

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL



**OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA
ENTEROCINA AS-48 Y ENSAYO DE SU
EFICACIA COMO BIOCONSERVANTE EN ALIMENTOS**

ARANTXA MUÑOZ PÉREZ DEL PULGAR

Granada 2006

**OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA
ENTEROCINA AS-48 Y ENSAYO DE SU
EFICACIA COMO BIOCONSERVANTE EN ALIMENTOS**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Ciencias

La doctoranda

Arantxa Muñoz Pérez del Pulgar

Las Directoras del trabajo

Eva Valdivia Martínez
Catedrática de Microbiología

Mercedes Maqueda Abreu
Catedrática de Microbiología

Granada
2006

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada durante los años 2001-2006 dentro del Grupo de Investigación “Estudio de sustancias antagonistas producidas por microorganismos”.

La doctoranda ha disfrutado de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia durante los años 2001-2005

Igualmente ha sido beneficiaria de dos ayudas del Ministerio de Educación y Ciencia para la realización de estancias breves en España y el extranjero:

- En el Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), durante 2001- 2002, bajo la dirección de la Dra. Ana Rodríguez.
- En University College of Cork (UCC) y Dairy Research Centre (Fermoy, Cork), Irlanda, durante 2003, bajo la dirección de los Dres. Colin Hill y Paul Ross.

La investigación ha sido financiada a través del proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología AGL2001-3315-C02-01. 2001-04 y por el Plan Andaluz de Investigación (CVI 160).

De la presente Tesis Doctoral se han extraído las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones:

- Muñoz, A., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Valdivia, E. 2004. Control of psychrotrophic enterotoxigenic *B. cereus* in manchego type cheese by an enterococcal strain producing enterocin AS-48. *J. Food Prot.* **67 (7)**: 1517 – 1521.
- Muñoz, A., Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Maqueda, M., Valdivia, E. 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced *in situ* and *ex situ*: bactericidal synergism through heat and AS-48. *Int. Dairy J.* Enviado para su publicación.

Congresos:

- Control of psychrotrophic enterotoxigenic *B. cereus* in manchego-type cheese by an enterococcal strain producing enterocin AS-48. 7th Symposium on Lactic Acid Bacteria. Genetics, Metabolism and Applications. Egmond aan Zee, the Netherlands, 1-5 Septiembre de 2002.
- Production of enterocin AS-48 from lactalbumin as a growth substrate. Fourth European Congress of Chemical Engineering, Granada, 21-25 de Septiembre de 2003.
- Biocontrol of *Staphylococcus aureus* CECT 976 in a fresh type non-fat cheese by enterococcal strains producing enterocin AS-48. Póster. FOOD SAFETY UNDER EXTREME CONDITIONS... Jaén, 6-8 de Septiembre de 2004.
- Biocontrol of *Listeria monocytogenes* 4032 in a hard type non-fat cheese by enterococcal strains producing enterocin AS-48". Póster. XIV CONGRESO DE

MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS. Gerona, 18-22 de Septiembre de 2004.

- Inhibition of *Listeria monocytogenes* CECT 4032 by an enterocin AS-48 -enriched whey powder. Póster. 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Genetics, Metabolism and Applications. Egmond aan Zee, the netherlands, 28 Agosto a 1 Septiembre de 2005.

ÍNDICE

SUMMARY

INTRODUCCIÓN	1
1.- La conservación de los alimentos	3
1.1. Perspectiva histórica	3
1.2. Microorganismos patógenos o alterantes de los alimentos	6
1.2.1. Objetivos de la conservación de alimentos	6
1.2.2. Microorganismos alterantes	7
1.2.2.1. Alimentos formados por músculo	7
1.2.2.2. La leche y derivados lácteos	9
1.2.2.3. Frutos, verduras y granos	13
1.2.3. Microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos	15
1.3. Métodos de conservación de los alimentos	25
1.3.1. Métodos físicos de conservación de alimentos	25
1.3.1.1. Procesos físicos de deshidratación	26
1.3.1.2. Almacenamiento en frío	26
1.3.1.3. Congelación y almacenamiento a temperaturas de congelación	27
1.3.1.4. Tratamientos térmicos	27
1.3.1.5. Irradiación	30
1.3.1.6. Nuevos tratamientos físicos no térmicos	31
1.3.2. Conservantes químicos	33
1.3.2.1. Conservantes químicos o tradicionales	33
1.3.2.2. Conservantes químicos naturales	36
1.3.3. Bioconservación	36

1.3.4. La tecnología de las barreras en la conservación de alimentos	37
1.3.4.1. El concepto de efecto barrera y la tecnología de las barreras	37
1.3.4.2. Potenciales barreras en la conservación de alimentos	39
1.4. Microbiología predictiva	40
1.4.1. Concepto y objetivo de la microbiología predictiva	40
1.4.2. Aplicaciones de la microbiología predictiva	41
1.5. Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control	42
1.5.1. Concepto de Sistema de análisis de riesgos y de puntos de control críticos (HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Point System)	42
1.5.2. Principios del HACCP	42
2. La conservación biológica de los alimentos	44
2.1. Cultivos iniciadores y protectores	45
2.1.1 Cultivos iniciadores	45
2.1.2. Cultivos protectores	46
2.2. Las Bacterias del Ácido Láctico	47
2.3. Bacteriocinas de las BAL	48
2.3.1. Clasificación de bacteriocinas de las BAL	50
2.3.2. Aplicación de las bacteriocinas de las BAL en alimentos	53
2.3.2.1. Requisitos generales y aspectos reglamentarios del uso de una bacteriocina como bioconservante	54
2.3.2.2. Factores que limitan la eficacia de las bacteriocinas en los alimentos	55
2.3.2.3. Producción industrial de bacteriocinas	56
2.3.2.4. Bacteriocinas de las BAL ensayadas para mejorar la seguridad alimentaria	58
2.3.2.5. Las bacteriocinas en la tecnología de las barreras	62

3. La enterocina AS-48	62
3.1. Características bioquímicas de AS-48	63
3.2. Actividad biológica y mecanismo de acción de AS-48	67
3.3. Determinantes genéticos de AS-48: resistencia y producción	69
OBJETIVOS	73
MATERIAL Y MÉTODOS	77
1. Microorganismos	79
1.1. Cepas bacterianas empleadas	79
1.2. Conservación de las bacterias	79
2. Medios de cultivo	80
2.1. Medios generales de crecimiento	80
2.2. Medios selectivos de crecimiento	85
2.3. Medios empleados para ensayos de actividad antibacteriana	91
3. Tampones y soluciones	93
4. Métodos empleados en la detección y titulación de la actividad de bacteriocina	94
5. Métodos de extracción de la bacteriocina	96
5.1. Extracción a partir de cultivos en medios definidos convencionales	96
5.2. Extracción ácida a partir de leche y queso	96
5.3. Extracción a partir de masas cárnicas tipo salchicha y hamburguesa	97
5.4. Extracción a partir de jamón cocido loncheado	97
6. Optimización de la producción y de la recuperación de AS-48 a partir de sustratos lácteos	97

6. 1. Optimización de la producción por mutagénesis	98
6.1.1. Mediante mutación espontánea	98
6.1.2. Tratamiento con naranja de acridina	98
6.1.3. Tratamiento con bromuro de etidio	99
6.1.4. Tratamiento con altas temperaturas	99
6.1.5. Tratamiento con luz ultravioleta	99
6.2. Optimización de la producción de bacteriocina a partir de sustratos lácteos	100
6.3. Recuperación de AS-48 a partir de cultivos en sustratos lácteos	100
6.3.1 Mediante cromatografía	100
6.3.2. Mediante filtración tangencial	103
6.3.3 Secado por electrospray	104
7. Estudio del efecto de AS-48 en leche y quesos para controlar el desarrollo de cepas patógenas	106
7.1. Efecto de la adición de AS-48 producido <i>ex situ</i>	106
7.1.1. Efecto del liofilizado activo obtenido mediante atomización/desecación a vacío	106
7.1.2. Efecto de la combinación de AS-48 y ésteres de sacarosa sobre el desarrollo de diversas cepas patógenas transportadas por alimentos lácteos	106
7.2. Efecto de AS-48 producido <i>in situ</i> en leche: biocontrol	107
7.2.1. Cocultivo en leche de cepas productoras de AS-48 con <i>B. cereus</i> LWL1	107
7.2.2. Cocultivo en leche de cepas productoras de AS-48 con <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4032	108
7.2.3. Cocultivo en leche de cepas productoras de AS-48 con <i>Staphylococcus aureus</i> CECT 976	109

7.3. Efecto del empleo de cepas productoras de AS-48 como cultivos adjuntos en la fabricación de quesos sobre el control de bacterias patógenas	109
7.3.1. Fabricación del queso	109
7.3.2. Biocontrol de <i>B. cereus</i> LWL1 en un queso desnatado de pasta dura por una cepa productora de AS-48	111
7.3.3. Biocontrol de <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4032 en un queso desnatado de pasta dura por cepas productoras de AS-48	112
7.3.4. Biocontrol de <i>Staphylococcus aureus</i> CECT 976 en un queso fresco desnatado por cepas productoras de AS-48	113
7.4. Determinaciones físico-químicas	114
8. Estudio del efecto de AS-48 en masas cárnicas	120
8.1. Efecto de la adición de AS-48 a masas cárnicas tipo salchicha y hamburguesa	120
8.2. Efecto inhibitorio de AS-48 sobre <i>Brochothrix thermosphacta</i>	122
8.2.1. En medios de cultivo de laboratorio. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) para <i>Br. thermosphacta</i>	122
8.2.2. En alimentos cárnicos	123
9. Análisis estadístico	124
RESULTADOS CAPÍTULO I.	125
I. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA RECUPERACIÓN DE AS-48 A PARTIR DE SUSTRATOS LÁCTEOS	127
1. Optimización de la producción en sustratos lácteos (lactosueros y lactalbúmina)	127
1.1. Producción de AS-48 en lactosuero crudo	127

