 36: 204-214.

Balthazar, C.F.; Pimentel, T.C.; Ferrao, L.L.; Almada, C.N.; Santillo, A.; Albenzio, M.; Mollakhalili, N.; Mortazavian, A.M.; Nascimento, J.S.; Silva, M.C.; Fretas, M.Q.; Sant'Ana, A.S.; Granato, D. & Cruz, A.G. (2017) Sheep milk: Physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 16: 247-262.

Baltova, K. & Dimitrov, Z. (2014) Probiotic and cultural characteristic of strain *Lactobacillus gasseri* 4/13 of human origin. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 28: 1084-1088.

Banat, I.M.; Satpute, S.K.; Cameotra, S.S.; Patil, R. & Nyayanit, N.V. (2014) Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Front. Microbiol.*, 5: 697.

Baptista, R.C.; Horita, C.N. & Sant'Ana, A.S. (2020) Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: A review. *Food Res. Int.*, 127: 108762. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108762

Barbosa, M.S.; Todorov, S.D.; Belguesmia, Y.; Choiset, Y.; Rabesona, H.; Ivanova, I.V.; Chobert, J.M.; Haertlé, T. & Franco, B.D.G.M. (2014) Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* MBSa1 isolated from Brazilian salami. *J. Appl. Microbiol.*, 116: 1195-1208. doi: 10.1111/jam.12438

Barbosa, M.S.; Jurkiewicz, C.; Landgraf, M.; Todorov, S.D. & Franco, B.D.G.M. (2018) Effect of proteins, glucose and NaCl on growth, byosynthesis and functionality of bacteriocins of *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in foods during storage at 4 °C: Tests in food models. *LWT*, 95: 167-171. Doi: 10.1016/j.lwt.2018.04.082

Batz, M.B.; Hoffmann, S., & Morris, G. (2011) Ranking the risks: The 10 pathogen-food combinations with the greatest burden on public health. Emerging Pathogens Institute, University of Florida.

Bautista Villarreal, M. & Álvarez Nava, H. (2019) Emulsiones en alimentos y sus aplicaciones. Presencia Universitaria, 7(14): 65-73.

Beale, D.J.; Morrison, P.D. & Palombo, E.A. (2014) Detection of *Listeria* in milk using non-targeted metabolic profiling of *Listeria monocytogenes*: A proof-of-concept application. *Food Control*, 42: 343-346.

Begley, M.; Hill, C. &Gahan, C.G.(2003) Identification and disruption of btlA, a locus involved in bile tolerance and general stress resistance in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 218:31–38.

Belgacem, Z.B.; Abriouel, H.; Omar, N.B.; Lucas, R.; Martínez-Canamero, M.; Gálvez, A. & Manai, M. (2010) Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21: 462-470. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.07.007

Bell, V.; Ferrao, J. & Fernandes, T. (2017) Nutritional guidelines and fermented food framework. *Foods*, 6: 65. doi: 10.3390/foods6080065

Ben Braïek, O.; Ghomrassi, H.; Cremonesi, P.; Morandi, S.; Fleury, Y.; Le Chevalier, P.; Hani, K.; Hadj, O.B. & Ghrairi, T. (2017) Isolation and characterisation of an enterocin P-producing *Enterococcus lactis* strain from a fresh shrimp (*Penaeus vannamei*). *Antonie Van Leeuwenhoek*., 110(6): 771-786. doi: 10.1007/s10482-017-0847-1

Ben Braïek, O.; Morandi, S.; Cremonesi, P.; Smaoui, S.; Hani, K. & Ghrairi, T. (2018) Safety, potential biotechnological and probiotic properties of bacteriocinogenic *Enterococcus lactis* strains isolated from raw shrimps. *Microb. Pathog.*, 117, 109–117. doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.021

Ben Braïek, O. & Smaoui, S. (2019) Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. *Biomed Res Int*., 2019: 1-13.

Benkerroum, N.; Ghouati, Y.; Ghalfi, H.; Elmejdoub, T.; Roblain, D.; Jacques, P. & Thonart, P. (2002) Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in a model cultured milk (Iben) by in situ bacteriocin production from *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*. *Int. J. Dairy Technol.*, 55: 145-151. doi: 10.1046/j.1471-0307.2002.00053.x

Berton-Carabin, C.C.; Ĥélène Ropers, M.H. & Geno, C. (2014) Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 13(5): 945-977. doi: 10.1111/1541-4337.12097

Bhandare, S.G.; Sherikar, A.T.; Paturkar, A.M.; Waskar, V.S.& Zende, R.J. (2007) A comparison of microbial contamination on sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops. *Food Control*, 18(7): 854-858. doi: 10.1016/j.foodcont.2006.04.012

Bhardwaj, A.; Malik, R. & Chauhan, P. (2008) Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian J. Microbiol*., 48(3): 317-325.doi: 10.1007/s12088-008-0041-2

Blanco, L.C.; Sotelo Díaz, I. & Llorente Bousquets, A. (2016) In vitro modelling of simultaneous interactions of *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sakei*, and *Staphylococcus carnosus*. *Food Sci. Biotechnol.*, 25(1), 341- 348.

Bohrer, B. (2017) Review: Nutrient density and nutritional value of meat products and non-meat foods high in protein. *Trends Food Sci. Technol.*, 65: 103-112.

Boles, B.R.; Thoendel, M. & Singh, P.K. (2005) Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.*, 57(5): 1210-1223.

Bouttefroy, A.; Mansour, M.; Linder, M. & Milliere, J.B. (2000) Inhibitory combinations of nisin, sodium chloride, and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth by an experimental design approach. *Int. J. Food Microbiol.*, 54(1-2): 109-115. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00171-3

Bower, C.K. & Daeschel, M.A. (1999) Resistance responses of microorganisms in food environments. *Int. J. Food Microbiol.*, 50: 33–44.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.

Brandelli, A.; Daroit, D.J. & Corrêa, A.P.F. (2015) Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Res. Int.*, 73: 149-161.

Briczinski, E.P. &Roberts, R.F. (2002) Production of an exopolysaccharide-containing whey protein concentrate by fermentation of whey. *J. Dairy Sci.*, 85: 3189-3197.

Brinques, G.B.; Peralba, M.C. & Ayub, M.A.Z. (2010) Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37: 205-212.

Buchanan, R.; Gorris, L. & Hayman, M. (2017) A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75: 1-13.

Buyukozturk, F.; Benneyan, J.C. & Carrier, R.L. (2010) Impact of emulsion-based drug delivery systems on intestinal permeability and drug release kinetics. *J. Control Release*, 142(1): 22-30. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.10.005

Byappanahalli, M.N.; Nevers, M.B.; Korajkic, A.; Staley, Z.R. & Harwood, V.J. (2012) Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 76(4): 685-706.

Cagri, A.; Ustunol, Z. & Ryser, E.T. (2004) Antimicrobial Edible Films and Coatings. *J. Food Prot.*, 67(4): 833-848. doi: 10.4315/0362-028X-67.4.833

Callewaert, R.; Hugas, M. & Vuyst, L.D. (2000) Competitiveness and bacteriocin production of *Enterococci* in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 57(1): 33- 42. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00228-2

Calo-Mata, P.; Arlindo, S.; Boehme, K.; de Miguel, T.; Pascoal, A. & Barros Velazquez, J. (2007) Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Technol.*, 1: 43–63.

Camacho-Chab, J.C.; Guézennec, J.; Chan-Bacab, M.J.; Ríos-Leal, E.; Sinquin, C.; Muñiz-Salazar, R.; De la Rosa-García, S.C.; Reyes-Estébanez, M. & Ortega-Morales, B.O. (2013) Emulsifying activity and stability of a non-toxic bioemulsifier synthesized by *Microbacterium* sp. MC3B-10. *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 18959–18972.

Carvalho, K.G.; Kruger, M.F.; Behrens, J.; Destro, M.T.; Landgraf, M. & Franco, B.D.G.M. (2009a) Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWT*, 42: 491–495. doi: 10.1016/j.lwt.2008.08.011

Carvalho, K.G.; Kruger, M.F.; Nader Furtado, D.; Todorov, S.D. & Franco, B.D.G.M. (2009b) Evaluation of the role of environmental factors in the human gastrointestinal tract on the behaviour of probiotic cultures of *Lactobacillus casei* Shirota and *Lactobacillus casei* LC01 by the use of a semi-dynamic *in vitro* model. *Ann. Microbiol.*, 59(3): 439-445. doi: 10.1007/BF03175128

Carvalho, K.G.; Bambirra, F.H.S.; Nicoli, J.R.; Oliveira, J.S.; Santos, A.M.C.; Bemquerer, M.P.; Miranda, A. & Franco, B.D.G.M. (2018) Characterization of multiple antilisterial peptides

produced by sakacin P-producing *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a. *Arch. Microbiol.*, 200(4): 635-644. doi: 10.1007/s00203-018-1477-3

Castro, M.P. (2006) Estudio de las interacciones entre agentes antimicrobianos y otros aditivos y/o componentes: Efectos sobre la estabilidad de sistemas acuosos y emulsiones del tipo aderezos para ensalada. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 192 pp.

Centeno, J. A.; Menendez, S. & Rodriguez, O.J. (1996) Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (northwest Spain). *Int. J. Food Microbiol.*, 33: 307–313.

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (2017) *Listeria* (Listeriosis). Disponible en: cdc.gov/foodsafety/es/foodborne-germs-es.html

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (2021a) Microbios y enfermedades transmitidos por los alimentos. Disponible en: cdc.gov/foodsafety/es/foodborne-germs-es.html

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (2021b) Síntomas de Intoxicación alimentaria. Disponible en: cdc.gov/foodsafety/es/symptons-es.html

Chakchouk-Mtibaa, A.; Elleuch, L.; Smaoui, S.; Nahaj, S.; Sellem, I.; Abdelkafi, S. & Mellouli, L. (2014) An antilisterial bacteriocin BacFL31 produced by *Enterococcus faecium* FL31 with a novel structure containing hydroxyproline residues. *Anaerobe*., 27:1-6. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.02.002

Charpentier, E.; Gerbaud, G.; Jacquet, C.; Rocourt, J. & Courvalin, P. (1995) Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. *J. Infect. Dis.*, 172:277–281.

Charpentier, E. & Courvalin, P. (1999) Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43:2103–2108.

Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L. & Collins, J.K. (1998) Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 759-768.

Charyyev, M.G.; Tuncer, B.Ö.; Kankaya, D.A. & Tuncer, Y. (2019) Bacteriocinogenic properties and safety evaluation of *Enterococcus faecium* YT52 isolated from boza, a traditional cereal based fermented beverage. *J Consum Protect Food Saf.*, 14(1): 41-53.

Chen, Y.; Ludescher, R.D. & Montville, T.J. (1997) Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl Environ Microbiol*., 63(12): 4770.

Chen, M.; Wu, Q.; Zhang, J.; Yan, Z. & Wang, J. (2014) Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail-level ready-to-eat foods in South China. *Food Control*, 38:1-7.

Chen, L.; Lu, X.; Liang, X.; Hong, D.; Guan, Z.; Guan, Y. & Zhu, W. (2016) Mechanistic studies of the transport of peimine in the Caco-2 cell model. *Acta Pharm. Sin. B.*, 6(2): 125–131.

Chen, C.; Zhao, S.; Hao, G.; Yu, H.; Tian, H. & Zhao, G. (2017) Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *Int. J. Food Prop.*, 20(1): 316-330. doi: 10.1080/10942912.2017.1295988

Chikindas, M.L.; Weeks, R.; Drider, D.; Chistyakov, V.A. & Dicks, L.M. (2018) Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 49: 23-28. doi: 10.1016/j.copbio.2017.07.011

Cintas, L.M.; Casaus, P.; Fernández, M.F. & Hernández, P.E. (1998) Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.*, 15(3), 289-298.

Cirone, K.; Huberman, Y.; Morsella, C.; Méndez, L.; Jorge, M. & Paolicchi, F. (2013) Growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enteritidis* during preparation and Storage of yogurt. *ISRN Microbiol.*, 2013: 247018. doi: 10.1155/2013/247018

Cleveland, J.; Montville, T.J.; Nes, I.F. & Chikindas, M.L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobians for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 71: 1-20.