1.1.1. Efecto de la temperatura	129
1.1.2. Efecto de la adición de glucosa	130
1.1.3. Efecto de la adición de peptonas	131
1.1.4. Efecto del pH	132
1.1.5. Efecto de la oxigenación	132
1.2. Producción en distintos tipos de subproductos del lactosuero	133
1.3. Optimización de la producción en lactalbúmina (LA)	134
1.3.1. Efecto de la glucosa y del inóculo	134
1.3.2. Efecto del pH	136
1.3.3. Efecto de la concentración de glucosa sobre cultivos en LA con pH estabilizado	137
1.3.4. Efecto de la adición de peptona	138
1.3.5. Efecto de la concentración de LA	139
2. Optimización de la recuperación de AS-48 a partir de los cultivos en lactalbúmina	141
2.1. Recuperación de AS-48 mediante intercambio catiónico sobre CM25	141
2.1.1. Cromatografía líquida de alta resolución	142
2.1.2. Recuperación de AS-48 mediante filtración tagencial	146
2.2. Secado por atomización bajo vacío	149
2.2.1. Obtención del preparado activo: secado mediante electrospray	149
2.2.2. Estabilidad del preparado activo durante su conservación en frío	152
2.2.3. Efecto del preparado activo sobre cultivos de <i>L. monocytogenes</i> en BHI	153
3. Mutagénesis	155
DISCUSIÓN CAPÍTULO I	159

Optimización de la producción de bacteriocina en subproductos lácteos	162
Recuperación de AS-48 a partir de los cultivos	169
RESULTADOS CAPÍTULO II	175
II. EFECTO DE LA ADICIÓN DE AS-48 SOBRE EL CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS LÁCTEOS	177
1. Efecto de AS-48 producido <i>in situ</i> en leche y quesos	177
1.1. Efecto sobre <i>Bacillus cereus</i>	177
1.2. Efecto sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	186
1.3. Efecto sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	194
2. Efecto de AS-48 en leche producido <i>ex situ</i>	202
2.1. Efecto sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	202
2.2. Efecto sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	204
2.3. Efecto sobre <i>Salmonella choleraesuis</i>	207
DISCUSIÓN CAPÍTULO II	209
Biocontrol de <i>Bacillus cereus</i> por AS-48 en productos lácteos	211
Biocontrol de <i>Listeria monocytogenes</i> por AS-48 en productos lácteos	214
Biocontrol de <i>Staphylococcus aureus</i> por AS-48 en productos lácteos	217
Potenciación de la actividad de AS-48 por tratamientos combinados con ésteres de sacarosa	221
RESULTADOS CAPÍTULO III	223

III. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE AS-48 PRODUCIDO	225
<i>ex situ</i> A MASAS CÁRNICAS	
1. Efecto de la adición de AS-48 a carnes de porcino tipo hamburguesa y salchicha	225
1.1. En carne tipo hamburguesa	225
1.2. En carne tipo salchicha	227
2. Efecto de la adición de AS-48 sobre <i>Brochothrix thermosphacta</i> en carnes	229
2.1. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de AS-48 sobre <i>Br. thermosphacta</i> en BHI	229
2.2. Efecto de la adición de AS-48 sobre carne de ternera	230
2.3. Efecto de la adición de AS-48 sobre jamón cocido	231
2.3.1. Efecto de AS-48 en jamón cocido	231
2.3.2. Efecto combinado de AS-48 y TPF en jamón cocido	234
DISCUSIÓN CAPÍTULO III	235
Efecto de la adición de AS-48 en masas cárnicas tipo salchicha y hamburguesa	237
Efecto de la adición de AS-48 sobre <i>Brochothrix thermosphacta</i> en carnes	238
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	241
BIBLIOGRAFÍA	247

SUMMARY

The project of this PhD thesis addresses the OPTIMISATION OF ENTEROCIN AS-48 PRODUCTION, AND ASSAY OF ITS EFFICACY AS A BIOPRESERVATIVE IN FOODS. Enterocin AS-48 is a peculiar molecule in several aspects: it is a ribosomally-synthesized cyclic peptide, stable to heat and high salt concentration, biologically active over a wide pH interval, and showing a broad antimicrobial spectrum against most Gram positive bacteria and also some Gram negatives. Its mode of action involves permeation of the cytoplasmic membrane of sensitive bacteria. A large number of food borne pathogens are included among the sensitive targets (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*). The bactericidal activity of AS-48 is potentiated by physical and chemical treatments, which may turn sensitive even those Gram negative strains with innate resistance, such as *Salmonella choleraesuis* and *Escherichia coli*. Enterocin AS-48 can be applied for food preservation either as a preparation of bacteriocin produced *ex situ* by cultivation of the producer strain in a suitable medium, or by inoculation of food with a bacteriocinogenic strain (*in situ* production).

Application of *ex situ* produced AS-48 requires a simple and cheap procedure to obtain large amounts of cell-free bacteriocin after cultivation in a food-grade substrate. In the present study, production of AS-48 has been tested on by-products of the dairy industry, such as whey and its derivatives, and the optimal conditions for production have been established:

- Utilisation of a culture medium composed of 5% lactalbumin and 1% glucose
- Stabilisation of pH during cultivation (6.55-6.65) by controlled addition of NaOH
- Using an 8% inoculum of the producer strain
- Incubation of cultures at 28 °C

Under these conditions, highest bacteriocin titres of 160-320 AU/ml are reached after 18-24 h incubation. Bacteriocin titres also remain fairly stable at least for 24 h, providing a broader and valuable interval of time for sample processing and activity recovery.

Bacteriocin recovery from cultured broths has been achieved with a high yield by bulk cation exchange chromatography on carboxymethyl sephadex CM25. The remaining viable cells have been inactivated by heat (90 °C, 5 min) or removed by filtration through low

protein binding polyethersulfone filters (0.22 µm pore size), and tangential ultrafiltration has been applied to concentrate the active preparations. Spray drying has also been used in order to obtain active dry powder preparations, although the producer cells could not be completely eliminated by this procedure.

Biocontrol assays of food borne pathogens carried out in skimmed milk and in cheese made from skimmed milk with the bacteriocinogenic strains *Enterococcus faecalis* A-48-32 and *E. faecium* UJA32-81 have shown that both strains proliferate optimally in the food substrate and produce enough bacteriocin amounts in milk to completely suppress *B. cereus* and *L. monocytogenes* and also to reduce significantly the population of *S. aureus*. Enterotoxin production by *B. cereus* is also reduced four fold by AS-48. In cheese, although enterocin AS-48 has a lower effect probably due to the greater complexity of the food matrix, it also causes a significant population reduction for the three bacteria tested. The bacteriocinogenic strains did not have any adverse effects on growth of the starter cultures normally used for cheese manufacture, and treated cheeses showed very similar physicochemical characteristics as control cheeses, with only minor significant differences.

The synergistic effect of AS-48 and sucrose fatty esters (palmitate and stearate) has been tested against *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *S. choleraesuis* inoculated in skimmed milk. Enterocin activity against listeria was potentiated greatly and, to a lesser extent, also against staphylococci.

Enterocin AS-48 has also been tested against spoilage bacteria in meat products. The meat and fish spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta* is highly sensitive to AS-48 (minimal bactericidal concentration, 1.75-0.2 µg/ml) in defined media (brain heart infusion broth and phosphate buffer). In raw beef fillets and slices of cooked ham sprayed with AS-48 (up to 40 µg/ml) the bacteriocin treatment had a much more limited effect, and did not eliminate the inoculated bacterium for any of the tested concentrations. Incorporation of AS-48 in hamburger and sausage-type meat mixtures reduced the population of mesophilic bacteria by one log compared to controls without AS-48.

All these results open promising perspectives for the application of enterocin AS-48 in food preservation. Further studies are required, however, in order to reduce the effective bacteriocin concentration in food and to extend its inhibitory spectrum to Gram negative

bacteria. The elaboration of cell-free, dry and stable bacteriocin preparations described in a preliminar way in this project should also be addressed with greater depth in a future.

INTRODUCCIÓN

1.- La conservación de los alimentos

1.1. Perspectiva histórica

Desde el establecimiento de las primeras comunidades prehistóricas, los humanos han aprovechado, inconscientemente en un principio, conscientemente después, las actividades que, sobre los alimentos, desarrollan los distintos microorganismos. Ha sido en el siglo XX cuando la consciencia de la importancia de estas actividades, tanto en el desarrollo y conservación de alimentos, como en el deterioro y la infección de los mismos, ha dado lugar al desarrollo de una ciencia, tan actual como antigua, que es la Microbiología de Alimentos. Ciencia que, por tanto, debemos entender surge y se desarrolla paralelamente al desarrollo de las sociedades humanas. Así, la conservación biotecnológica de los alimentos tal y como la conocemos hoy, se ha originado a partir de la comprensión científica del proceso de fermentación de los alimentos, una de las más antiguas técnicas de conservación practicada durante los 12000 años de historia cultural humana. Durante este extenso periodo el ser humano ha logrado, mediante la táctica de ensayo-error, obtener métodos que le han permitido mediante procedimientos naturales evitar una alteración no deseada de los diferentes alimentos (Holzapfel *et al.*, 1995).

Existen estudios que tratan de determinar con precisión el momento en el que se puede considerar que comienza la producción y manipulación de los alimentos. Mediante pruebas basadas en la secuenciación de los ácidos nucleicos que indican la existencia de distintos animales domésticos, se ha podido saber que la práctica de la agricultura animal se originó hace 8000-10000 años, durante el periodo Neolítico (Pringle, 1998). La expansión de las prácticas agrícolas de una población a otra hizo más asequible el abastecimiento de la comida y favoreció el desarrollo de las comunidades humanas. La producción de pan, bebidas alcohólicas, alimentos fermentados, la conservación de carnes y pescados por salado o desecado fue crítica en el desarrollo de sociedades humanas estables.

Con el tiempo se empezó a comprender que los alimentos se debían mantener protegidos del ambiente y algunos se cubrían en superficie con sal, miel o aceite; de hecho, y según numerosos historiadores, la disponibilidad de sal, reconocida como nutriente e importante conservante de alimentos, ha influido en el curso de la Historia

ya que se cree que la sal del Mar Muerto fue uno de los motivos del interés del pueblo romano por Palestina.