Coburn, P.S.; Pillar, C.M.; Jett, B.D.; Haas, W. & Gilmore, M.S. (2004) *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response expresses cytolysin. *Science*, 306(5705): 2270-2272.

Coelho, M.; Silva, C.; Ribeiro, S.; Dapkevicius, M.; & Rosa, H. (2014) Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 191: 53-59. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.029

Código Alimentario Argentino (1993) Definiciones de funciones de Aditivos Alimentarios. Ley 18284, Capitulo XVIII, Resolución GMC N° 083/93.

Código Alimentario Argentino (2006) Alimentos Lácteos. Ley 18284, Capítulo VIII, Artículo 576 – Resolución conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N°563/2006.

Colin, V.L.; Castro, M.F.; Amoroso, M.J. & Villegas, L.B. (2013) Bioemulifiers production by *Amycolatopsis tucumanensis* and their potential application for hexavalent chromium removal from soil. *J. Hazard Mater.*, 261: 577–583.

Colin, V.L.; Bourguignon, N.; Gómez, J.S.; Gianni de Carvalho, K.; Ferrero, M.A. & Amoroso, M.J. (2017) Production of surface-active compounds by a hydrocarbon degrading actinobacterium: presumptive relationship with lipase activity. *Water, Air, Soil Pollut.*, 228: 454.

Collins, M.D.; Jones, D.; Farrow, J.A.E.; Kilpper-Balz, R. & Schleifer, K.H. (1984)*Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 34: 220–223.

Cooper, D.G. & Goldenberg, B.G. (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(2), 224–229.

Corbalán, N.; Quiroga, M.; Masias, E.; Peralta, D.; Barros Velázquez, J.; Acuña, L. & Vincent, P. (2021) Antimicrobial activity of MccJ25(G12Y) against gram-negative foodborne pathogens *in vitro* and in food models. *Int. J. Food Microbiol.*, 352: 109267. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109267

Corbo, M.R.; Del Nobile, M.A. & Sinigaglia, M. (2006) A novel approach for calculating shelf life of minimally processed vegetables. *Int. J. Food Microbiol.*, 106(1), 69–73

Cortés-Sánchez, A.; Hernández-Sánchez, H. & Jaramillo-Flores, M.E. (2013) Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiol. Res.*, 168: 22-32. doi: 10.1016/j.micres.2012.07.002

Cortés-Sánchez, A.D.J. & Salgado-cruz, M.D.P. (2017)*Escherichia coli* O157:H7 in the context of foodborne diseases and public health. *Environ. Exp. Biol.*, 15: 191–200. doi: 10.22364/eeb.15.19

Cotter, P.D.; Hill, C. & Ross, P. (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3: 777-788.

Cotter, P.D.; Ross, R.P. & Hill, C. (2013) Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.,* 11: 95–105.

da Costa, R.J.; Voloski, F.L.S.; Mondadori, R.G.; Duval, E.H. & Fiorentini, Â.M. (2019) Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. *J. Food Qual.,* 2019: 12 pp. doi: 10.1155/2019/4726510

Darbandi, A.; Asadi, A.; Ari, M.M.; Ohadi, E.; Talebi, M.; Zadeh, M.H.; Emamie, A.D.; Ghanavati, R. & Kakanj, M. (2022) Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *J. Clin. Lab. Anal.,* 36(1): e24093. doi: 10.1002/jcla.24093

da Silva, S.S.; Vitolo, M.; González, J.M.D. & de Souza Oliveira, R.P. (2014) Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res Int.,* 64: 527-536.

Da Silva, B.V.; Barreira, J.C.M. & Oliveira, B.P.P. (2016) Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extration, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends Food Sci. Technol.,* 50: 144-158.

Datta, S.; Akter, A.; Shah, I.; Fatema, K.; Islam, T.; Bandyopadhyay, A.; Khan, Z. & Biswas, D. (2012) Microbiological quality Assessment of raw meat and meat products, and antibiotic susceptibility of isolated *Staphylococcus aureus*. *Agric. Food Analytic. Bacteriol.,* 2: 187-194.

De Buyser, M.L.; Dufour, B.; Maire, M. & Lafarge, V. (2001) Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.,* 67(1-2): 1-17. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00443-3

Deegan, L.H.; Cotter, P.D.; Hill, C. & Ross, P. (2006) Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.,* 16:1058–1071.

De Giani, A.; Bovio, F.; Forcella, M.; Fusi, P.; Sello, G. & Di Gennaro, P. (2019) Identification of a bacteriocin-like compound from *Lactobacillus plantarum* with antimicrobial activity and effects on normal and cancerogenic human intestinal cells. *AMB Exp.,* 9(1): 88.

Delcarlo, S.B., Parada, R.; Schelegueda, L.I.; Vallejo, M.; Marguet, E.R. & Campos, C.A. (2019) From the isolation of bacteriocinogenic LAB strains to application for fish paste biopreservation. *LWT*, 110: 239-246. doi: 10.1016/j.ltw.2019.04.079

Delcenserie, V.; Martel, D.; Lamoureux, M.; Amiot, J.; Boutin, Y. & Roy, D. (2008) Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr. Issues Mol. biol.*, 10: 37-54.

Delgado, C.C. & Ridaura, I.O. (2005) Bebidas y Regiones: Historia e Impacto de la cultura etílica en México. Plaza y Valdés (Editorial), D.F., México, 200 p. ISBN: 970-722-388-X

De Martinis, E.C.P. & Franco, B.D.G.M. (2002) Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Rev. Int.*, 18: 191-208.

Dergal, S.B. (2019) La conservación de los alimentos: una milenaria tradición para garantizar la seguridad alimentaria. El papel de los alimentos enlatados en la salud, 1ra Edición, México, capítulo 1: 13-28. ISBN: en trámite.

de Sousa, T. & Bhosle, S. (2012) Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 isolated from a mangrove ecosystem. *Bioresour. Technol.*, 123: 256–262.

Desriac, F.; Defer, D.; Bourgougnon, N.; Brillet, B.; Le Chevalier, P. & Fleury Y.(2010) Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Marine Drugs*, 8: 1153-1177.

De Vuyst, L.; Foulquie Moreno, M.R. & Revets, H. (2003) Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.*, 84: 299-318. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00425-7

Díaz Jiménez, B.; Sosa Morales, M.E. & Vélez Ruiz, J.F. (2004) Efecto de la adición de fibra y la disminución de grasa en las propiedades físico-químicas del yogur. *Rev. Mex. Ing. Qca.*, 3(3): 287-305.

Díaz Perez, M; Rodríguez Martínez, C. & Zhurbenko, C.R. (2010) Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.*, 48(2), ISSN 1561-3003.

Dicks, L.M.; Dreyer, L.; Smith, C. & van Staden, A.D. (2018) A Review: The Fate of Bacteriocins in the Human Gastro-Intestinal Tract: Do They Cross the Gut-Blood Barrier? *Front. Microbiol.*, 9: 2297. doi:10.3389/fmicb.2018.02297

Dilarri, G.; da Silva, V.L.; Pecora, H.B.; Montagnolli, R.N.; Corso, C.R. & Bidoia, E.D. (2016) Electrolytic treatment and biosurfactants applied to the conservation of Eugenia uniflora fruit. *Food Sci. Technol.* (Campinas), 36(3): 456-460. doi: 10.1590/1678-457x.00516

Dionisi, H.M.; Lozada, M. & Olivera, N.L.(2012) Bioproscpection of marine microorganisms: potential and challenges for Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 44:122-132.

Domingos-Lopes, M.; Stanton, C.; Ross, P.; Dapkevicius, M. & Silva, C. (2017) Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiol.*, 63: 178–190. doi: 10.1016/j.fm.2016.11.014

Du, L.; Liu, F.; Zhao, P.; Zhao, T. & Doyle, M.P. (2017) Characterization of *Enterococcus durans* 152 bacteriocins and their inhibition of *Listeria monocytogenes* in ham. *Food Microbiol.*, 68: 97-103.

Duboc, P. & Mollet, B. (2001) Aplications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int. Dairy J.*, 11: 759-768.

Dumont, J. & Cotoni, L. (1921) Bacille semblable à celui de rouget de porc rencontré dans le LCR d'un méningétique. *Ann. Inst. Pasteur*, 5:625–633.

D'Urso, O.F.; Poltronieri, P.; Marsigliante, S.; Storelli, C.; Hernández, M. & Rodríguez-Lázaro, D. (2009) A filtration-based real-time PCR me thod for the quantitative detection of viable *Salmonella enteric* and *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Microbiol.*, 26: 311–316.

Dussurget, O.; Cabanes, D.; Dehoux, P.; Lecuit, M.; Buchrieser, C.; Glaser, P.; Cossart, P. & Consortium, T.E.L.G. (2002)*Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Molec. Microbiol.*, 45:1095–1106.

Dzwolak, W.; Ziajka, S.; Chmura, S. & Baranowska, M. (2000) Manufacture of Milk Fermented Drinks. Biblioteczka Majstra Mleczarskiego. Oficyna Wydawnicza Hoża, Warsaw, 246-257.

Eaton, T.J. &Gasson, M.J. (2001) Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environm. Microbiol.*, 67: 1628-1635. doi: 10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001

Engelhardt, T.; Szakmár, K.; Kiskó, G.; Mohácsi-Farkas, C. & Reichart, O. (2018) Combined effect of NaCl and low temperature on antilisterial bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* ST202Ch. *LWT*, 8: 104–109. doi: 10.1016/j.lwt.2017.10.027

Ennahar, S.; Sashihara, T.; Sonomoto, K. & Ishizaki, A. (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev*., 24(1): 85-106.

Ekinci, F. & Gurel, M. (2007) Effect of Using Propionic Acid Bacteria as an Adjunct Culture in Yogurt Production. *J. Dairy Sci.*, 91: 892-899.

EPA (Environmental Protection Agency, 2003) Prevention Division Office of Pesticide Rhamnolipid biosurfactant (PC Code 110029). Programs Biopesticides and Pollution.

Erickson, M.C. & Doyle, M.P. (2007) Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *J. Food Prot.*, 70: 2426–2449.

European Food Safety Authority (2007) Scientific committee. Introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA1. Opinion of the Scientific Committee. Question No EFSA-Q-2005-293. EFSA J., 587: 1–16.

Falconí Medina, D.F. (2021) Revisión de las propiedades y aplicaciones de las bacteriocinas en la Industria Farmacéutica y Alimentaria. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador, 136 pp.

Farías, L.M.; Totola, A.H.; Miranda, C.M.S; Carvalho, M.A.R.,& Damasceno, C.A.V. (1994) Extration, partial purification and characterization of a bacteriocin (fragilicin) produced by a strain of Bacteroidesfragilis isolated from Callithix penicillata. *Res. Microbiol.*, 145: 9-16. Doi: 10.1016/0923-2508(94)90062-0

Favaro, L.; Penna, A.L.B. & Todorov, S.D. (2015) Bacteriocinogenic lactic acid bacteria from cheeses - application in biopreservation? *Trends Food Sci. Technol.*, 41: 37–48. doi:10.1016/j.tifs.2014.09.001

Favaro, L. & Todorov, S.D. (2017) Bacteriocinogenic lactic acid bacteria strains for fermented meat preservation: Perspectives, challenges, and limitations. *Probiotics Antimicro. Prot.*, 9: 444–458. doi: 10.1007/s12602-017-9330-6

Fazilah, N.F.; Ariff, A.B.; Khayat, M.E.; Rios-Solis, L. & Halim, M. (2018) Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. *J. Funct. Foods*, 48: 387–399. doi: 10.1016/j.jff.2018.07.039

Fazilah, N.F.; Hamidon, N.H.; Ariff, A.B.; Khayat, M.E.; Wasoh, H. & Halim, M. (2019) Microencapsulación de Lactococcus lactis Gh1 con goma arábiga y Synsepalum dulcificum mediante secado por aspersión para su posible inclusión en yogur funcional.*Molecules*, 24(7): 1422. doi: 10.3390/molecules24071422

Fernández, K.J.; Chanci, I.C.; Wilches, L. & Cardona, J.A. (2014) Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibidor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. *Revista Biosalud*, 13 (1): 45-61.