La alteración e intoxicación de los alimentos causados por los microorganismos han sido problemas que ya preocupaban a las primeras comunidades humanas. Durante miles de años, las distintas sociedades han reconocido que existen enfermedades que pueden ser extendidas mediante los alimentos y así la prohibición en las distintas religiones de ingerir algunos de ellos tiene un origen médico/higiénico. Antecedentes del tema se encuentran en el Código Babilonio de Hammurabi, 1700 a.C. en el que se hace referencia expresa a los fraudes en alimentos; pero podría decirse que las primeras normas las dictó Moisés 400 años después, en “permisiones y prohibiciones de origen higiénico sobre animales”. (Dt 14, 3-21).

Durante el periodo clásico (Grecia y Roma) ya existían numerosas técnicas y métodos de conservación de alimentos, como lo demuestran los libros sobre agricultura escritos por Cato, Varro o Columella, por no mencionar la Historia Natural de Plinio (Cowell, 1999) en los que ya se explicaba el proceso de obtención del vino así como técnicas de ahumado, salado y recubrimiento de productos vegetales con miel.

Las intoxicaciones por semillas alteradas eran ya conocidas por griegos y romanos y numerosas epidemias acontecidas en la Edad Media tenían también su origen en alimentos alterados. Sin embargo, no fue hasta el siglo X d.C. cuando la intoxicación microbiológica del alimento fue reconocida en la ley civil, si bien se desconocía el origen de estas intoxicaciones. En la Edad Media, numerosos países europeos castigaban severa y hasta brutalmente a los adulteradores de los alimentos de primera necesidad. En el Siglo XI, el Fuero Real de Castilla, prohibía agregar sal, agua y otras sustancias a los vinos (Nader y Vitale, 1998).

Debido a las dificultades de transporte y almacenamiento de las provisiones durante la guerra, en 1795 el gobierno francés decidió otorgar un cuantioso premio a quien hallara algún método de conservación, que fue ganado por Nicholas Appert, pastelero que introdujo la utilización del baño María, siendo de este modo como se comenzó a utilizar el calor en el procesamiento de los alimentos. Durante el siglo XIX se fueron estableciendo los parámetros de temperatura y tiempo de cocción necesarios para los alimentos y se fue avanzando en el descubrimiento de las distintas causas de intoxicación alimentaria.

Entre 1854 y 1864 Louis Pasteur dotó de base científica a los métodos térmicos de protección y demostró experimentalmente que determinadas bacterias estaban asociadas

al deterioro de la comida y que eran causantes de enfermedades específicas. Podemos, por lo tanto, reconocer a Pasteur como el padre de la Microbiología de los Alimentos y se puede situar el nacimiento de esta ciencia en la 2ª mitad del siglo XIX. Durante este siglo y en el siglo XX esta ciencia ha ido evolucionando gracias a nombres como Koch o Ermengem, entre otros.

Desde que en 1824 Dewees recomendara hervir la leche para incrementar su vida media, hasta el Acta Federal de Alimentos y Medicamentos aprobada en el congreso de EE.UU (1906) pasaron casi 100 años en los que se fueron estableciendo normas legales para el control sanitario de los alimentos. Normas que se han ido ampliando y estandarizando en algunos casos. En la actualidad existe una reglamentación sobre seguridad alimentaria más o menos precisa en cada país desarrollado. En la Unión Europea (UE) se elaboraron inicialmente los denominados Libro Verde de la Comisión sobre Legislación Alimentaria y Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria, donde se recogieron las reglamentaciones alimentarias de la comunidad en lo que se refiere a transacciones comerciales y normas higiénico-sanitarias. Más recientemente (regulación EC nº 178/2002 del Parlamento Europeo) se ha aprobado la ley popularmente conocida como Ley General de los Alimentos, que proporciona un marco general para las leyes en materia de alimentos a nivel nacional y de la UE y pretende cumplir tres objetivos (Van der Meulen y Van der Velde, 2006):

1. Servir de base para una moderna legislación en materia de alimentos en la UE y en los Estados Miembros.
2. Establecer la Autoridad Europea en materia de Seguridad Alimentaria.
3. Establecer procedimientos para responder ante crisis de seguridad alimentaria, incluido el Sistema de Alerta Rápida.

Cada país en concreto posee su *Codex Alimentarius*, que surgió de un congreso sobre higiene que tuvo lugar en Viena en 1891 (Nader y Vitale, 1998); en el caso de España, este código alcanza ya su sexta edición.

Una vez establecidos y formulados los estándares y reglamentaciones, se han ido desarrollando ensayos de detección y muestreo específicos para cada tipo de microorganismo; métodos cada vez más rápidos y fiables que permiten establecer los límites de seguridad en los cuales se inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos o alterantes. En este siglo, se están implementando métodos cada vez más específicos, basados en técnicas de Biología o Genética Molecular, en las que destacan los

denominados biosensores que permiten conocer, en el propio alimento, el estado del mismo (Frank, 1997).

No obstante, y a pesar de todos los avances tecnológicos para la conservación de alimentos logrados a lo largo de la historia de la humanidad, aunque los consumidores demandan cada vez alimentos mas seguros, prefieren que a la vez estén mínimamente procesados por lo que, aunque pueda resultar paradójico, se está retornando a una conservación de los alimentos mas natural aunque aplicando los conocimientos adquiridos con el paso del tiempo de una manera inteligente. Estamos pues en un momento en el que se valora el aprovechamiento de las propias actividades de los microorganismos en la conservación de los alimentos, esto es **la conservación biológica de los alimentos**.

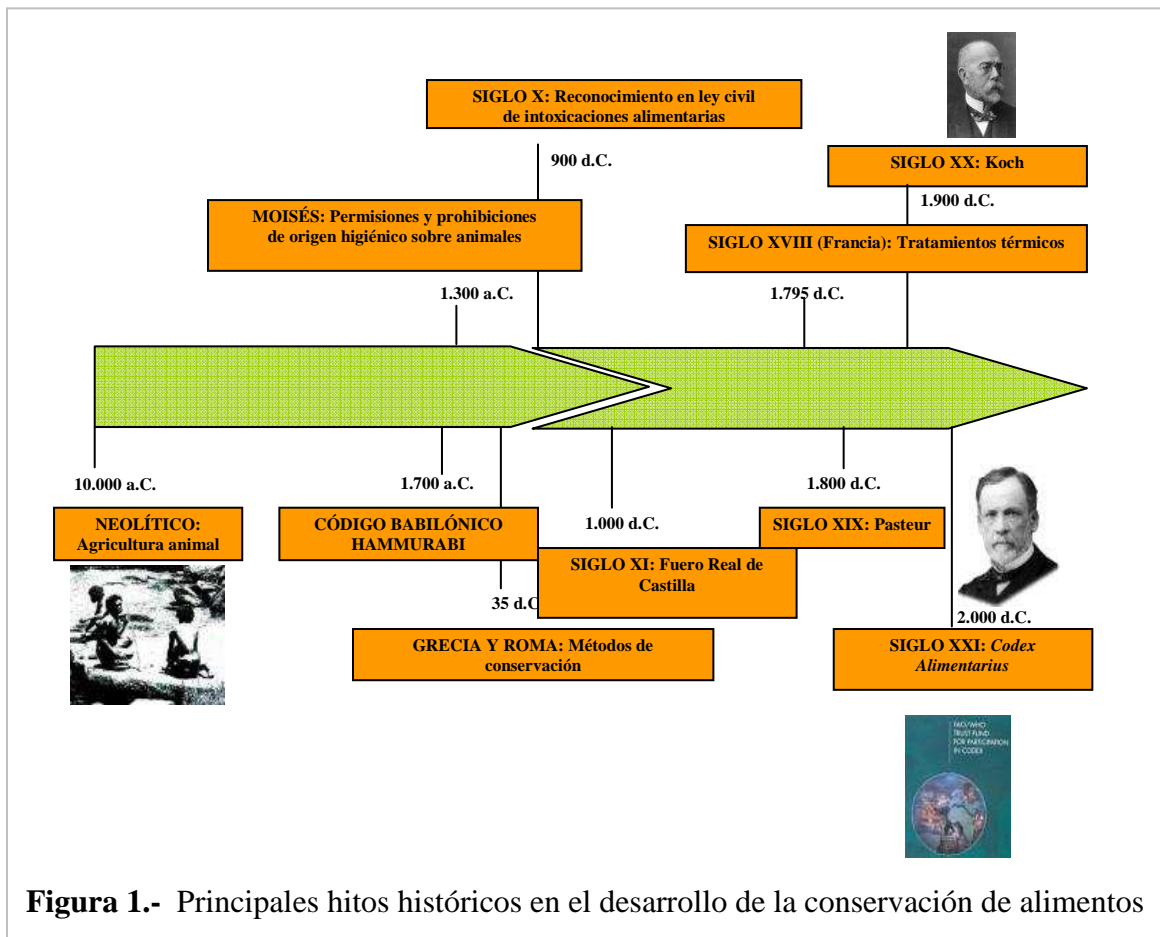


Figura 1.- Principales hitos históricos en el desarrollo de la conservación de alimentos

1.2. Microorganismos patógenos o alterantes de los alimentos

1.2.1. Objetivos de la conservación de alimentos

La conservación de los alimentos pretende, mediante la aplicación de un conjunto de procedimientos y técnicas, impedir o minimizar el crecimiento y la actividad de los microorganismos y, así alargar la vida media y proporcionar unos niveles aceptables de seguridad higiénica a los mismos (Encyclopedia of Food Science, 2002).

Para determinar el tipo de tratamiento que se ha de aplicar a un alimento con el fin de aumentar su vida media y su seguridad, es preciso conocer cuales son los microorganismos que pueden colonizarlo. Otra cuestión de gran importancia a este respecto es la procedencia de tales microorganismos. Es, además, necesario hacer una distinción entre los microorganismos que alteran los alimentos y aquellos que los envenenan.

1.2.2. Microorganismos alterantes

Microorganismos alterantes son aquellos que, al crecer sobre los alimentos, degradan sus componentes de forma que cambian sus propiedades organolépticas, de sabor, olor, aroma, textura o color, haciéndolos inaceptables para su consumo. El resultado final es la reducción de la vida media del alimento, con las consiguientes pérdidas económicas. En realidad la percepción de que un alimento está alterado es una cuestión subjetiva, en la que influyen factores culturales y económicos, así como la agudeza sensorial del consumidor y la intensidad del defecto.

Los microorganismos alterantes de cada alimento en particular son, en general, los que constituyen su propia y característica microbiota. Ésta puede variar en cada fase del proceso de producción y/o almacenamiento siendo, finalmente, el resultado de la interacción de los microorganismos existentes en el alimento crudo y de los procesos de producción, conservación y almacenamiento del mismo. El potencial alterante de un microorganismo, reside en su capacidad para producir los metabolitos que están asociados con la alteración de un producto concreto (Gram *et al.*, 2002). A continuación veremos los principales microorganismos alterantes según el tipo de alimentos que afectan.

1.2.2.1. Alimentos formados por músculo

Son las carnes rojas (vacuno, bovino y otras), de aves y los alimentos de origen marino (pescados, mariscos); se alteran con pérdida de color, aparición de malos olores

o de material viscoso que los recubre en superficie. El tipo de defecto dependerá del tipo de microbiota, de la clase de músculo, de la composición del producto y del ambiente en el que se almacena.

Las carnes rojas y blancas son excelentes medios para el crecimiento de los microorganismos. Aunque en esencia están libres de microorganismos, se contaminan fácilmente a partir de la piel y el pelo o las plumas y del tracto gastrointestinal. La contaminación ocurre, bien de forma directa al desollar y eviscerar los animales o, indirectamente, a través de los aerosoles generados en el desuello, de las manos de los operadores, de los utensilios o de las superficies de trabajo, que proporcionan magníficas oportunidades para la contaminación cruzada entre los animales (Jackson *et al.*, 2001).

La alteración de las carnes rojas puede ocurrir tanto a temperatura ambiente como bajo condiciones de refrigeración, por acción de microorganismos mesófilos y psicrotrofos y es, normalmente, un fenómeno de superficie, aunque se puede producir una alteración en profundidad cuando las prácticas son poco higiénicas o se trata de productos cárnicos curados y/o fermentados. La alteración a temperatura ambiente es resultado de la actuación de bacterias tales como *Clostridium perfringens* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. En condiciones de refrigeración y también de mesofilia pueden intervenir las especies de los géneros *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Shewanella putrefaciens* y, especialmente, *Pseudomonas*, cuyos miembros producen compuestos de olor desagradable en la degradación de los aminoácidos. En ausencia de oxígeno también puede implantarse la bacteria alterante *Brochothrix thermophacta*, que causa un olor similar a queso como consecuencia de la degradación de glucosa hacia acetoina, diacetilo y metilbutanoilo (Gram *et al.*, 2002). Cuando la humedad del alimento se reduce, especialmente en los cortes y en las carcasas, pueden predominar diversos géneros de hongos, como *Thamnidium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Chyso sporium* (moteado blanco), *Cladosporium* (moteado negro) y *Penicillium* (moteado verde), mejor adaptados a la escasa humedad.

La situación de los alimentos de origen marino, menos sometidos a control, es muy diversa según el ambiente en donde son tomadas las materias primas (mares tropicales, subtropicales o fríos, aguas limpias o contaminadas), periodo estacional, método de captura, manipulación y almacenamiento. Por otra parte existen tipos de animales marinos que mueren enseguida tras ser capturados (peces y gambas), empezando rápidamente su descomposición por los microorganismos que crecen dentro y sobre

ellos. Otros, como cangrejos y moluscos mueren más lentamente. Los moluscos presentan, además, hábitos alimenticios de filtración, concentrando los microorganismos de las aguas en las que se desarrollan.

Los peces conservados en hielo son alterados por *Pseudomonas*, *S. putrefaciens*, *Acinetobacter* y *Moraxella*. En este caso el efecto más claro de la alteración microbiana es el desarrollo de olores a sulfuro o a amoníaco que se hacen evidentes transcurridos más de 14 días, como resultado de la utilización del nitrógeno no proteínico (p.e. óxido de trimetilamina) por las bacterias. Los crustáceos se alteran más rápidamente debido al alto contenido en aminoácidos libres y otras formas de nitrógeno soluble, lo que determina la pronta aparición de amonio volátil. Distinto es el caso de los moluscos que contienen un alto contenido de hidratos de carbono (glucógeno) que, al ser fermentado por las bacterias, determina una bajada del pH del alimento.

El control de la alteración de este tipo de alimentos se lleva a cabo hoy día siguiendo tres estrategias básicas que pueden ser aplicadas de forma combinada y pretenden:

- La prevención de la contaminación inicial del alimento mediante el uso de buenas prácticas de manipulación y procesado.
- La inactivación de los microorganismos que contaminen el alimento mediante empleo de antimicrobianos como el cloro o los ácidos grasos de cadena corta.
- El almacenamiento de los alimentos en condiciones que impidan o retrasen el crecimiento de los microorganismos, mediante refrigeración, envasado en atmósfera modificada o en vacío, tratamiento térmico del alimento envasado y post-pasterización e irradiación.

1.2.2.2. La leche y derivados lácteos

Son alimentos altamente nutritivos y perecederos por ser buenos medios para el crecimiento de muchos microorganismos; por ello, han estado sujetos desde tiempos prehistóricos, a una extensa gama de tratamientos de conservación.

La leche es un buen medio de cultivo para numerosos microorganismos (Barbaros, 1999) debido a su alto contenido en agua, pH próximo a la neutralidad, y presencia de gran cantidad de nutrientes como son lactosa, grasa, proteínas, minerales y varios compuestos nitrogenados no proteicos. Generalmente, y bajo las condiciones adecuadas, el nivel de contaminación de la leche cruda debería ser mínimo (menos de 1000 UFC/ml). Según la Federación Internacional de productos lácteos (Internacional Dairy

Federation, IDF), un recuento total superior a 10^5 UFC/ ml, indica una falta seria de higiene en la cadena de producción, mientras que recuentos inferiores a 2×10^4 UFC/ml, indican que las condiciones higiénicas seguidas para la obtención de la leche son las adecuadas (Barbaros, 1999).

La **leche líquida** puede desarrollar una serie de defectos, en los que están implicados tres grandes grupos de microorganismos: bacterias psicrotróficas, bacterias del ácido láctico (fermentadoras no esporuladas) y bacterias fermentadoras esporuladas, que producen compuestos que alteran su sabor, olor y pH.

Defecto	Microorganismo asociado	Producto metabólico
Amargor	Bacterias psicrotróficas, <i>Bacillus cereus</i>	Péptidos amargos
Ranciedad	Bacterias psicrotróficas	Ácidos grasos libres
Afrutado	Bacterias psicrotróficas	Ésteres de etilo
Coagulación	<i>Bacillus</i> sp.	Desestabilización de la caseína
Acidificación	Bacterias lácticas	Ácidos láctico y acético
Malteado	Bacterias lácticas	3-metil butanal
Viscosidad	Bacterias lácticas	Exopolisacáridos

Tabla 1.- Algunos defectos de la leche líquida ocasionados por el crecimiento microbiano.

En cada uno de los tres grupos de bacterias alterantes de la leche podemos destacar como microorganismos más frecuentes (Frank, 1997) los siguientes:

Las bacterias psicrotróficas que con mayor frecuencia alteran la leche cruda y pasterizada pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae* (sobre todo *Pseudomonas fluorescens*), y más rara vez a la familia *Neisseraceae* y a los géneros *Flavobacterium* y *Alcaligenes*. Se trata de bacilos aeróbicos proteolíticos y productores de lipasas, fosfatasa y otros enzimas hidrolíticos extracelulares. Proceden del suelo, agua empleada para lavar los equipos de ordeño y otros usos y de la materia vegetal. Es indicativo que en los pastos de que se alimentan los animales lecheros, estas bacterias se pueden encontrar a concentraciones del orden de 10^8 células/g.

Las principales bacterias fermentadoras no esporuladas que alteran la leche son las del ácido láctico (BAL) y pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, aunque ocasionalmente pueden intervenir bacterias coliformes. Las BAL se encuentran de forma normal en la piel y en el canal por donde sale la leche en la ubre, por tanto se encuentran en la leche. También están asociadas a los ensilados y otros alimentos para animales y a las heces. Los coliformes están en la piel de la ubre, procedentes de material fecal.

Las bacterias fermentadoras esporuladas suelen alterar los productos lácteos envasados como leche, nata o leche condensada. Las más frecuentes son *Bacillus cereus*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* y *B. megaterium*: De especial importancia por la extrema resistencia de sus esporas al calor es *B. stearothermophilus*.

Además de los defectos ocasionados por las bacterias, la leche y derivados lácteos líquidos pueden ser alterados por levaduras y hongos filamentosos (mohos), que son capaces de crecer a pH bajo, utilizando la lactosa y el ácido láctico; algunas levaduras confieren un olor afrutado (olor a levadura), acompañado a veces por formación de gas. Las levaduras alterantes más comunes son *Kluyveromyces marxianus*, y *Dabaryomyces hansenii*.

Para lograr un efectivo control de las alteraciones en la leche cruda es necesario:

- Limitar la contaminación inicial mediante la aplicación de adecuadas medidas de limpieza e higiene en la instalación ganadera en general y, específicamente, en las ubres de los animales antes del ordeño, retirando los residuos de leche sólidos que impiden la actuación de los desinfectantes químicos.
- Lograr un rápido enfriamiento de la leche después de la extracción para evitar el crecimiento de bacterias que, inevitablemente, la contaminan.
- Mantener la leche a bajas temperaturas, evitando el calentamiento por adición de leche recién extraída o la formación de hielo que puede causar la rotura de los glóbulos de grasa haciéndolos susceptibles a la lipólisis.

En etapas posteriores, los problemas causados por la mayoría de las BAL y los coliformes son controlados mediante pasterización. Los causados por bacterias esporuladas requieren el empleo de tratamientos UHT (ultra high temperature), más drásticos.