Fimland, G.; Johnsen, L.; Dalhus, B. & Nissen-Meyer, J. (2005) Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J Peptide Sci*., 11(11): 688-696.

Fimland, G.; Pirneskoski, J.; Kaewsrichan, J.; Jutila, A.; Kristiansen, P.E.; Kinnunen, P.K.J. & Nissen-Meyer, J. (2006) Mutational analysis and membrane-interactions of the b-sheet-like N-terminal domain of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P. *Biochem. Biophys. Acta*, 1764: 1132-1140.

Fleming, H.P.; McFeeters, R.F. & Daeschel, M.A. (1985) The lactobacilli, pediococci andleuconostocs: vegetable products. En: Bacterial Starter Cultures for Foods. Gilliland,S.E. (Ed.), CRC Press, Florida.

Food Safety and Infection Service (2017) Microbiological Testing Program for RTE Meat and Poultry and Pasteurized Egg Products. Disponible en: fsis.usda.gov

Fracchia, L.; Cavallo, M.; Allegrone, G. & Martinotti, M.G. (2010) A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 2: 827-837.

Franz, C.M.A.P.; Holzapfel, W.H. & Stiles, M.E. (1999) Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.*, 47:1–24.

Franz, C.M.A.P.; Stiles, M.E.; Schleifer, K.H.; & Holzapfel, W.H. (2003) Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.*, 88(2–3), 105–122. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00174-0.

Franz, C.M.; Van Belkum, M.J.; Holzapfel, W.H.; Abriouel, H. & Galvez, A. (2007) Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev*., 31(3): 293-310.

Freire Rodríguez, M.J. (2018) Desarrollo de emulsiones dobles y emulsiones dobles gelificadas como análogos de grasa y su aplicación en productos cárnicos funcionales. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España, 253 pp.

Frobisher, M. & Denny, E.R. (1928) A study of *Micrococcus zymogenes*. *J. Bacteriol.*,16: 301–314.

Fu, Y.; Sarkar, P.; Bhunia, A.K. & Yao, Y. (2016) Delivery systems of antimicrobial compounds to food. *Trends Food Sci. Technol.*, 57(A): 165-177. doi: 10.1016/j. tifs.2016.09.013

Fugaban, J.I.I.; Holzapfel, W.H. & Todorov, S.D. (2021) Probiotic potential and safety assessment of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* strains with antibacterial activity against *Listeria* and vancomycin-resistant enterococci. *Curr. Res. Microb. Sci.*, 2: 100070. doi: 10.1016/j.crmicr.2021.100070

Furtado, D.N.; Favaro, L.; Nero, L.A.; de Melo Franco, B.D.G. & Todorov, S.D. (2019) Nisin production by *Enterococcus hirae* DF105Mi isolated from Brazilian goat milk. *Probiot Antimicrob Proteins*., 11(4): 1391-1402.

Gaaloul, N.; Ben Braiek, O.; Hani, K.; Volski, A.; Chikindas, M. & Ghrairi, T. (2015) Isolation and characterization of large spectrum and multiple bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strain from raw bovine milk. *J Appl Microbiol*., 118(2): 343-355.

Gallo, M.; Ferrara, L.; Calogero, A.; Montesano, D. & Naviglio, D. (2020) Relationships between food and diseases: What to know to ensure food safety. *Food Res. Int.*, 137: 109414. Doi: doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109414

Galvéz, A.; Abriouel, H.; Lopéz, R.L.& Omar, N.B. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 120(1-2): 51-70. doi: 10.1016/j. ijfoodmicro.2007.06.001

Galvez, A.; Grande Burgos, M.J.; Lucas Lopéz, R. & Pérez Pulido, R. (2014) Food biopreservation. Food biopreservation, Springer Briefs Food, Heal. Nutr. 3–15. doi: 10.1007/978-1-4939-2029-7

Gänzle, M.G.; Weber, S. & Hammes, W.P. (1999) Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.*, 46(3): 207-217. doi: 10.1016/S0168-1605(98)00205-0

García, B. & Bermejo, B. (2014) Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en Productos Cárnicos Listos para su Consumo en España. Máster Universitario en Gestión de la Calidad y Seguridad Alimentaria. Universidad Politécnica de Valencia.

Garriga, M.; Aymerich, M.; Costa, S.; Monfort, J. & Hugas, M. (2002) Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.*, 19: 509–518. doi: 10.1006/fmic.2002.0498

Ghomrassi, H.; Ben Braïek, O.; Choiset, Y.; Haertlé, T.; Hani, K.; Chobert, J.M. & Ghrairi, T. (2016) Evaluation of marine bacteriocinogenic enterococci strains with inhibitory activity against fishpathogenic Gram-negative bacteria. *Dis. Aquat. Organ.*, 118: 31-43. doi: 10.3354/dao02953

Gill, C. & Jones, T. (1995) The presence of *Aeromonas*, *Listeria* and *Yersinia* in carcass processing equipment at two pig slaughtering plants. *Food Microbiol.*, 12: 135-141.

Giraffa, G. (2002) Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev*., 26(2): 163-171.

Giraffa, G. (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, 88: 215-222. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00183-1

Giri, S.S.; Sen, S.S.; Jun, J.W.; Sukumaran, V. & Park, S.C. (2017) Role of *Bacillus licheniformis* VS16- derived biosurfactant in mediating immune responses in carp rohu and its application to the food industry. *Front. Microbiol.*, 8: 514. doi: 10.3389/fmicb.2017.00514

Gomes, M.Z. V. & Nitschke, M. (2012) Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food Control*, 25: 441.

Gómez-Sala, B.; Muñoz-Atienza, E.; Sánchez, J.; Basanta, A.; Herranz, C.; Hernández, P.E. & Cintas, L.M. (2015) Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. *Eur. Food Res. Technol.*, 241: 341-356.

González-Martínez, B.E.; Gómez-Treviño, M. & Jiménez-Salas, Z. (2013) Bacteriocinas de probióticos. Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, 4(2). Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/revsalpubnut/spn-2003/spn032g.pdf

González-Siso, M.I. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresour. Technol.*, 57: 1-11.

Goñi, M.G.; Tomadoni, B.; Audisio, M.C.; Ibarguren, C.; Roura, S.I.; Moreira, M.R. & Ponce, A.G. (2016) Application of bacteriocins from *Enterococcus hirae* on butterhead lettuce sedes inoculated with *Escherichia coli* O157:H7. *Int. Food Res. J.*, 23(6): 2653-2660.

Granato, D.; Nnes, D.S. & Barba, F.J. (2017) An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends Food Sci. Technol.*, 62: 13-22.

Gratia, A. (1925) Sur unremarquable example d'antagonisme entre deuxsouches de colibacille. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 93: 1040–1042.

Gudiña, E.J.; Teixeira, J.A. & Rodrigues, L.R. (2010) Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids Surf. B.*, 76(1): 298-304. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.11.008

Gudiña, E.J.; Fernandes, E.C.; Teixeira, J.A. & Rodrigues, L.R. (2015a) Antimicrobial and anti-adhesive activities of cell-bound biosurfactant from *Lactobacillus agilis* CCUG31450. *RSC Adv.*, 5: 90960-90968.

Gudiña, E.J.; Pereira, J.F.B.; Costa, R.; Evtuguin, D.V.; Coutinho, J.A.P.; Teixeira, J.A. & Rodrigues, L.R. (2015b) Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. Microb. *Cell Factories*, 14: 14.

Guerrero, I. & Taylor, A. (1994) Meat surface decontamination using lactic acid from chemical and microbial sources. *LWT*, 27(3): 201-209.

Guitián, V.M.; Ibarguren, C.; Soria, C.M.; Hovanyecz, P.; Banchio, C. & Audisio, C. M. (2019). Anti-*Listeria monocytogenes* effect of bacteriocin-incorporated agar edible coatings applied on cheese. *Int. Dairy J.*, 97: 92-98. doi:10.1016/j.idairyj.2019.05.016

Gupta, A. & Tiwari, S.K. (2015) Probiotic potential of bacteriocin-producing *Enterococcus hirae* strain LD3 isolated from dosa batter. *Ann Microbiol.*, 65(4): 2333-2342.

Gupta, A.; Tiwari, S.K.; Netrebov, V. & Chikindas, M.L. (2016) Biochemical properties and mechanism of action of enterocin LD3 purified from *Enterococcus hirae* LD3. *Probiot Antimicrob Proteins.*, 8(3):161-169.

Guzmán Ortiz, M.A. (2021) Resistencia de microorganismos aislados de Kombucha a condiciones del tracto gastrointestinal *in vitro*. Maestría. Centro de Investigaciones y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., 80 pp.

Haba, E.; Bouhdid, S.; Torrego-Solana, N.; Marqués, A.M.; Espuny, M.J.; García-Celma, M.J. & Manresa, A. (2014) Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: Antimicrobial effect against *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Pharm.*, 476(1-2): 134-141. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.09.039

Halász, A.; Baráth, A.; Simon-Sarkadi, L. & Holzapfel, W. (1994) Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.*, 5(2): 42-49.

Hanchi, H.; Mottawea, W.; Sebei, K. & Hammami, R. (2018) The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. *Front. Microbiol.*, 9: 1791. doi: 10.3389/fmicb.2018.01791

Harrison, M. & Davidson, P. (2002) Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls. *Food Technol.*, 56: 69–78.

Hasenhuettl, G.L. (2008) Synthesis and commercial preparation of food emulsifiers. Food emulsifier and their applications, capítulo 2, Hasenhuettl, G.L. & Hartel, R.W. ed.

Hatha, A.A.M.; Ghosh, S.; Einar, R.; Selvam, D.G.A.; Mujeeb Rahiman, K.M.; NAveen, S. & Nifty, J. (2014) Gut associated lactic acid bacteria isolated from the estuarine fish *Mugil cephalus*: molecular diversity and antibacterial activities against pathogens. *Int. J. Aquacult.*, 4(1):1-11.

Hayder, N.H.; Alaa, S. & Abdulmalik, H. (2014) Optimized conditions for bioemulsifier production by local *Streptomyces* sp. SS 20 isolated from hydrocarbon contaminated soil. *Rom. Biotech. Lett.*, 19(1): 8979–8993.

Henning, C.; Vijayakumar, P.; Adhikari, R.; Jagannathan, B.; Gautam, D.; Peter, M. & Muriana, P. (2015) Isolation and taxonomic identity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail foods and animal sources. *Microorganisms*, 3: 80-93. doi: 10.3390/microorganisms3010080

Heredia-Castro, P.Y.; Hernández-Mendoza, A.; González-Córdova, A.F. & Vallejo-Cordoba, B. (2017) Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. Ciencia y Tecnología de América, 42(6): 340-346.

Hernández Carranza, P. (2004) Evaluación de las propiedades físico-químicas y reológicas de yogurt bajo engrasa enriquecido con fibra y calico de yogurt. Tesis Maestría. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Escuela de Ingeniería, Universidad de las Américas Puebla.

Hof, H.; Nichterlein, T. & Kretschmar, M. (1997) Management of listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10:345–357.

Hols, P.; Ledesma-García, L.; Gabant, P. & Mignolet, J. (2019) Mobilization of microbiota commensals and their bacteriocins for therapeutics. *Trends Microbiol*., 27(8): 690-702.doi: 10.1016/j.tim.2019.03.007

Holt, J.H.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. & Williams, S.T. (1994) Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology, Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland. 9th Edition.

Holzapfel, W.H.; Geisen, R. & Schillinger, U. (1995) Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.*, 24(3), 343-362.

Holzapfel, W.H. (2002) Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.*, 75: 197-212.

Hu, X.; Mao, R.; Zhang, Y.; Teng, D.; Wang, X.; Xi, D.; Huang, J. & Wang, J. (2014) Biotechnical paving of recombinant enterocin A as the candidate of anti-Listeria agent. *BMC Microbiol.*, 14(1):220. doi: 10.1186/s12866-014-0220-8

Hugh, R. (1959) Motile streptococci isolated from the oropharyngeal region. *Can J Microbiol.*, 5: 351–354.

Hyink, O.; Balakrishnan, M. & Tagg, J.R. (2005) *Streptococcus rattus* strain BHT produces both a class I two-component lantibiotic and a class II bacteriocin. *FEMS Microbiol Lett*., 252(2): 235-241.

Issepi, R.; Stefani, S.; Niederhausern, S.; Bondi, M.; Sabia, C. & Messi, P. (2019) Characterization of Anti-Listeria monocytogenes Properties of two Bacteriocin-Producing Enterococcus mundtii Isolated from Fresh Fish and Seafood. *Curr. Microbiol.*, 76(9): 1010-1019. doi: 10.1007/s00284-019-01716-6

Ivanov, I. (1962) Untersuchungen über die Listeriose der Schaffe in Bulgarien. *Monatschr. Vet. Med.*, 17:729–736.

Iyer, A.; Mody, K. & Jha, B. (2006) Emulsifying properties of a marine exopolysaccharide. *Enzyme Microb. Technol.*, 38(1-2): 220-222.

Jaouani, I.; Abbassi, M.S.; Ribeiro, S.C.; Khemiri, M.; Mansouri, R.; Messadi, L. & Silva, C.C.S. (2015) Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia. *J. Appl. Microbiol.*, 119: 1089–1100. doi: 10.1111/jam.12916

Jay, J.; Loessne, M. & Golden, D. (2005) Modern food microbiology. 7ma Edición, Springer, Boston, MA, 790 pp. ISBN: 978-0-387-23413-7. doi: 10.1007/b100840

Johnson, E.M.; Jung, D.Y.G.; Jin, D.Y.Y.; Jayabalan, D.R.; Yang, D.S.H. & Suh, J.W. (2018) Bacteriocins as food preservatives: challenges and emerging horizons. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 58, 2743–2767. doi: 10.1080/10408398.2017.1340870

Jurado, R. L.; Farley, M.M.; Pereira, E.; Harvey, R.C.; Schuchat, A.; Wenger, J.D. & Stephens, D.S. (1993) Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.*, 17:224–227.

Kalina, A.P. (1970) The taxonomy and nomenclature of enterococci. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 20: 185–189.

Kandler, O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw.*, 49: 209-224.

Kar, S.; Sanderson, H.; Roy, K.; Benfenati, E. & Leszczynski, J. (2020) Ecotoxicological assessment of pharmaceuticals and personal care products using predictive toxicology approaches. *Green Chem.*, 22(5): 1458–1516. doi: 10.1039/c9gc03265g

Kashani, H.H.; Nikzad, H.; Mobaseri, S. & Hoseini, E.S. (2012) Synergism effect of nisin peptide in reducing chemical preservatives in food industry. *Life Sci. J.*, 9(1): 496-501.

Khan, H.; Flint, S. & Yu, P.L. (2010) Enterocins in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 141(1–2): 1–10. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.005

Khelef, N.; Lecuit, M.; Buchrieser, C.; Cabanes, D.; Dussurget, O. & Cossart, P. (2006) *Listeria monocytogenes* and the Genus *Listeria*. *Prokaryotes*, 4: 404-476. Doi: doi.org/10.1007/0-387-30744-2_11

Khopade, A.; Biao, R.; Liu, X.; Mahadik, K.; Zhang, L. & Kokare, C. (2012) Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination*, 285: 198–204.

Kimoto-Nira, H.; Suzuki, C.; Sasaki, K.; Kobayashi, M. & Mizumachi, K. (2010) Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under *in vitro* conditions simulated

gastrointestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.*, 143(3): 226-229. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.033

Kiran, S.; Balu, S.; Thajuddin, N. & Selvin, J. (2014) Production of glycolipid biosurfactant from sponge-associated marine actinobacterium *Brachybacterium paraconglomeratum* MSA21. *J. Surfactants Deterg.*, 17: 531-542. doi: 10.1007/s11743-014-1564-7

Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 39-85.

Koohmaraie, M.; Arthur, T.; Bosilevac, J.; Guerini, M.; Shackelford, S. & Wheeler, T. (2005) Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Sci.*, 71(1): 79-91.

Kos, B.; Suskovic, J.; Goreta, J. & Matosic, S. (2000) Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technol. Biotechnol.*, Kaciceva, 38(2): 121-127.

Kosaric, N. (2001) Biosurfactants and their Applications for Soil Bioremediation. *Food Technol. Biotechnol.*, 39(4): 295-304.

Kosaric, N. & Sukan, F.V. (2014) Biosurfactants: Production and utilization—processes, technologies and economics. CRC Press, Science, 389 pp.

Kosegarten-Conde, C.E. & Jiménez-Munguía, M.T. (2012) Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 6(2): 1-18.

Koutinas, A.A.; Papapostolou, H.; Dimitrellou, D.; Kopsahelis, N.; Katechaki, E.; Bekatorou, A. & Bosnea, L.A. (2009) Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresour. Technol.*, 100: 3734-3739.

Kralova, I. & Sjöblom, J. (2009) Surfactants used in Food Industry: a Review. *J. Dispers. Sci. Technol.*, 30(9): 1363-1383. doi: 10.1080/01932690902735561

Lahtinen, S.; Ouwehand, A.C.; Salminen, S. & von Wright, A. (Eds.) (2012) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Fourth Edition (4th ed.). CRC Press. doi: 10.1201/b11503

Laiho, S.; Williams, R.P.W.; Poelman, A.; Appelqvist, I. & Logan, A. (2017) Effect of whey protein phase volumen on the tribology, rheology and sensory properties of fat-free stirred yogurts. *Food Hydrocoll.*, 67: 166-177.

Landete, J.M.; Ferrer, S.; Polo, L. & Pardo, I. (2005) Biogenic amines in wine from three Spanish regions. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1119-1124.

Lara, V.M.; Vallejo, M.; Parada, R.; Henao Ossa, J.S.; Gliemmo, M.F. & Campos, C.A. (2020) Characterization of the emulsifying activity of biosurfactants produced by lactic acid bacteria isolated from the Argentinian Patagonia. *J. Dispersion Sci. Technol.*, 1–8. doi:10.1080/01932691.2020.1845961

Lauková, A. & Czikková, S. (1999) The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.*, 87: 182–182. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00810.x

Lebreton, F.; Manson, A.L.; Saavedra, J.T.; Straub, T.J.; Earl, A.M. & Gilmore, M.S. (2017) Tracing the enterococci from Paleozoic origins to the hospital. *Cell.*, 169(5):849-861. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.027

Lee, W.J. & Lucey, J.A. (2010) Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 23: 1127-1136.

Lefoka, M. (2009) The Survival of Microbial Pathogens in Dairy Products. Tesis de Maestría. University of the Free State, Bloemfontein, 101 pp.

Lewus, C.B. & Montville, T.J. (1991) Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Meth.*, 13: 145-150.

Leyer, G.J.; Wang, L.L. & Johnson, E.A. (1995) Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3752–3755.

Lianou, A. & Sofos, J.N. (2007) A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *J. Food Prot.*, 70: 2172–2198.

Lianou, A.; Kakouri, A.; Pappa, E.C. & Samelis, J. (2017) Growth interactions and antilisterial effects of the bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. cremoris M104 and *Enterococcus faecium* KE82 strains in thermized milk in the presence or absence of a commercial starter culture. *Food Microbiol.*, 64: 145–154. doi: 10.1016/j.fm.2016.12.019

Limón-Martínez, R.J.; Olivas-Armendáriz, I.; Sosa-Rodarte, E.; Rodríguez-Rodríguez, C.I.; Hernández-Paz, J. F.; Acosta-Torres, L.S. & Martel-Estrada, S.A. (2019) Evaluation of *in vitro* bioactivity and in vitro biocompatibility of Polycaprolactone/Hyaluronic acid/Multiwalled Carbon Nanotubes/Extract from Mimosa Tenuiflora composites. *Biomed Mater Eng*, 30(1): 97-109. doi: 10.3233/BME-181036

Linscott, A.J. (2011) Food-Borne illnesses. *Clin. Microbiol. Newsl.*, 33(6): 41- 45.

Little, C.L.; Amar, C.F.; Awofisayo, A. & Grant (2012) Hospital-acquired listeriosis associated with sandwiches in the UK: a cause for concern. *J Hosp. Infec.*, 82(1): 13 -18.

Liu, F.N.; Wen, K.; Li, G.H.; Yang, X.D.; Kocher, J.; Bui, T.; Jones, D.; Pelzer, K.; Clark-Deener, S. & Yuan, L.J. (2014). Dual functions of *Lactobacillus acidophilus* NCFM as protection against rotavirus diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 58(2), 169–176.

Lopetuso, L.R.; Giorgio, M.E.; Saviano, A.; Scaldaferri, F.; Gasbarrini, A. & Cammarota, G.(2019) Bacteriocins and bacteriophages: therapeutic weapons for gastrointestinal diseases? *Int. J. Mol. Sci*., 20(1): 183.

Lorber, B. (1997) Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.*, 24:1–9.

Lourens-Hatting, A. & Vilhoen, B.C. (2001) Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.*, 11: 1-17.

Louria, D. B.; Hensle, T.; Armstrong, D.; Collins, H.S.; Blevins, A.; Krugman, D. & Buse, M. (1967) Listeriosis complicating malignant disease: A new association. *Ann. Intern. Med.*, 67:260–281.

Lücke, F. (2000) Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.*, 56(2): 105-115.

Ludwig, W.; Seewaldt, E.; Kilpper-Bälz, R.; Schleifer, K.H.; Magrum, L.; Woese, C.R.; Fox, G.E. & Stackebrandt, E. (1985) The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Gen. Microbiol.*, 131:543–551.

Ludwig, W.; Schleifer, K-H. & Whitman, W.B. (2009) Family IV. Enterococcaceae fam. nov., p 594–623. In De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman

WB (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed, vol 3. The Firmicutes. Springer, New York, NY.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M. & Parker, J. (2004) Brock. Biología de los microorganismos. 10ª ed. Ed. Prentice Hall. Madrid, España. Pp. 122, 352, 400-402, 991.

Maky, M.A.; Ishibashi, N.; Zendo, T.; Perez, R.H.; Doud, J.R.; Karmi, M. & Sonomoto, K. (2015) Enterocin F4–9, a novel O-linked glycosylated bacteriocin. *Appl Environ Microbiol*., 81(14): 4819-4826.

Malheiros, P.S.; Sant'Anna, V.; Todorov, S.D. & Franco, B.D.G.M. (2015) Optimization of growth and bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* subsp *sakei* 2a. Brazilian. *J. Microbiol.*, 46: 825–834. doi: 10.1590/S1517-838246320140279

Manivasagan, P.; Sivasankar, P.; Venkatesan, J.; Sivakumar, K. & Kim, S. (2014) Optimization, production and characterization of glycolipid biosurfactant from the actinobacterium, *Streptomyces* sp. MAB36. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 37(5):783-797. doi: 10.1007/s00449-013-1048-6

Marchant, R. & Banat, I.M. (2012) Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnol Lett.*, 34(9): 1597-1605. doi: 10.1007/s10529-012-0956-x

Marco, M.L.; Heeney, D.; Binda, S.; Cifelli, C.J.; Cotter, P.D.; Foligne, B.; Gänzle, M.; Kort, R.; Pasin, G.; Pihlanto, A.; Smid, E.J. & Hutkins, R. (2017) Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 44: 94-102. doi: 10.1016/j.copbio.2016.11.010

Marguet, E.R.; Vallejo, M.; SierraltaChichisola, V. & Quispe, J.L. (2011) Actividad antagonista de bacterias lácticas aisladas del medio marino contra cepas de *Listeria*. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.*, 45(2): 305-10.

Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, M.C.; Izquierdo-Pulido, M.; Venciana-Nogués, M.T. & Hernández-Jover, T. (1995) Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. *Ann. Fals. Exp. Chim. Toxicol.*, 88: 119-140.

Markande, A.R.; Acharya, S.R. & Nerurkar, A.S. (2013) Physicochemical Characterization of a Thermostable Glycoprotein Bioemulsifier from *Solibacillus silvestris* AM1. *Process Biochem.*, 48: 1800-1808.