Un derivado lácteo de gran importancia por su extenso uso y aceptación y la amplia variedad de formas que presenta es **el queso**. Al margen de las bacterias empleadas como cultivos iniciadores del proceso de obtención del queso pertenecientes a las BAL,

la microbiota presente en el mismo está compuesta de otras BAL, principalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* y también de *Micrococcus* y, según el tipo de queso, diversos mohos (Tamine, 1999). Esto hace que este alimento tan apreciado, si bien bastante estable una vez acabada su fabricación, también sea susceptible de ser alterado microbiológicamente, sobre todo en el proceso de elaboración, dando lugar a una serie de defectos originados por la acumulación de metabolitos que alteran su sabor, olor y pH, que se enumeran a continuación.

Defecto	Microorganismo asociado	Producto metabólico
Textura abierta, fisuras	Lactobacilos heterofermentadores	Dióxido de carbono
Gas en etapas tempranas	Coliformes, levaduras	Dióxido de carbono, hidrógeno
Gas en etapas tardías	<i>Clostridium</i> spp.: soplado	Dióxido de carbono, hidrógeno
Enranciamiento	Bacterias psicrotroficas	Ácidos grasos libres
Afrutado	Bacterias lácticas	Ésteres de etilo
Depósitos cristalinos blancos en superficie	<i>Lactobacillus</i> spp.	Exceso de D-lactato
Color rosado	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	Alto potencial redox

Tabla 2.- Defectos ocasionados en el queso como resultado del crecimiento microbiano

Aunque las BAL son parte de la microbiota normal dominante en los quesos, producen defectos de olor, de aspecto (fisuras) y de textura (reblandecimiento) en el queso. Las especies asociadas con estos defectos son *Lactobacillus brevis*, *L. casei* subsp. *pseudopantarum*, *L. casei* subsp. *casei*. La aparición de manchas rosas se debe generalmente a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* o al crecimiento de las propionibacterias.

Uno de los principales defectos ocasionados por los microorganismos en el queso es la formación tardía de gas (soplado) que tiene lugar tras varias semanas de maduración, a consecuencia del crecimiento, generalmente, de *Clostridium tyrobutiricum* y, más rara vez, de *C. sporogenes* y *C. butyricum*. Los quesos a los que afecta con mayor

frecuencia son los de los tipos Emmental, Suizo, Gouda y Edam que presentan altos pH y humedad y bajo contenido en sales, aunque también puede afectar a los Cheddar e Italianos. Se debe a la fermentación del ácido láctico hasta ácido butírico y acético, dióxido de carbono e hidrógeno. Esta transformación repercute en el aroma y la apariencia del queso.

En el queso, **el control de los defectos** ocasionados por las bacterias coliformes se lleva a cabo mediante el empleo de prácticas higiénicas adecuadas en la extracción y almacenamiento de la leche, empleando leche pasteurizada y llevando a cabo una rápida fermentación de la misma. Más problemático es el control de las BAL alterantes ya que su desarrollo está favorecido durante la coagulación y maduración del queso y requiere una limpieza extrema de los sistemas de producción.

Mayor complejidad presenta aún el control de la alteración debida a bacterias esporuladas. Éste se practica intentando eliminar las esporas de la leche en la planta quesera o impidiendo que crezcan en el queso. Estos propósitos se intentan mediante centrifugación de la leche o adicionando compuestos como nitratos o lisozima, que inhiben en alguna medida la germinación de las esporas. Sin embargo los primeros están prohibidos en muchos países como aditivos en el queso y la segunda no protege completamente. Una alternativa en desarrollo es el empleo de algunas bacteriocinas de las BAL, que inhiben efectivamente la germinación de las bacterias esporuladas anaeróbicas.

El queso es alterado también por mohos; el más frecuente es *Penicillium* y menos habituales son *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, y *Hormodendrum*.

El control de los mohos se lleva a cabo evitando la exposición de la leche pasteurizada a los ambientes que los contienen. Esto se consigue mediante envasado, para reducir la presencia del oxígeno, almacenando en frío, y adicionando antimicóticos (sorbato, propionato, natamicina), a los que, por otra parte, son resistentes muchos de los mohos alterantes.

1.2.2.3. Frutos, verduras y granos

Los alimentos de origen vegetal son muy diferentes en su composición y, por ello, los patrones de alteración microbiana difieren sustancialmente. A pesar de ello poseen como característica común su estructura a base de celulosa y pectina.

La alteración de estos productos puede producirse antes de ser cosechados o en las etapas de almacenamiento y procesado que sigue a la recolección. En muchos casos se debe a la producción de enzimas microbianos que degradan los tejidos vegetales y producen reblandecimientos en diversas zonas. En general las operaciones de procesado que dañan los tejidos y liberan nutrientes (troceado, rebanado, etc.) incrementan la posibilidad y rapidez de la alteración.

Las verduras son atacadas por una extensa variedad de microorganismos, especialmente mohos y también levaduras y bacterias, siendo éstas últimas las que se suelen aislar en las primeras etapas en razón a su crecimiento más rápido. De hecho, la alteración de estos alimentos, con alta actividad de agua, es inevitable en ausencia de un tratamiento preventivo. Existe una gran variedad de hongos que degradan los vegetales: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pythium*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Rhizopus*, etc.

La alteración de las verduras se intenta prevenir mediante diversos métodos: lavado con cloro, envasado bajo atmósfera modificada, congelado y envasado-tratamiento térmico. Este último tratamiento, si bien muy eficaz y por ello extensamente usado, es superado por las bacterias esporuladas, sobre todo aquellas termofílicas como *Bacillus stearothermophilus* o *Clostridium thermosaccharolyticum*.

La alteración de los frutos frescos es algo menos rápida debido a que, aunque también poseen una alta actividad de agua, presentan un pH más ácido, tejidos epidérmicos más gruesos y ácidos orgánicos antimicrobianos. Los microorganismos implicados son mohos y levaduras y, sólo excepcionalmente, bacterias (*Erwinia*), que tienen la misma procedencia que los de las verduras.

El procesado aplicado a los frutos frescos es similar al de las verduras, siendo el lavado una forma de retirar microorganismos y el cortado y laminado, vías para la entrada y la proliferación de microorganismos. Hay diversas formas de prevenir la alteración microbiana de los frutos frescos: desecación, adición de azúcar o tratamiento térmico.

La alteración de los granos y derivados presenta ciertas peculiaridades debido a su baja actividad de agua y a sus principales usos: como semillas y en alimentación animal (más que en alimentación humana, con importantes excepciones como son pan, cerveza, aperitivos) por lo que se almacenan en silos. En los granos se encuentra una importante población de bacterias y menos de mohos y levaduras. Sin embargo los microorganismos alterantes primarios de estos materiales son los mohos, debido a su mayor capacidad para crecer a baja actividad de agua. Aunque el principal interés del

crecimiento de los hongos en estos alimentos es su potencial para producir micotoxinas, muchos de ellos también pueden afectar sus cualidades sensoriales: aspecto, color, olor etc. Antes de ser utilizados en alimentación humana, la mayor parte de los granos son sometidos a algún tipo de tratamiento térmico, que suele ser suficiente como para inactivar la mayor parte de los microorganismos. Tal es el caso de la elaboración del pan.

1.2.3. Microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos

Los microorganismos patógenos transmitidos por alimentos son aquellos microorganismos que causan enfermedad en los humanos o en animales y que utilizan a los alimentos, y a menudo también el agua, como vehículos de transmisión. Éstos comparten una serie de características: generalmente son zoonóticos, esto es, tienen un reservorio animal desde el cual pasan a humanos; rara vez causan enfermedad en el hospedador animal infectado y pueden propagarse epidémicamente con relativa rapidez (Notermans, 1999). En general, el crecimiento de los microorganismos patógenos en los alimentos a los niveles de las dosis infectivas medias, no suele alterar las propiedades organolépticas de los mismos por lo que son consumidos sin recelo alguno.

Desde hace mucho tiempo se ha considerado que los alimentos juegan un papel importante en la transmisión de enfermedades infecciosas o bien ser causa de envenenamiento por la presencia de toxinas de origen químico o microbiológico. De hecho, las enfermedades transmitidas por alimentos se encuentran entre las patologías más extendidas en el mundo contemporáneo y de ahí su significativo impacto socioeconómico. Si bien, en los países industrializados, en la mayoría de los casos, el cuadro sintomático no es grave, con trastornos que se manifiestan mayoritariamente en el tracto intestinal en forma de gastroenteritis, algunas enfermedades de transmisión alimentaria presentan un cuadro clínico severo con porcentajes de mortalidad relativamente altos (el rango de mortalidad de la listeriosis, por ejemplo, puede alcanzar el 30 %) (Notermans, 1999).

Para establecer la relación de un microorganismo particular con una enfermedad y con un alimento se requiere un exhaustivo estudio epidemiológico, centrado en cinco puntos:

- Control y vigilancia de los informes de laboratorio sobre infecciones de origen alimentario.

- Monitorización de la contaminación de alimentos y animales por patógenos específicos.
- Investigación de los distintos brotes.
- Recolección de informes sobre brotes a nivel regional, nacional y global.
- Estudio y análisis de infecciones esporádicas.

Además, se hace imprescindible llevar un archivo tanto de las altas médicas relacionadas con brotes causados por alimentos, como de los informes de defunción y notificaciones de enfermedad (Notermans, 1999). Todo esto es fundamental para controlar la enfermedad y establecer el riesgo y los puntos críticos de control en el proceso de producción de los alimentos. En general, este tipo de patógeno sigue un ciclo de transmisión fecal-oral, siendo los alimentos eslabones de la cadena de transmisión, situados entre el hospedador infectado (enfermo, convaleciente o portador sano) que emite el microorganismo en sus heces, y el individuo sano susceptible de convertirse en un nuevo hospedador.

A continuación se presentan brevemente los principales microorganismos causantes de envenenamiento de los alimentos, centrados en los reservorios de los mismos y en los vehículos que los transmiten, ya que es muy importante saber qué tipo de microorganismo puede contaminar los diferentes tipos de alimentos y cuales son sus fuentes, para establecer medidas que prevengan y/o eliminen tal contaminación. Hay que señalar, sin embargo, lo limitado de las estadísticas disponibles, por la imprecisión de los datos, y, sobre todo, porque una gran mayoría de los casos de enfermedades transmitidas por alimentos no son registrados, especialmente aquellos de carácter leve y los casos aislados. Como ejemplo cabe reseñar que, de los 5515 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos registrados en España durante el periodo 1993-1998, 2007 fueron atribuidos a agentes desconocidos.

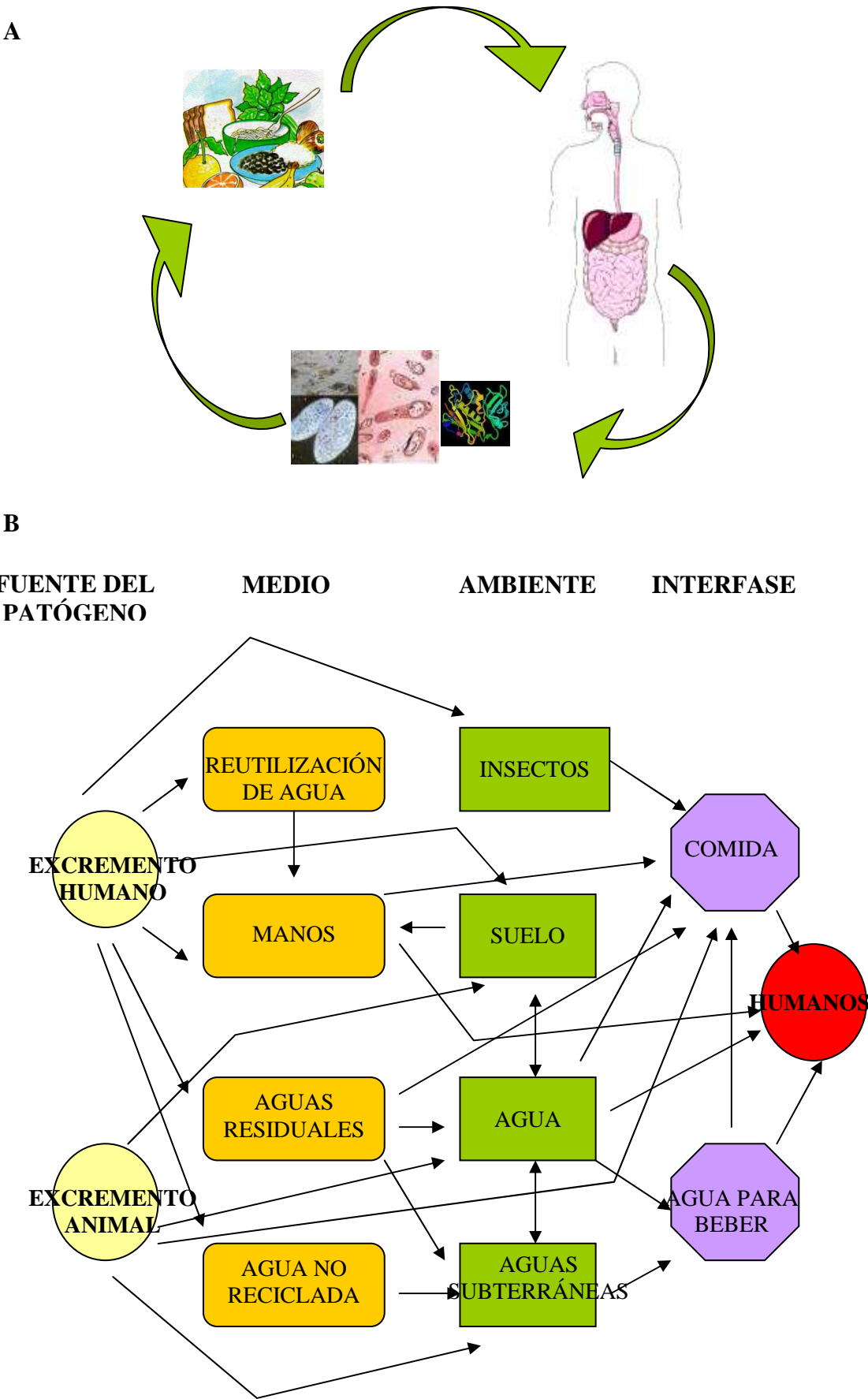


Figura 2.- Ciclo de transmisión fecal-oral de los microorganismos y/o sus toxinas. (A) Vista general; (B) Vías de transmisión

Salmonella. Es un bacilo Gram negativo encuadrado en la familia *Enterobacteriaceae*. Se estima que es responsable de 1'4 millones de casos anuales de enfermedad en humanos y de aproximadamente 600 muertes anuales. Constituye, aproximadamente, el 30 % de todos los casos de intoxicación alimentaria registrados en EE.UU (Angelidis *et al.*, 2006). En España, este patógeno representa el 80 % de los casos de enfermedades transmitidas por alimentos, durante el periodo 1993-1998, fue responsable de 2738 de los 5517 brotes de registrados, con *S. enteritidis* a la cabeza (1163 brotes).

Aunque las fuentes más comunes de infección son las aves de corral y sus derivados, también se han asociado brotes a carnes de cerdo, cordero, ternera, productos lácteos e incluso a productos vegetales (Ekperigin y Nagaraja, 1998 y Campbell *et al.*, 2001).

Las enfermedades ocasionadas por esta bacteria son consideradas zoonosis, ya que se encuentra en el intestino de un gran número de animales domésticos (incluidos los de compañía) y salvajes, que son los reservorios de esta bacteria para los humanos y que también pueden desarrollar enfermedad. Esta ubicuidad, junto con las prácticas de cría intensiva de animales, que determinan su hacinamiento en las fases de estabulación, transporte y sacrificio, y el empleo de restos animales en alimentación animal, hacen que el grado de contaminación de diversos tipos de alimentos, carnes, (vacuno, ovino y aves de corral), huevos, pescados y mariscos, sea extremadamente alta.

Finalmente hay que señalar el riesgo que representa el portador sano humano, que alberga la bacteria en el intestino, los riñones o la vesícula biliar, y que puede contaminar los alimentos durante su manipulación.

Un problema adicional en las infecciones por *Salmonella* es que, debido al uso indiscriminado de antibióticos de uso clínico, como ampicilina, cloranfenicol, sulfamidas y quinolonas en las prácticas de cría animal intensiva, se ha producido la selección de cepas resistentes a muchos de ellos.

La dosis infectiva de *Salmonella* es muy variable dependiendo de la serovariedad, del alimento y de la susceptibilidad del hospedador, siendo más baja para niños, ancianos, personas inmunocomprometidas, o personas con hipoclorhidria. Los alimentos con mayor contenido en grasa, disminuyen la dosis infectiva, posiblemente porque la bacteria queda protegida del ácido clorhídrico en las micelas hidrofóbicas.

Campylobacter jejuni. Las infecciones por esta bacteria también son consideradas como zoonosis ya que presenta un gran número de reservorios animales: conejos, roedores varios, pájaros, corderos, caballos, vacas, cerdos y aves de corral, animales de compañía y también los humanos, en cuyo tracto gastrointestinal se localiza. Por ello, los alimentos derivados de estos animales: leche cruda, huevos, carne y también vegetales y mariscos contaminados por aguas fecales, pueden ser fuente de infección de campilobacteriosis.

A pesar de su ubicuidad, la incidencia de brotes de la enfermedad ocasionados por esta bacteria es relativamente baja, con una tasa de infección de aprox. 1000 por cada 100000 habitantes. Sin embargo está entre las causas más comunes de casos esporádicos de enteritis bacteriana en los EEUU y otros países desarrollados, debido a su baja dosis infectiva, estimándose que unas 500 células pueden causar la infección en humanos (Yang *et al.*, 2003). Generalmente está asociado a trastornos gastrointestinales, pero pueden presentarse complicaciones tales como meningitis, neumonía, abortos espontáneos y una forma severa del síndrome de Guillain- Barre (Blazer *et al.*, 1986; Nachamkim *et al.*, 1992). En España es la segunda causa de envenenamiento de alimentos después de *Salmonella*.

***Escherichia coli* O157:H7**. También miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, es el serotipo más frecuente de las cepas enterohemorrágicas de *E. coli* (EHEC). El principal reservorio es el ganado vacuno y son, por tanto, los alimentos derivados de éste, los vehículos de transmisión de este patógeno, más concretamente los productos cárnicos y la leche no pasteurizada, si bien también es transmitido por aves de corral, bocado fríos, vegetales y agua de bebida o baño (Chen y Durst, 2006). Debido a su alta resistencia a los pH ácidos también se han referido brotes ocasionados por la ingestión de zumo de manzana.

Un dato relevante de esta bacteria es su baja dosis infectiva, que está en torno a unos cientos de células. En casos severos puede causar anemia temporal, hemorragias e incluso la muerte.

Yersinia enterocolitica. Es una enterobacteria de amplia distribución ya que se encuentra en el intestino de muchos mamíferos y otros animales (ranas, peces, moscas, cangrejos). Aunque parece que el principal reservorio de las yersiniosis para los humanos son los cerdos, el alimento más comúnmente asociado con esta enfermedad es la leche cruda.

***Shigella* spp.:** *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*. También pertenece a las *Enterobacteriaceae* pero al contrario que sus compañeras de familia ampliamente distribuidas, el único reservorio de *Shigella* es el intestino humano, La ruta de transmisión es fecal-oral, mediante ingestión de alimentos contaminados por las malas prácticas higiénicas de los manipuladores de alimentos. Los alimentos se pueden contaminar por medio de dedos, heces y moscas. Sin embargo, debido a la baja dosis infectiva mínima de esta bacteria (incluso tan baja como 200 organismos), se puede producir la transmisión directa persona-persona, sobre todo si se dan condiciones de hacinamiento. Los alimentos más frecuentemente asociados con las sigelosis han sido diversos tipos de ensaladas conteniendo lechuga, patata o cebolla.

***Vibrio* spp.** En este caso es preciso diferenciar entre los *V. cholerae* O1 productores del cólera y las diversas especies de vibrios que producen cuadros gastroentéricos, en general mucho menos severos que el cólera: *V. cholerae* no O1, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimiscus*, *V. vulnificus* y muchas otras. Tanto unos como otros tienen, debido a su halofilia, por reservorio las aguas marinas de los estuarios, y, en consecuencia están presentes en diversos alimentos de origen marino: cangrejos, gambas, pescado crudo, mejillones, calamares etc. Los humanos pueden albergar muchos de estos vibrios en el intestino durante un tiempo limitado eliminando entonces las bacterias en las heces, que van a parar a las aguas residuales, las cuales, si se usan para regar verduras y frutas, pueden transmitir la enfermedad.