Martín, M.; Gutiérrez, J.; Criado, R.; Herranz, C.; Cintas, L.M. & Hernández, P.E. (2006). Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of Enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Protect.*, 69: 520-531. doi: 10.4315/0362-028X-69.3.520

Martín, M.; Perich, A.; Gómez, D.; Yangüela, J.; Rodríguez, A. & Garriga, M. (2014) Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food Microbiol.*, 44: 119 -127.

Massa, S.; Trovatelli, L.D. & Canganella, F. (1991) Survival of *Listeria monocytogenes* in yogurt during storage at 48C. *Lett. Appl. Microbiol.*, 13:112–114.

Matamoros, S.; Leroi, F.; Cardinal, M.; Gigout, F.; Kasbi Chadli, F. & Cornet, J. (2009) Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *J Food Prot.*, 72, 365-374.

McClements, D.J.; Decker, E.A.; Park, Y. & Weiss, J. (2009) Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 49(6): 577-606.

McClements, D.J. (2015) Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques. Third Edition. CRC Press. ISBN: 9781498726696.

McCurdy, S.M.; Peutz, J.D. & Wittman, G. (2009) Storing Food for Safety and Quality. Cooperative Extension Service Food Preservation Publications, Moscow, Russia.

McDonald, K. & Sun, D. (1999) Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 52(1-2): 1-27.

McKinley, M.C. (2005) The nutrition and health benefits of yogurt. *Int. J. Dairy Technol.*, 58: 1-12.

McLauchlin, J.; Mitchell, R.T.; Smerdon, W.J. & Jewell, K. (2004)*Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 92, 15–33.

Meade, E.; Slattery, M.A. & Garvey, M. (2020) Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the Fight Against Drug Resistanta Species: Resistance Is Futile? *Antibiotics*, 9(1): 1-18. doi: 10.3390/antibiotics9010032

Meireles, A.; Giaouris, E. & Simões, M. (2016) Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. *Food Res. Int.*, 82, 71-85.

Merino, L. (2019) Bacterias lácticas y sus metabolitos para disminuir la formación de biofilm de *Salmonella* spp. en granjas avícolas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina, 246 pp.

Migaw, S.; Ghrairi, T.; Le Chevalier, P.; Brillet, B.; Fleury, Y. & Hani, K. (2013) Isolation and characterization of enterococci bacteriocinic strains from Tunisian fish viscera. *Food Nut. Sci.*, 4: 701- 708. doi: 10.4236/fns.2013.46089

Miller, G.L. (1969) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426–428.

Mishera, V. & Prasad, D.N. (2005) Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 103: 109-115.doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.047

Mnif I. & Ghribi D. (2016) Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. *J. Sci. Food Agric.*, 96(13): 4310-4320. doi: 10.1002/jsfa.7759

Mohamed, J.A. & Huang, D.B. (2007) Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol.*,56: 1581–1588.

Mokoena, M.P. (2017) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules.*, 22(8): 1255.

Moldes, A.B.; Paradelo, E.; Vecino, X.; Cruz, J.M.; Gudiña, E.; Rodrigues, L.; Teixeira, J.A.; Dominguez, J.M. & Barral, M.T. (2013) Partial characterization of biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium dodecyl sulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil.*Biomed. Res. Int.*, 2013: 961842. doi: 10.1155/2013/961842

Montaño, A.; De Castro, A. & Rejano, L. (1992) Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de productos vegetales. Grasas y Aceites, 43: 352-360.

Monteiro, A.S.; Bonfim, M.R.Q.; Domingues, V.S.; Corrêa, A.; Siqueira, E.P.; Zani, C.L. & Santos, V.L. (2010) Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. *Bioresour. Technol.*, 101: 5186–5193. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.041

Montel Mendoza, M.G.; Ale, C.E.; Nader, M.E.F. & Pasteris, S.E. (2015) Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* CRL 1826 Isolated from captive bullfrog: evaluation of its mode of action against *Listeria monocytogenes* and gram-negatives. *Omics Int.*, *J. Bioproces Biotech.*, 5(8): 1-9. doi: 10.4172/2155-9821.1000250

Morgan, S.; Galvin, M.; Ross, R. & Hill, C. (2001) Evaluation of a spraydried lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. *Lett. Appl. Microbiol.*, 33: 387–391. doi: 10.1046/j.1472-765X.2001.01016.x

Mujumdar, S.; Joshi, P. & Karve, N. (2019) Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter* spp.: A review. *J. Basic Microbiol.*, 59(3), 277-287. doi: 10.1002/jobm.201800364

Mundt, J.O. (1986) Enterococci, p 1065–1065. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (ed), Bergey's Manual of systematic bacteriology, vol 2. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Mundt, J.O. & Graham, W.F. (1968)*Streptococcus faecium* var. *casseliflavus*, nov. var. *J Bacteriol.*, 95: 2005–2009.

Muñoz, A.; Ananou, S.; Gálvez, A.; Martínez-Bueno, M.; Rodríguez, A.; Maqueda, M. & Valdivia, E. (2007) Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: bactericidal synergism with heat. *Int. Dairy J.*, 17: 760–769. doi: 10.1016/j.idairyj.2006.09.006

Murdoch, D.R.; Corey, G.R.; Hoen, B.; Miró, J.M.; Fowler, V.G.; Bayer, A.S.; Karchmer, A.W.; Olaison, L.; Pappas, P.A.; Moreillon, P.; Chambers, S.T.; Chu, V.H.; Falcó, V.; Holland, D.J.; Jones, P.; Klein, J.L.; Raymond, N.J.; Read, K.M.; Tripodi, M.F.; Utili, R.; Wang, A.; Woods, C.W. & Cabell, C.H. (2009) Clinical presentation, etiology and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med*, 169: 463–473.

Murray, E.G.D.; Webb, R.E. & Swann, M.B.R. (1926) A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.*, 29:407–439.

Murray, M. & Richard, J. (1997) Comparative Study of the Antilisterial Activity of Nisin A and Pediocin AcH in Fresh Ground Pork Stored Aerobically at 5°C. *J. Food Protect.*, 60(12): 1534-1540.

Naidu, A.S. & Clemens, R.A. (2000) Probiotics. In: NAIDU, A.S. Natural Food Antimicrobial Systems. Boca Raton: CRC Press: 818.

Naser, S.M.; Vancanneyt, M.; Hoste, B.; Snauwaert, C.; Vandemeulebroecke, K. & Swings, J. (2006) Reclassification of *Enterococcus flavescens* Pompei et al. 1992 as a later synonym of *Enterococcus casseliflavus* (ex Vaughan et al. 1979) Collins et al. 1984 and *Enterococcus*

saccharominimus Vancanneyt et al. 2004 as a later synonym of *Enterococcus italicus* Fortina et al. 2004. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 56:413–416. doi: 10.1099/ijs.0.63891-0

Navon-Venezia, S.; Zosim, Z.; Gottlieb, A.; Legmann, R.; Carmeli, S.; Ron, E.Z. & Rosenberg, E. (1995) Alasan, a New Bioemulsifier from *Acinetobacter* radio resistens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3240-3244.

Nawaz, F.; Khan, M.N.; Javed, A.; Ahmed, I.; Ali, N.; Ali, M.I.; Bakhtiar, S.M. & Imran, M. (2019) Genomic and functional characterization of *Enterococcus mundtii* QAUEM2808, isolated from artisanal fermented milk product dahi. *Front Microbiol.*, 10:434. doi: 10.3389/fmicb.2019.00434

Neu, T.R. (1996) Significance of Bacterial Surface-Active Compounds in Interaction of Bacteria with Interfaces. *Microbiol. Rev.*, 60: 151-166.

Nguyen, P.T.M.; Kravchuk, O.; Bhandari, B. & Prakash, S. (2017) Effect of different hydrocolloids on texture, rheology, tribology and sensory perception of texture and mouthfeel of low-fat pot-set yogurt. *Food Hydrocoll.*, 72: 90-104.

Nitschke, M. & Costa, S.G.V.A.O. (2007) Biosurfactants in food industry.*Trends Food Sci. Technol.*, 18(5): 252-259. doi: 10.1016/j.tifs.2007.01.002

Nitschke, M.; Araújo, L.V.; Costa, S.G.V.A.O.; Pires, R.C.; Zeraik, A.E.; Fernandes, A.C.L.B.; Freire, D.M.G. & Contiero, J. (2009) Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49(2): 241-247. doi: 10.111/j.1472-765X.2009.02646.x

Nollet, L. & Toldrá, F. (2006) Avance Technologies for Meat. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC.

Noordhout, C.M.; Devleesschauwer, B.; Angulo, F.J.; Verbeke, G.; Haagsma, J.; Kirk, M.; Havelaar, A. & Speybroeck, N. (2014) The global burden of Listeriosis: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis., 14(11): 1073-1082. doi: 10.1016/51473-3099(14)70870-9

Noor Nawaz, A.S.; Jagadeesh, K.S. & Krishnaraj, P.U. (2017) Isolation and Screening of Lactic Acid Bacteria for Acidic pH and Bile Tolerance. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 6(7): 3975-3980. doi: 10.20546/ijcmas.2017.607.411

Nørrung, B.; Andersen, J.K. & Buncic, S. (2009) Main Concerns of Pathogenic Microorganisms. Meat Safety of Meat and Processed Meat. Toldrá, F (ed.). Springer New York, pp. 3-29.

Núñez Martínez, R. (2020) Importancia actual del género *Enterococcus* spp. en los alimentos y metodologías para su caracterización molecular. Máster. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragosa, Españo, 50 pp.

O'Connor, P.M.; Ross, R.P.; Hill, C. & Cotter, P.D. (2015) Antimicrobial antagonists against food pathogens: A bacteriocin perspective. *Curr. Opi. Food Sci.*, 2: 51–57. doi: 10.1016/j.cofs.2015.01.004

O'Connor, P.M.; Kuniyoshi, T.M.; Oliveira, R.P.; Hill, C.; Ross, R.P. & Cotter, P.D. (2020) Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 61, 160–167. doi: 10.1016/j.copbio.2019.12.023.

Oey, I.; Lille, M.; Van Loey, A. & Hendrickx, M. (2008) Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit and vegetable-based food products: A review. *Trends Food Sci Technol.*, 19(6), 320–328.

Ogaki, M.B.; Rocha, K.R.; Terra, M.R.; Furlaneto, M.C. & Furlaneto-Maia, L. (2016) Screening of the enterocin-encoding genes and antimicrobial activity in *Enterococcus* species. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 1026–1034. doi: 10.4014/jmb.1509.09020

O'Grady, J.; Ruttledge, M.; Sedano-Balbás, S.; Smith, T.J.; Barry, T. & Maher, M. (2009) Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR. *Food Microbiol.*, 26: 4–7.

Oliver, S.P.; Jayarao, B.M. & Almeida, R.A. (2005) Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2(2): 115-129. doi: 10.1089/fpd.2005.2.115

Oliver, S.P.; Patel, D.A.; Callaway, T.R. & Torrence, M.E. (2009) ASAS Centennial Paper: Developments and future outlook for preharvest food safety. *J. Anim. Sci.*, 87: 419–437.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2007) Análisis de Riesgos Relativos a la Inocuidad de los Alimentos: Guía para las autoridades nacionales de inocuidad de los alimentos. Roma

Organización Mundial de la Salud (2004) WHO | Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, MRA Series 4 & 5.

Organización Mundial de la Salud(2014) Estadísticas Sanitarias Mundiales. Disponible en: who.int/mediacentre/news/releases/2014/world-health-statistics-2014/es/

Organización Mundial de la Salud (2020) Inocuidad de los alimentos. Disponible en: who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety

Organización Panamericana de Salud & Organización Mundial de la Salud (2014) Sistemas de Vigilancia Epidemiológica. Disponible en: paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5807&Itemid=41178&lang=es

Ortiz, S.; López, V. & Martínez, J.V. (2014) Control of *Listeria monocytogenes* contamination in an Iberian pork processing plant and selection of benzalkonium chloride-resistant strains. *Food Microbiol.*, 39: 81- 88.

Özdemir, G.B.; Oryaşın, E.; Bıyık, H.H.; Özteber, M. & Bozdoğan, B. (2011) Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. *Indian J. Medical Microbiol.*, 51: 182-187. doi: 10.1007/s12088-011-0143-0

Palgan, I.; Caminiti, I.M.; Muñoz, A.; Noci, F.; Whyte, P.; Morgan, D.J.; Cronin, D.A.&Lyng, J.G. (2011) Effectiveness of high intensity light pulses (HILP) treatments for the control of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice, orange juice and milk. *Food Microbiol.*, 28(1), 14–20. doi: 10.1016/j.fm.2010.07.023

Pan, Y.; Breidt, F. & Kathariou, S. (2006) Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(12): 7711-7717.

Panahi, S.; Fernandez, M.A.; Marette, A. & Tremblay, A. (2017) Yogurt, diet quality and lifestyle factors. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 71(5): 573.

Pandey, A.; Du, G.; Sanromán, M.Á.; Soccol, C.R. & Dussap, C.G. (2017) Current developments in biotechnology and bioengineering. Food and beverages industry, Amsterdam Elsevier, ISBN 978-0-444-63666-9, 500 pp.

Panesar, P.; Kennedy, J.; Gandhi, D. & Bunko, K. (2007) Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chem.*, 105: 1-14.

Panesar, P.S.; Kennedy, J.F.; Knill, C.J. & Kosseva, M. (2010) Production of L (+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 53: 219-226.

Parada, R.; Beraud, L.; Andoro, D.; Sosa, F.; Marguet, E.R. & Vallejo, M. (2017). Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de invertebrados marinos de la costa del Chubut (Patagonia, Argentina). *Bionatura*, 2, 456-459. doi: 10.21931/RB/2017.02.04.8

Parish, M.E.; Beuchat, L.R.; Suslow, T.V.; Harris, L.J.; Garrett, E.H. & Farber, J.N. (2003) Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2, 161–173.

Parra Huertas, R.A. (2010) Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1): 93-105.

Pawar, D.; Malik, S.; Bhilegaonkar, K. & Barbuddhe, S. (2000) Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. *Meat Sci.*, 56(3): 215-219. doi: 10.1016/s0309-1740(00)00043-7

Paz Yépez, C.A. (2019) Influencia de factores inherentes al alimento y al individuo sobre la digestibilidad de lípidos de origen vegetal. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España, 214 pp.

Perez, R.H.; Zendo, T. & Sonomoto, K. (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb Cell Fact.*, 13(Suppl 1): S3.

Perumal, V.; Repally, A.; Dasari, A. & Venkatesan, A. (2016) Partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* DU10 and its probiotic attributes. *Prep Biochem Biotechnol*., 46(7): 686-694.

Perumal, V. & Venkatesan, A. (2017) Antimicrobial, cytotoxic effect and purification of bacteriocin from vancomycin susceptible *Enterococcus faecalis* and its safety evaluation for probiotization. *LWT*, 78: 303-310.

Phumisantiphong, U.; Siripanichgon, K.; Reamtong, O. & Diraphat, P. (2017) A novel bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 478 exhibits a potent activity against vancomycin-resistant enterococci. *PLoS One*., 12(10): e0186415.

Pingitore, E.V.; Todorov, S.D.; Sesma, F. & De Melo Franco, B.D.G. (2012) Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. *Food Microbiol.*, 32: 38–47. doi: 10.1016/j.fm.2012.04.005

Pirie, J.H.H. (1927) A new disease in veld rodents, "Tiger River disease". *Publ. S. Afr. Inst. Med. Res.*, 3:163–186.

Pleissner, D. & Venus, J. (2016) Utilization of protein-rich residues in biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100: 2133-2140.

Pohl, A.M.; Pouillot, R. & Van Doren, J.M. (2017) Changing US population demographics: What does this means for Listeriosis incidence and exposure? *Foodborne Pathog. Dis.*, 14:524-530.

Poolman, B. (1993) Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 125-148.

Potel, J. (1952) Zur granulomatosis infantiseptica. *Zbl. Bakteriol. Orig.*, 158:329–331.

Poyart-Salmeron, C.; Carlier, C.; Trieu-Cuot, P.; Courtieu, A.L. & Courvalin, P. (1990) Transferable plasmidmediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet*, 335:1422–1426.

Poyart-Salmeron, C.; Trieu-Cuot, P.; Carlier, C.; MacGowan, A.; McLauchlin, J. & Courvalin, P. (1992) Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36:463–466.

Prazeres, A.R.; Carvalho, F. & Rivas, J. (2012) Cheese whey management: A review. *J. Environ. Manage.*, 110: 48-68.

Prudêncio, C.V.; dos Santos, M.T. & Vanetti, M.C.D. (2015) Strategies for the use of bacteriocins in gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. *J. Food Sci. Technol.*, 52: 5408–5417. doi: 10.1007/s13197-014-1666-2

Public Health England (2021) Identification of *Streptococcus* species, *Enterococcus* species and morphologically similar organisms. UK Standards for Microbiologu Investigations, issued by th Standards Unit, National Infection service, PHE, 4(4), 31 pp.
Disponible en:
assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1099677/ID_4i4.pdf

Qiao, X.; Du, R.; Wang, Y.; Han, Y. & Zhou, Z. (2020) Isolation, characterisation and fermentation optimisation of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium*. *Waste Biomass Valorization*., 11(7): 3173-3181.

Ramírez Navas, J.S. (2012) Aprovechamiento industrial de Lactosuero mediante procesos fermentativos. Publicaciones e Investigación, 6(June), 69. doi: 10.22490/25394088.1100

Ray, B. & Bhunia, A. (2007) Fundamental Food Microbiology, Fourth Edition (CRC Press).

Rico, D.; Martin-Diana, A.B.; Barat, J.M. & Barry-Ryan, C. (2007) Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 18(7), 373–386.

Rivero, L.V. (2018) Selección de bacterias lácticas autóctonas para su potencial aplicación en la conservación de alimentos de origen vegetal minimamente procesados. Tesis Doctoral, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina, 300 pp.

Roces, C.; Rodríguez, A. & Martínez, B. (2012) Cell wall-active bacteriocins and their applications beyond antibiotic activity. *Probiot Antimicrob Proteins*., 4(4): 259-272.

Rodrigues, L.; Van der Mei, H.C.; Teixeira, J. & Oliveira, R. (2004) Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(7): 4408-4410.

Rodrigues, L.; Banat, I. M.; Teixeira, J. & Oliveira, R. (2006a) Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57(4), 609-618.

Rodrigues, L.R.; Teixeira, J. A.; van der Mei, H.C. & Oliveira, R. (2006b) Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids Surf. B.*, 49(1), 79-86.

Rodrigues, L.R. & Teixeira, J.A. (2008) Biosurfactants production from cheese whey. Advances in Cheese Whey Utilization, Cerdán, M.E., González-Siso, M.I. and Becerra, M. (Eds) (Transworld Research Network, Kerala, India): 81.

Rodríguez, R. (1996) Higiene y sanidad de las carnes de consumo. Jornada: Las Carnes en la Nutrición y Salud Humana. En Estudios de la Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires. Vol. 19: 13-27. Eds. Instituto Estudios Interdisciplinarios en Ciencia y Tecnología, Buenos Aires, Argentina.

Rodriguez, A.; Autio, W.R. & McLandsborough, L.A. (2007) Effect of biofilm dryness on the transfer of *Listeria monocytogenes* biofilms grown on stainless steel to bologna and hard salami. *J. Food Prot.*, 70: 2480-2484.

Rodríguez, N.; Salgado, J.M.; Costés, S. & Domínguez, J.M. (2010) Alternatives for biosurfactants and bacteriocins extraction from *Lactococcus lactis* cultures producer under different pH conditions. *Lett. Appl. Microbiol.*, 51: 226–233. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02882.x

Rodríguez, N. (2013) Efecto de la bacteria ácido láctica B2® como biopreservante, sobre los patógenos de interés, la microbiota natural y las propiedades fisicoquímicas en un producto cárnico terminado. Universidad de La Sabana.

Rosa, C.M.; Franco, B.D.G.M.; Montville, T.J. & Chikindas, M.L. (2002) Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a brazilian sausage isolated, *Lactobacillus sakei* 2a. *J. Food Saf.*, 22: 39-54.

Ruiz-Rodríguez, L.; Vera Pingitore, E.; Rollan, G.; Cocconcelli, P.S.; Fontana, C.; Saavedra, L. & Hebert, E. M. (2016) Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented quinoa sourdoughs. *J.Appl.Microbiol.*, 120(5): 1289-1301.

Rulli, M.M.; Álvarez, A.; Fuentes, M.S. & Colin, V.L. (2019) Production of a microbial emulsifier with biotechnological potential for environmental applications. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 174: 450-466.

Sabo, S.S.; Pérez-Rodríguez, N.; Domínguez, J.M. & Oliveira, R.P.S. (2017) Inhibitory substances production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa cultured in hydrolyzed cheese whey supplemented with soybean flour and their antimicrobial efficiency as biopreservatives on fresh chicken meat. *Food Res. Int.*, 99: 762-769.

Sabo, S.S.; Converti, A.; Ichiwaki, S. & Oliveira, R.P.S. (2019) Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in supplemented whey poder formulations. *J. Dairy Sci.*, 102(1): 87-99. doi: 10.3168/jds.2018-14881

Sachdev, D.P. & Cameotra, S.S. (2013) Biosurfactants in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(3): 1005-1016. doi: 10.1007/s00253-012-4641-8

Sáenz-Marta, C.I.; Ballinas-Casarrubias, M.L.; Rivera-Chavira, B.E. & Nevárez-Moorillón, G.V.(2015) Biosurfactants as Useful Tools in Bioremediation. Advances in bioremediation of wastewater and polluted soil, Naofumi Shiomi (ed). doi: 10.5772/60751

Saguir, F.M. & Manca de Nadra, M.C. (2002) Effect of l-malic and citric acids metabolism on the essential amino acid requirements for *Oenococcus oeni* growth. *J. Appl. Microbiol.*, 93(2): 295-301.

Saguir, F.M. & Manca de Nadra, M.C. (2007) Improvement of a chemically defined medium for the sustained growth of *Lactobacillus plantarum*: nutritional requirements. *Curr. microbiol.*, 54(6): 414.

Saguir, F.M.; Loto Campos, I.E. & Manca de Nadra, M.C. (2008) Utilization of amino acids and dipeptides by *Lactobacillus plantarum* from orange in nutritionally stressed conditions. *J. Appl. Microbiol.*, 104(6), 1597-1604.

Sánchez Hernández, F.J. (2016) *Listeria monocytogenes*: un reto para la seguridad alimenaria. *Farma Journal*, 1(2): 157-161.

Sánchez Valenzuela, A., Ben Omar, N., Pérez Pulido, R., Abriuouel Ayani, H. y Gálvez, A. (2009) Resistencia a antimicrobianos en enterococos aislados de alimentos de origen animal, pescado y mariscos. Real Academia de Ciencias Veterianarias de Andalucía Oriental, ISSN 1130-2534, 22: 51-62.

Santos, D.K.F.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Santos, V.A. & Sarubbo, L.A. (2016) Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(3): 401. doi: 10.3390/ijms17030401

Satpute, S.K.; Dhakephalkar, P.K. & Chopade, B.A. (2005) Biosurfactants and bioemulsifiers in hydrocarbon biodegradation and spilled oil bioremediation. Indo-Italian brain storming workshop on technology transfer for industrial applications of novel methods and materials for environmental problem: 1–18.

Satpute, S.K.; Banat, I.M.; Dhakephalkar, P.K.; Banpurkar, A.G. & Chopade, B.A. (2010a) Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnol. Adv.*, 28(4): 436-450. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.02.006

Satpute, S.K.; Banpurkar, A.G.; Dhakephalkar, P.K.; Banat, I.M. & Chopade, B.A. (2010b) Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 30(2): 127-144. doi: 10.3109/07388550903427280

Satpute, S.K.; Płaza, G.A. & Banpurkar, A.G. (2017) Biosurfactants' production from renewable natural resources: example of innovative and smart technology in circular bioeconomy. *Management Systems in Production Engineering*, 25(1): 46-54. doi: 10.1515/mspe-2017-0007

Satpute, S.K.; Zinjarde, S. & Banat, I.M. (2018) Recent updates on biosurfactant's in Food industry. *Microbial Cell Factories*. Boca Raton: CRC Press, 1-20 pp. doi: 10.1201/b22219-1

Shah, N.P. (2003) Yogurt: The product and its manufacture. Encyclopedia of food sciences and nutrition. Caballero, B.; Trugo, L.C. and Finlas, P.M. (eds). Academic Press, New York, USA, 6252–6259.