***Aeromonas*, *Plesiomonas*.** Los hábitats primarios de *Aeromonas* son los diferentes tipos de ambientes de aguas dulces, lóxicos y lénticos, donde puede colonizar plantas acuáticas y animales (peces y ranas). Algunas especies como *A. salmonicida* es un parásito obligado de peces salmónidos. Se pueden encontrar también en ambientes acuáticos contaminados con aguas residuales. Aunque no es considerado un habitante normal del intestino humano, la tasa de portador asintomático puede ser tan alta como del 30% en climas tropicales y del 3% en climas templados. Está ampliamente distribuido en los alimentos: carne, leche cruda, aves de corral, peces, moluscos y vegetales, incluso se puede encontrar, en más baja cantidad, en leche pasteurizada. La especie mas frecuente en humanos es *A. hydrophila* que, además, es un típico organismo psicrotrófico.

Plesiomonas shigelloides se encuentra en aguas dulces y de estuarios, así como en el agua de mares cálidos. Se aísla igualmente de animales de sangre caliente y fría, incluyendo perros, gatos, ganado vacuno, cerdos, serpientes, moluscos marinos y peces

tropicales. La tasa de portador en humanos es mucho mayor en países en desarrollo siendo insignificante en los industrializados. Los alimentos de los que se aísla más frecuentemente son los pescados y los de origen marino en general.

Clostridium botulinum es responsable de la enfermedad más grave de las transmitidas por alimentos, el botulismo, una entidad clínica y veterinaria claramente diferenciada de las gastroenteritis producidas por la mayoría de las bacterias consideradas en este apartado. Es debida a la producción de una neurotoxina que bloquea la liberación de acetil colina en las terminaciones de los nervios motores periféricos. Hay siete tipos de toxinas botulínicas inmunológicamente diferenciadas (denominadas de la A a la G), siendo los tipos A, B, y E los responsables del botulismo en humanos. Otra característica diferencial, de importantes implicaciones en cuanto a la seguridad alimentaria, es que se trata de una bacteria esporulada, cuyas esporas presentan una gran resistencia térmica.

Las esporas de *C. botulinum* están comúnmente presentes en suelo y sedimentos, que son los reservorios para el hombre y animales (Peck y Stringer, 2005), aunque en número variable dependiendo de la localización y del tipo de toxina. En la mayor parte de Europa, incluida España, predomina el serotipo B en los suelos, que es la localización más frecuente, y el E en los ambientes acuáticos.

Los alimentos implicados en la intoxicación por toxina botulínica difieren según la localización geográfica, siendo, en la mayoría de los casos, de manufactura doméstica. Con frecuencia se trata de alimentos salados, fermentados o desecados que se consumen sin un tratamiento térmico previo que destruya la toxina. En los países nórdicos (norte de Canadá, Alaska, Escandinavia, norte de Japón) están implicados sobre todo alimentos de origen marino, cocinados a la manera tradicional, fermentados pero con pH no muy bajo por la escasez de azúcares. En otros casos se trata de alimentos de origen vegetal (China, EEUU, Italia, España). En general, en Europa los alimentos que han causado con más frecuencia el botulismo son productos cárnicos de fabricación casera, jamones, embutidos fermentados y carnes envasadas. El abuso en la temperatura de almacenamiento de los alimentos de elaboración casera es, sin duda, una de las más importantes causas de botulismo. Aunque no es frecuente, también se han producido intoxicaciones por alimentos producidos industrialmente. Durante el año 2003 se produjeron al menos 4 brotes de botulismo en Europa (Francia, Ucrania, Noruega y Alemania), estando implicada la toxina de los serotipos B y E (Peck y Stringer, 2005).

Clostridium perfringens es también una bacteria esporulada que produce enteritis necrotizante y, más frecuentemente en nuestro ámbito, el llamado envenenamiento de alimentos debido a las cepas de *C. perfringens* tipo A, productoras de una enterotoxina con efectos vasoconstrictores, de agregación plaquetaria, hemólisis de los eritrocitos y modulación del metabolismo celular activando la cascada del ácido araquidónico y proteínas quinasas (Dahiya *et al.*, 2005). Es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más comunes en EEUU y Europa, posiblemente estimada por lo bajo, al no ser registrados la mayoría de los casos, ya que, debido a que los síntomas son de carácter medio y poco definidos, a menudo no es diagnosticada.

C. perfringens, de la que se conocen unas 800 serovariedades (Dahiya *et al.*, 2005) es ubicua en los ambientes naturales, suelo, alimentos, polvo, y el tracto intestinal de los humanos y de animales domésticos. Normalmente los brotes debidos a esta bacteria, que afectan a un alto número de personas (más de 25/brote), ocurren en grandes instituciones en las que se preparan alimentos con antelación para ser consumidos más tarde. Esto da lugar a, que si estos alimentos son sometidos a abuso de temperatura, la bacteria crezca y produzca toxina en ellos. Los vehículos más comunes son carne de vacuno y ovino y aves de corral.

Bacillus cereus es una bacteria esporulada aeróbica ampliamente extendida que se localiza en el suelo, aire, partículas de polvo, agua, y, por tanto, en un gran número de alimentos tanto crudos como procesados (Andersson *et al.*, 1995). Esta bacteria produce una toxina emética y al menos tres tipos diferentes de enterotoxinas que son responsables de los síndromes eméticos y diarreicos respectivamente (Granum, 1994). En la leche pasteurizada, las esporas no solo sobreviven al calor, sino que son estimuladas a germinar por el choque térmico, encontrándose un ambiente óptimo en el que se ha suprimido la competencia de otros microorganismos (Andersson *et al.*, 1995); de hecho la leche al final de su periodo útil de vida suele estar bastante cargada de *B. cereus*. Es muy posible que la incidencia de esta enfermedad esté también subestimada por ser de curso corto y afectar a un número bajo de personas. Por otro lado es posible que exista un cierto nivel de inmunidad adquirida en los bebedores habituales de leche, aunque *B. cereus* produce una proteasa que confiere mal olor a la leche lo que limita su consumo cuando está muy contaminada con esta bacteria.

La importancia de esta intoxicación viene dada por varias circunstancias: la amplia distribución de esta bacteria, la producción de esporas termorresistentes que le permiten sobrevivir en los ambientes por largos periodos de tiempo, la producción de

enterotoxinas y la existencia de cepas psicrotróficas (Granum *et al.*, 1993; Andersson *et al.*, 1995; Granum, 1995; Giffel *et al.*, 1995).

Listeria monocytogenes. Es un bacilo Gram positivo no esporulado. La listeriosis ha emergido como una de las principales enfermedades transmitidas por alimentos a finales del siglo XX. Aunque su incidencia es baja, es de indudable importancia en salud pública debido a diversas circunstancias: la gravedad de los síntomas no entéricos (meningitis, septicemia y aborto), la alta mortalidad de sus infecciones (20-30%) (Batt, 1999), el largo periodo de incubación, el elevado riesgo que representa para niños pequeños, especialmente neonatos, mujeres embarazadas, ancianos e individuos inmunocomprometidos (YOPIS people: Youngs, Old, Pregnant, Immunocompromised people) y la alta tasa de portador sano intestinal (hasta el 92% en mujeres que trabajan como técnicos de laboratorio, ya que una tasa razonable de portador sano en la población general puede ser del orden de 2-10%), su ubicuidad y, finalmente su resistencia a condiciones ambientales adversas (bajo pH, alta concentración de NaCl, baja temperatura).

L. monocytogenes está ampliamente distribuida en el ambiente, suelo, agua y materia vegetal en descomposición. Su presencia en plantas procesadoras de alimento ha sido referida con gran frecuencia, especialmente en las de productos lácteos y cárnicos, lo que determina que se encuentre en una amplia variedad de alimentos, tanto crudos como procesados: leche, quesos, carne de cerdo, buey, pollo, embutidos loncheados, embutidos fermentados o ahumados, patés, peces, mariscos, vegetales frescos etc. Como dato indicativo Salvat *et al.* (1995), encontraron que el 68% de las muestras ambientales tomadas en plantas de curación de productos cárnicos daban positivas para esta bacteria, la cual permanecía en un 17% de las localizaciones aún después de la limpieza de las mismas.

Entre los alimentos más comúnmente asociados con brotes de listeriosis están los pollos sometidos a un procesado térmico suave y los perritos calientes, al igual que las *delicatessen* de carne y los quesos hechos con leche no pasteurizada, especialmente los de pasta blanda.

Staphylococcus aureus. Los estafilococos productores de enterotoxinas han sido la segunda causa de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en nuestro país en el quinquenio 1993-1998, si bien a mucha distancia de *Salmonella* (2738 brotes de los 5517 referidos), aunque al tratarse de una enfermedad de curso rápido y autolimitante, es posible que un alto porcentaje de los casos no se diagnostiquen ni se refieran. Las

enterotoxinas que producen son proteínas termorresistentes que al ser ingeridas provocan un síndrome gastrointestinal de rápida aparición (2 a 3 horas tras la ingesta del alimento contaminado) (Gómez-Lucía *et al.*, 1992). Son también responsables de importantes enfermedades en animales domésticos causando serios problemas a la industria láctea, originados sobre todo por la mastitis bovina, a partir de la que se puede transmitir a la leche.

Si bien las infecciones alimentarias producidas por este microorganismo están disminuyendo en la mayoría de países, su incidencia en las distintas naciones varía sustancialmente según la geografía y los hábitos locales de alimentación (Martin *et al.*, 1999).

El principal reservorio de la enfermedad en humanos son los propios humanos, donde coloniza las fosas nasales anteriores y, en menor medida, la piel y el perineo, con una tasa de portador del 30-80%. *S. aureus* se disemina entre humanos y desde los humanos a los alimentos por contacto directo, por la piel descamada o por aerosoles respiratorios. En otras ocasiones la contaminación de los alimentos procede de los animales y de sus productos (leche, carne y huevos). Las carnes son un foco importante de infección ya que, aunque la bacteria se destruye por el calor, las enterotoxinas estafilocócicas resisten temperaturas de 100 °C durante 30 min.