Shakerian, M.; Razavi, S.H.; Ziai, S.A.; Khodaiyan, F.; Yarmand, M.S. & Moayedi, A. (2015) Proteolytic and ACE-inhibitory activities of probiotic yogurt containing non-viable bacteria as affected by differents levels of fat, inulin and starter culture. *J. Food Sci. Technol.*, 52: 2428-2433. doi: 10.1007/513197-013-1202-9

Sharma, D. & Saharan, B.S. (2014) Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. *Int. J. Microbiol.*, 698713. doi: 10.1155/2014/698713

Sharma, D.; Saharan B.S. & Shailly, K. (2016) Biosurfactants of lactic acid bacteria. Springer Briefs in Microbiology, 86 pp. doi: 10.1007/978-3-319-26215-4

Schelegueda, L.I.; Vallejo, M.; Gliemmo, M.F.; Marguet, E.R. & Campos, C.A. (2015) Synergistic antimicrobial action and potential application for fish preservation of a bacteriocina produced by *Enterococcus mundtii* isolated from Odontesthes platensis. *LWT*, 64: 794-801. Doi: 10.1016/j.lwt.2015.06.017

Schelegueda, L.I.; Zalazar, A.L.; Gliemmo, M.F. & Campos, C.A. (2016) Inhibitory effect and cell damage on bacterial flora of fish caused by chitosan, nisin and sodium lactate. *Int. J. Biolog. Macromol.*, 83: 396–402. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.11.033.

Schillinger, U.; Geisen, R. & Holzapfel, W. (1996) Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 7(5): 158-164.

Schlech, W.F. & Acheson, D. (2000) Foodborne Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.*, 31(3): 770-775. doi: 10.1086/314008

Schleifer, K.H. & Kilpper-Bälz, R. (1984) Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 34(1): 31–34. doi: 10.1099/00207713-34-1-31

Schleifer, K.H. & Kilpper-Bälz, R. (1987) Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci. *Syst. Appl. Microbiol.*, 10:1–19.

Schleifer, K.H.; Kraus, J.; Dvorak, C.; Kilpper-Bälz, R.; Collins, M.D. & Fischer, W. (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6:183–195.

Seo, S-H.; Jung, M. & Kim, W.J. (2014) Antilisterial and amylase-sensitive bacteriocin producing *Enterococcus faecium* SH01 from Mukeunji, a Korean over-ripened Kimchi. *Food Sci Biotechnol.*, 23(4): 1177-1184.

Seseña Prieto, S. (2005) Caracterización tecnológica de cepas autóctonas y selección de cultivos iniciadores para la fermentación de la berenjena de Almagro. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias del Medio Ambiente, Universidadd de Castima-La Mancha, 246 p.

Sharif, M. K.; Javed, K. & Nasir, A. (2018) Foodborne Illness: Threats and Control. Foodborne Diseases, capítulo 15: 501–523. Doi: doi.org/10.1016/b978-0-12-811444-5.00015-4

Sharma, D. & Malik, A. (2012) Incidence and prevalence of antimicrobial resistant Vibrio cholera from dairy farms. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6: 5331-5334.

Sharma, D.; Saharan, B.S.; Chauhan, N.; Bansal, A. & Pocha, S. (2014) Production and structural characterization of *Lactobacillus helveticus* derived biosurfactant. *Sci. World J.*, 2014: 493548. doi: 10.1155/2014/493548.

Sheoran, P. & Tiwari, S.K. (2019) Anti-staphylococcal activity of bacteriocins of food isolates *Enterococcus hirae* LD3 and *Lactobacillus plantarum* LD4 in pasteurized milk. *3 Biotech.*, 9(1): 8.

Shepherd, R.; Rockey, J.; Shutherland, I.W. & Roller, S. (1995) Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *J. Biotechnol.*, 40(3): 207-217. doi: 10.1016/0168-1656(95)00053-s

Sherman, J.M. (1937) The streptococci. *Bacteriol Rev.*, 1: 3–97.

Shlaes, D.M.; Al-Obeid, S.; Shlaes, J.H.; Boisivon, A. & Williamson, R. (1989a) Inducible, transferable resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium* D399. *J Antimicrob Chemother*, 23:503–508.

Shlaes, D.M.; Bouvet, A.; Devine, C.; Shlaes, J.H.; Al-Obeid, S. & Williamson, R. (1989b) Inducible, transferable resistance to vancomycin in *Enterococcus faecalis* A256. *Antimicrob Agents Chemother*, 33: 198–203.

Silva, C.C.G.; Silva, S.P.M. & Ribeiro, S.C. (2018) Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Front. Microbiol.*, 9: 594. doi:10.3389/fmicb.2018.00594

Siró, I.; Kápolna, E.; Kápolna, B. & Lugasi, A. (2008) Functional food. Product development, markenting and consumer acceptance – A review. *J. Appetite*, 51: 456-467.

Slipczuk, L.; Codolosa, J.N.; Davila, C.D.; Romero-Corral, A.; Yun, J.; Pressman, G.S. & Figueredo, V.M. (2013) Infective endocarditis epidemiology over five decades: a systematic review. PLoS One 8:e82665.

Slutsker, L. & Schuchat, A. (1999) Listeriosis in humans. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety ed. Ryser, E.T. and Marth, E.H. pp. 75– 95. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc.

Smaoui, S.; Elleuch L.; Ben Salah R.; Nahaj, S.; Chakchouk-Mtibaa, A.; Sellem, I.; Besbes, S. & Mellouli, L. (2014) Efficient role of BacTN635 on the safety properties, sensory attributes, and texture profile of raw minced meat beef and chicken breast. *Food Addit Contam Part A. Chem. Anal Control Expo Risk Assess.*, 31(2):218-225. doi: 10.1080/19440049.2013.873144

Smithers, G.W. (2015) Whey-ing up the options—Yesterday, today and tomorrow. *Int. Dairy J.*, 48: 2-14.

Soltaní, S.; Hammami, R.; Cotter, P.D.; Rebuffat, S.; Said, L.B.; Gaudreau, H.; Bédard, D.; Biron, E.; Drider, D. & Fliss, I. (2021) Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiol. Rev.*, 45(1): fuaa039. doi: 10.1093/femsre/fuaa039

Sonsa-Ard, N.; Rodtong, S.; Chikindas, M.L. & Yongsawatdigul, J. (2015) Characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CN-25 isolated from traditionally Thai fermented fish roe. *Food Control*, 54: 308- 316. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.02.010

Sosa, F.M. (2019) Re-utilización de residuos agroindustriales para la producción de metabolitos e interés alimentario. Congreso virtual: Desarrollo sustentable y Desafíos ambientales "Pensando alternativas para el abordaje ambiental", Chubut, Argentina.

Souza, E.C.; Oliveira de Souza de Azevedo, P.; Domínguez, J.M.; Converti, A. & Pinheiro de Souza Oliveira, R. (2017) Influence of temperatura and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. CyTA – *J. Food*, 15(4): 525-530. doi: 10.1080/19476337.2017.1306806

Stamm, A.M.; Dismukes, W.E.; Simmons, B.P.; Cobbs, C.G.; Elliott, A.; Budrich, P. & Harmon, J. (1982) Listeriosis in renal transplant recipients: Report of an outbreak and review of 102 cases. *Rev. Infect. Dis.*, 4:665–682.

Steniner, T. (2013) Treating foodborne illness. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 27(3): 555 -76.

Stiles, M.E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70: 331–345.

Sudbrack, T.P.; Archilha, N.L.; Itri, R. & Riske, K.A. (2011) Observing the solubilization of lipid bilayer by detergents with optical microscopy of GUVs. *J. Phys. Chem.*, 115: 269–277.

Švec, P. & Franz, C.M.A.P. (2014) The genus *Enterococcus*, p 175–211. In Holzapfel WH, Wood BJB (ed), Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England.

Švec, P. & Devriese, L.A. (2015)*Enterococcus*, p 1–25. In Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo M, Chun J, DeVos P, Hedlund B, Dedysh S (ed), Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England.

Szczawiński, J.; Stańczak, B. & Pęconek, J. (1998) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in fermented milk products – prediction on the basis of experiments with real food products and Pathogen Modeling Program V. 4.0. Shelf life prediction for improved safety and quality of foods. Copernicus Project CIPA-CT94-0120. Copi-Print Library Building University College Dublin, pp 187-192.

Tadros, T.F. (2016) Emulsions: Formation, Stability, Industrial Applications. Walter de Gruyter GmbH and Co K, 243 pp.

Talon, R. & Leroy, S. (2011) Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Sci.*, 89(3): 303-309. doi: 10.1016/j.meatsci.2011.04.029

Tauxe, R.V. (1997) Emerging foodborne diseases: an envolving public health challenge. *Emerg. Infect. Dis.*, 3: 425-434.

ten Brink, B.; Damink, C.; Joosten, H.M.L.J. & Huis in´t Veld, J.H.J. (1990) Occurrence and formation of biologically amines in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 11: 73-84.

Thiercelin, M.E. (1899) Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. *C R Seances Soc Biol*, 50:269–271.

Todorov, S.D.; Prévost, H.; Lebois, M.; Dousset, X.; LeBlanc, J.G. & Franco, B.D.G.M. (2011) Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (Carica papaya) —From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Res. Int.*, 44: 1351-1363.

Todorov, S.T.; Perin, L.P.; Carneiro, B.M.; Raha, P.; Holzapfel, W. & Nero, L.A. (2017) Safety of *Lactobacillus plantarum* ST8Sh and Its Bacteriocin. *Probiotics & Antimicro. Prot.*, 9,334–344. doi: 10.1007/s12602-017-9260-3

Tran, T. (2011) Stabilization of oil-in-water emulsions via soy protein and soy soluble polysaccharide interactions. Tesis de Maestría. Universidad Ryerson, Toronto, Canadá, 84 pp.

Troxler, R.; von Graevenitz, A.; Funke, G.; Wiedemann, B. & Stock, I. (2000) Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clin. Microbiol. Infect.*, 6:525–535.

Tsakalidou, E.; Zoidou, E.; Pot, B.; Wassill, L.; Ludwig, W.; Devriese, L.A.; Kalantzopoulos, G.; Schleifer, K.H. & Kersters, K. (1998) Identification of streptococci from Greek Kasseri cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 2: 519–527.

Ummadi, M.S. &Curic-Bawden, M. (2010) Use of protein hydrolysates in industrial starter culture fermentations. Pasupuleti, V.K. and Demain, A.L. (Eds.), Protein Hydrolysates in Biotechnology, Springer, Dordrecht, the Netherlands: 91-114.

Unal, G. & Akalin, A.S. (2012) Antioxidant and angiotensinconverting enzyme inhibitory activity of yogurt fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *Dairy Sci. Technol.*, 92: 627-639. doi: 10.1007/s13594-012-0082-5

Ünlü, G.; Nielsen, B. & Ionita, C. (2015) Production of antilisterial bacteriocins from lactic acid bacteria in dairy-based media: A comparative study. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 7:259-274.

Urso, R.; Rantsiou, K.; Cantoni, C.; Comi, G. & Cocolin, L. (2006) Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. *Int. J. Food Microbiol.*, 110: 232-239. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.015

Uzoigwe, C.; Burgess, J.G.; Ennis, C.J. & Rahman, P.K.S.M. (2015) Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front. Microbiol.*, 6: 245.

Van den Berghe, E.; de Winter, T. & de Vuyst, L. (2006) Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterized by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *Int. J. Food Microbiol.*, 107: 159–170. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.027

Vandera, E.; Lianou, A.; Kakouri, A.; Feng, J.; Koukkou, A. -I. & Samelis, J. (2017) Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus faecium* KE82, a multiple enterocin–producing strain, in different milk environments. *J. Food Prot.*, 80: 74–85. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-082

Van Haesendonck, I.P.H.& Vanzeveren, E.C.A. (2004) Rhamnolipids in bakery products. International application patent (PCT).

Van Mierlo, K.; Rohmer, S. & Gerdessen, J. (2017) A model for composing meat replacers: Reducing the environmental impact of our food consumption pattern while retaining its nutritional value. *J. Clean. Prod.*, 165, 930-950.

Varnier, A.L.; Sanchez, L.; Vatsa, P.; Boudesocque, L.; Garcia-Brugger, A.; Rabenoelina, F.; Sorokin, A.; Renault, J.H.; Kauffman, S.; Pugin, A.; Clement, C.; Baillieul, F. & Dorey, S. (2009) Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to Botrytis cinerea in grapevine. *Plant Cell Environ.*, 32(2): 178-193. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01911.x

Vatsa, P.; Sanchez, L.; Clement, C.; Baillieul, F. & Dorey, S. (2010) Rhamnolipid Biosurfactants as new players in animal annd plant defense against microbes. *Int. J. Mol. Sci.*, 11(12): 5095-5108. doi: 10.3390/ijms11125095

Vázquez, A.; Cabo, M.L.; González, M.P. & Murado, M.A. (2004) The role of amino acids in nisin and pediocin production by two lactic acid bacteria. A factorial study. *Enzyme Microbial. Technol.*, 34: 319-325. doi: 10.1016/j.enzmictec.2003.11.005

Vázquez-Vázquez, J.L.; Ortega de la Rosa, N.D.; Huerta-Ochoa, S.; Gimeno, M. & Gutierrez-Rojas, M. (2017) Novel exopolysaccharide produced by *Acinetobacter bouvetti* UAM25: production, characterization and PAHs bioemulsifying capability. *Rev. Mex. Ing. Quím.*, 16(3): 721–733.

Vecino, X.; Devesa Rey, R.; Cruz, J.M. & Moldes, A.B. (2013) Evaluation of Biosurfactant Obtained from *Lactobacillus pentosus* as Foaming Agent in Froth Flotation. *J. Environ. Manage.*, 128: 655-660. doi: 10.1016/j.jenvman.2013.06.011

Vecino, X.; Barbosa-Pereira, L.; Devesa Rey, R.; Cruz, J.M. & Moldes, A.B. (2015) Optimization of Extraction Conditions and Fatty Acid Characterization of *Lactobacillus pentosus* Cell-Bound Biosurfactant/Bioemulsifier. *J. Sci. Food Agric.*, 95: 313-320. doi: 10.1002/jsfa.6720

Vecino Bello, X.; Devesa-Rey, R.; Cruz, J.M. & Moldes, A.B. (2012) Study of the synergistic effects of salinity, pH, and temperature on the surface-active properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus pentosus*. *J. Agric. Food Chem.*, 60: 1258–1265.

Verso, L.L.; Lessard, M.; Talbot, G.; Fernandez, B. & Fliss, I. (2018) Isolation and selection of potential probiotic bacteria from the pig gastrointestinal tract. *Probiot. Antimicrob. Proteins*., 10(2): 299-312.

Vijayabaskar, P. & Somasundaram, S. (2008) Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic activity against common fresh water fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnol.*, 7(1): 124-128.

Way, S.S.; Thompson, L.J.; Lopes, J.E.; Hajjar, A.M.; Kollmann, T.R.; Freitag, N.E. & Wilson, C.B. (2004) Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cell. Microbiol.*, 6:235–242.

Weerathilake, W.A.D.V.; Rasika, D.M.D.; Ruwanmali, J.K.U. & Munasinghe, M.A.D.D. (2014) The evolution, processing, varieties and health benefits of yogurt. *Int. J.Sci. Res. Publ.*, 4: 1-10.

Widyastuti, Y.; Rohmatussolihat & Febrisiantosa, A. (2014) The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food Nutr. Sci.*, 5: 435-442.

Williams, A.M.; Rodrigues, U.M. & Collins, M.D. (1991) Intrageneric relationships of enterococci as determined by reverse transcriptase sequencing of small-subunit rRNA. *Res. Microbiol.*, 142: 67–74.

Wilson, B.G. & Bahna, S.L. (2005) Adverse reactions to food additives. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 95: 499-507. doi: 10.1016/S1081-1206(10)61010-1

Wing, E. W. & Gregory, S.H. (2002)*Listeria monocytogenes*: Clinical and experimental update. *J. Infect. Dis.*, 185:S18–S24.

Wolffs, P. & Radstrom, P. (2006) Real-time PCR for the detection of pathogens in meat. Capítulo 6, Advanced Technologies for Meat Processing. Nollet, L.M.L. y Toldrá, F. (Eds.). Food Science and Technology, New York, Marcel Dekker, pp. 131- 154.

Xavier, A.A.O.; Mercadante, A.Z.; Garrido-Fernández, J. & Pérez-Gálvez, A. (2014). Fat content affects bioaccessibility and efficiency of enzymatic hydrolysis of lutein esters added to milk and yogurt. *Food Res. Int.*, 65: 171–176. doi: 10.1016/j.foodres.2014.06.016.

Yadav, K.K.; Mandal, A.K.; Sen, I.K.; Chakraborti, S.; Islam, S.S. & Chakraborty, R. (2012) Flocculating Property of Extracellular Polymeric Substances Producedby a Biofilm-Forming Bacterium*Acinetobacter junii* BB1A. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 168: 1621-1634.

Yadav, J.S.S.; Yan, S.; Pilli, S.; Kumar, L.; Tyagi, R.D. & Surampalli, R.Y. (2015) Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnol. Adv.*, 33: 756-774.

Yang, R.; Johnson, M.C. & Ray, B. (1992) Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ.Microbiol.*, 58: 3355-3359.

Zacharof, M. & Lovitt, R. (2012) Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*, 2: 50-56.

Zdolec, N.; Bogdanović, T.; Pažin, V.; Šimunić-Mežnarić, V.; Martinec, N. & Lorenzo, J.M. (2020) Control of biogenic amines in dry sausages inoculated with dairy-originated bacteriocinogenic *Enterococcus faecalis* EF101. *Veterinarski arhiv*, 90(1): 77-85. doi: 10.24099/vet.arhiv.0459.

Zendo, T.; Eungruttanagorn, N.; Fujioka, S.; Tshiro, Y.; Namura, K. & Sera, Y. (2005) Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J. Appl. Microbiol.*, 99: 1181-1190. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02704.x

Zhong, Z.; Zhang, W.; Song, Y.; Liu, W.; Xu, H.; Xi, X.; Menghe, B.; Zhang, H. & Sun, Z. (2017) Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiol. Res.*, 196: 95–105.

Žugić Perović, T.D.; Grujović, M.Ž.; Mladenović, S.D. & Čomić, L.R. (2020) Assessment of safety aspect and probiotic potential of autochthonous *Enterococcus faecium* strains isolated from spontaneous fermented sausage. *Biotechnol. Lett.*, 42(8): 1513-1525. doi: 10.1007/s10592-020-02874-5

Zuniga-Estrada, A.; Lopez-Merino, A. & Mota de la Garza, L. (1995) Behavior of *Listeria monocytogenes* in milk fermented with a yogurt starter culture. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 37:257–265.

Anexo

Origen y actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* Scott A de las cepas pertenecientes al cepario de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia (Trelew, Chubut, Argentina)

Denominación	Origen	Género y especie	Actividad antilisteria (SLC)
Tw34	Intestino pejerrey, Santa Isabel	*Lactococcus lactis*	14 mm
Tw47	Vieira tehuelche	*Enterococcus faecium*	15 mm
Tw48	Navaja	*Lactobacillus* sp.	10 mm
Tw49	Mejillón	*Enterococcus* sp.	Negativo
Tw56	Merluza, Puerto Rawson	*Enterococcus mundtii*	27 mm
Tw68	Navaja	*Lactobacillus* sp.	10 mm
Tw69	Navaja	*Lactobacillus* sp.	12 mm
Tw75	Mejillón	*Enterococcus faecalis*	11 mm
Tw77	Mejillón	*Enterococcus faecalis*	10 mm
Tw78	Mejillón	*Enterococcus faecalis*	12 mm
Tw87	Navaja	*Enterococcus columbae*	10 mm
Tw99	Sedimento marino	*Enterococcus durans*	13 mm
Tw221	Merluza, Puerto Rawson	*Enterococcus durans*	Negativo
Tw222	Trucha arco-iris, Isla Pavón	*Enterococcus mundtii*	26 mm
Tw223	Merluza, Puerto Rawson	*Lactobacillus pentosus*	Negativo
Tw224	Pejerrey, Santa Isabel	*Pediococcus pentosaceus*	14 mm
Tw225	Palometa, Puerto Rawson	*Pediococcus pentosaceus*	Negativo
Tw226	Trucha arco-iris, Isla Pavón	*Lactobacillus pentosus*	Negativo
Tw227	Trucha arco-iris, Isla Pavón	*Lactobacillus pentosus*	Negativo
Tw228	Trucha arco-iris, Isla Pavón	*Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides*	Negativo
Tw229	Mero, Puerto Rawson	*Weisella viridescens*	Negativo
Tw230	Pejerrey, Santa Isabel	*Weisella viridescens*	Negativo
Tw231	Merluza, Puerto Rawson	*Enterococcus hirae*	Negativo
Tw232	Mero, Puerto Rawson	*Enterococcus hirae*	Negativo
Tw233	Pejerrey, Santa Isabel	*Weisella viridescens*	Negativo
Tw234	Palometa, Puerto Rawson	*Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides*	11 mm
Tw235	Trucha arco-iris, Isla Pavón	*Weisella viridescens*	Negativo
Tw236	Pejerrey, Santa Isabel	*Weisella viridescens*	Negativo
Tw237	Pejerrey, Santa Isabel	*Weisella viridescens*	Negativo
Tw238	Gatuso, Puerto Rawson	*Lactococcus citreum*	9 mm
Tw278	Pepino de mar, Playa Unión, Rawson	*Enterococcus mundtii*	22 mm
Tw397	Navaja	*Enterococcus faecium*	13 mm
Tw452	Mejillón, Comodoro Rivadavia	*Enterococcus faecium*	21 mm
Tw453	Mejillón	*Enterococcus faecium*	10 mm
Tw456	Mejillón	*Enterococcus faecium*	18 mm
Tw459	Mejillón, Rada Tilly	*Enterococcus faecium*	22 mm
Tw463	Mejillón, Comodoro Rivadavia	*Enterococcus durans*	20 mm
Tw465	Mejillón, Comodoro	*Enterococcus faecium*	21 mm

	Rivadavia		
Tw468	Mejillón, Comodoro Rivadavia	*Enterococcus faecium*	20 mm
Tw471	Mejillón, Rada Tilly	*Enterococcus faecium*	22 mm
Tw478	Mejillón, Rada Tilly	*Enterococcus faecium*	21 mm
Tw479	Mejillón, Rada Tilly	*Enterococcus faecium*	14 mm
Tw492	Calandria, Playa Unión, Rawson	*Enterococcus mundtii*	21 mm
Tw535	Caracol marino, Puerto Madryn	*Enterococcus faecium*	15 mm
Tw802	Caracol marino, Puerto Madryn	*Enterococcus mundtii*	24 mm
Tw807	Caracol marino, Puerto Madryn	*Enterococcus mundtii*	21 mm
5p	Mejillón	*Pediococcus* sp.	Negativo
11p	Mejillón	*Enterococcus* sp.	Negativo
22 p	Mejillón	*Lactobacillus* sp.	Negativo
33p	Branquia, tiburón azul	*Lactobacillus* sp.	Negativo
34p	Branquia, tiburón azul	*Enterococcus* sp.	Negativo
35p	Branquia, tiburón azul	*Enterococcus* sp.	Negativo
36p	Branquia, tiburón azul	*Enterococcus* sp.	Negativo
51p	Mejillón	*Enterococcus* sp.	Negativo
69p	Navaja	*Lactobacillus* sp.	14 mm
85p	Intestino, tiburón azul	*Lactobacillus* sp.	Negativo
87p	Navaja	*Enterococcus* sp.	14 mm
93p	Almeja	*Lactobacillus* sp.	Negativo
124p	Pepino de mar	*Lactobacillus* sp.	Negativo
125p	Estrella	*Lactobacillus* sp.	Negativo