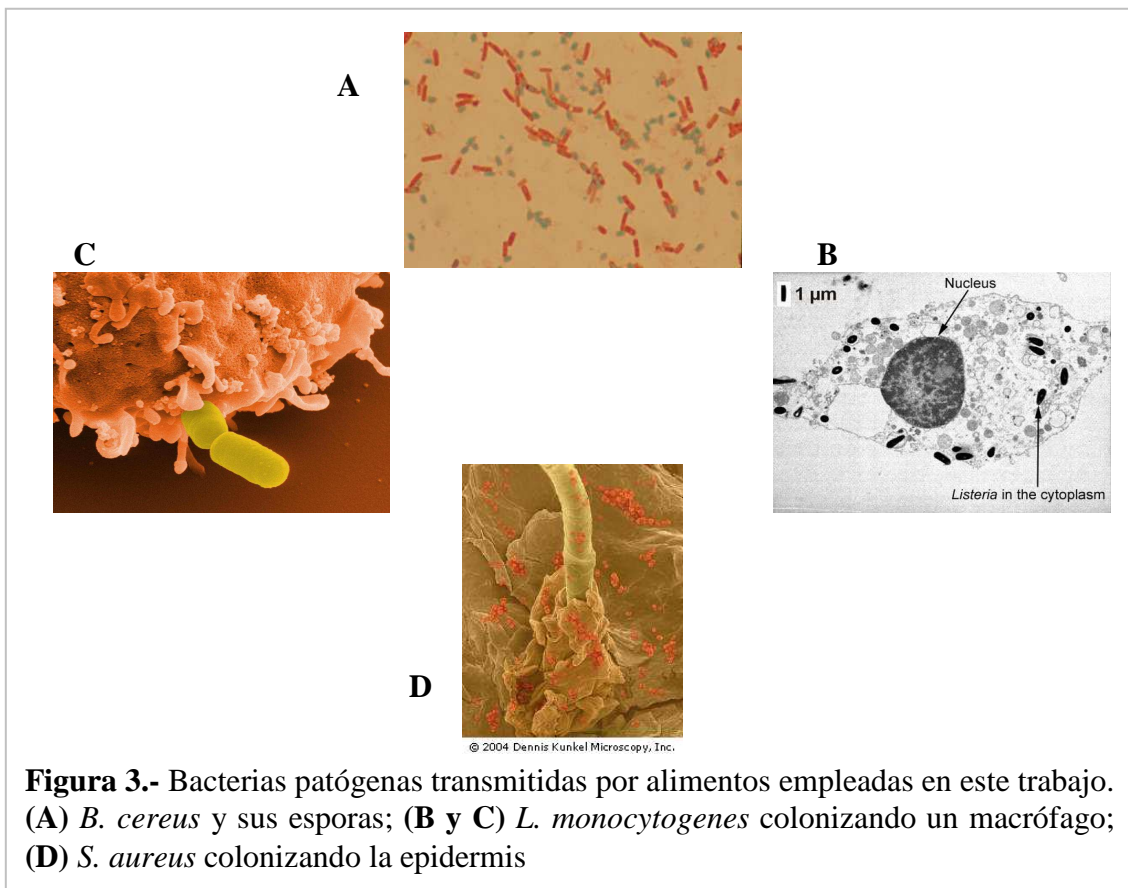


Figura 3.- Bacterias patógenas transmitidas por alimentos empleadas en este trabajo. (A) *B. cereus* y sus esporas; (B y C) *L. monocytogenes* colonizando un macrófago; (D) *S. aureus* colonizando la epidermis

1.3. Métodos de conservación de los alimentos

Sea cual sea el método de conservación que se considere, se trata en realidad de la aplicación práctica en el campo de los alimentos, de las leyes de Liebig y Shelford, que supone el ajuste de las condiciones ambientales para que no se satisfagan los requerimientos nutricionales y/o se sobrepasen los rangos de tolerancia a los factores físicoquímicos de los microorganismos, con el propósito de impedir el crecimiento de aquéllos potencialmente alterantes y/o patógenos. Así pues la prevención de la alteración del alimento inhibiendo o eliminando a los microorganismos potencialmente dañinos presentes en el mismo, constituye la base de la conservación de alimentos (Surekha y Reddy, 1999).

Los procedimientos básicos usados en el control del desarrollo microbiano en los alimentos son:

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

1.3.1. Métodos físicos de conservación de alimentos

Los métodos físicos para la conservación de alimentos son aquéllos que utilizan tratamientos físicos para inhibir, destruir o retirar microorganismos indeseables y en los que no están implicados aditivos antimicrobianos o productos del metabolismo microbiano.

Los tratamientos físicos que se emplean en la industria alimentaria son:

- Procesos físicos de deshidratación.
- Almacenamiento en frío y congelación.
- Tratamientos térmicos.
- Irradiación con UV o radiaciones ionizantes.

- Retirada mecánica de los microorganismos mediante filtración de los alimentos líquidos.
- Nuevos tratamientos no térmicos, como alta presión hidrostática, campo eléctrico pulsado, campo magnético oscilante, efectos fotodinámicos, y combinación de procesos físicos como calor-irradiación, deshidro-irradiación o mano-termo-sonicación.

1.3.1.1. Procesos físicos de deshidratación

El agua y, más específicamente, la disponibilidad de agua, es uno de los factores más importantes que controlan la alteración de los alimentos. La disponibilidad de agua se mide mediante la actividad de agua (a_w) que se define como la relación, a la misma temperatura, entre la presión de vapor de agua en un alimento (P) y la presión de vapor del agua pura (P_0): $a_w = P/P_0$

La conservación de los alimentos mediante deshidratación se basa en la inhibición del crecimiento microbiano al eliminar el agua disponible, ya que la mayoría de las bacterias requieren un valor mínimo de a_w mínima 0,91-0,88.

Hay varias técnicas para eliminar el agua de los alimentos sólidos que incluyen el secado mediante electrospray, deshidratación osmótica, liofilización, aire caliente, extrusión, radiofrecuencia y microondas (Vega- Mercado *et al.*, 2001).

1.3.1.2. Almacenamiento en frío

Se trata de mantener los alimentos a temperaturas bajas, situadas por encima del punto de congelación (-2 °C a 16 °C). Según el tipo de alimento, el periodo de almacenamiento puede ir desde unos pocos días hasta varias semanas. El efecto conservante del frío se basa en que al reducir la temperatura, disminuye la velocidad de las reacciones químicas y el estado de fluidez de los lípidos de la membrana. Las temperaturas usuales de refrigeración permiten sólo el crecimiento de los microorganismos psicrófilos y psicrótrofos, generalmente bacterias, y, si la población inicial de éstos es alta, los alimentos refrigerados se alterarán rápidamente.

Es importante controlar, a nivel de unos pocos grados, las variaciones de la temperatura de almacenamiento, ya que pueden ser muy importantes en la tasa de crecimiento de los microorganismos, en especial en alimentos mínimamente procesados

cuya vida media en relación con los patógenos psicrótrofos *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* y *Aeromonas hydrophyla*, se prolonga mediante el frío.

1.3.1.3. Congelación y almacenamiento a temperaturas de congelación

Esta técnica consiste en bajar la temperatura de un alimento hasta $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mantenerlo almacenado a ésta o a más baja temperatura. Es una técnica muy conveniente pues conserva muy bien sin alterar, sin embargo es energéticamente muy costosa. Como efecto de la congelación se disminuye la temperatura y la actividad de agua, por lo que sólo los microorganismos tolerantes al frío y xerotolerantes, generalmente hongos, pueden crecer. Además la congelación causa múltiples daños en las estructuras, enzimas y ácidos nucleicos de los microorganismos que pueden llevar a su inactivación.

Hay varios factores que influyen el efecto de la congelación sobre los microorganismos, siendo el más importante la composición del medio.

Los alimentos congelados son bastante seguros y las enfermedades asociadas a ellos no son comunes, sin embargo, así como el proceso preserva la calidad del alimento, también puede preservar la viabilidad de ciertos microorganismos patógenos (Archer, 2004) por lo que, en determinadas condiciones, los microorganismos supervivientes pueden proliferar durante la descongelación a expensas de los nutrientes liberados por las células que han sido dañadas en el ciclo congelación-descongelación. Por ello la recongelación de los alimentos descongelados puede ser una práctica peligrosa.

1.3.1.4. Tratamientos térmicos

Son los métodos más efectivos y más ampliamente usados para destruir microorganismos e inactivar enzimas, de ahí que la resistencia al calor de los distintos microorganismos sea un aspecto muy importante desde el punto de vista de la industria alimentaria. El principal objetivo de estos tratamientos es la eliminación de los microorganismos existentes, sus esporas y toxinas, es decir, la obtención de un producto estéril (Azizi, 1999).

El calor húmedo mata a los microorganismos por desnaturalización de las proteínas estructurales, los enzimas, los ADNs, los ribosomas y las membranas. El calor seco es

menos letal y mata por deshidratación y oxidación, necesitando la aplicación de temperaturas más altas y durante tiempos más prolongados.

Existen una serie de parámetros de interés en termobacteriología. Uno de ellos es el tiempo de reducción decimal, *D*, que se define como el tiempo, en minutos, requerido para destruir el 90% de la población mediante la aplicación de una temperatura letal. *D* mide la resistencia al calor de un microorganismo determinado a una temperatura dada y se puede obtener de las curvas de supervivencia que representan el porcentaje de supervivientes de un determinado microorganismo en un medio tras la aplicación de una temperatura específica durante tiempos crecientes. Bajo determinadas condiciones la tasa de muerte es constante a una temperatura dada y es independiente del número inicial de células viables.

Otro parámetro de interés es *el tiempo de muerte térmica*, que es el tiempo necesario para matar a un número dado de organismos a una determinada temperatura. Las curvas de muerte térmica (tiempo de muerte *versus* temperatura) indican la resistencia de un microorganismo a diferentes temperaturas.

La resistencia al calor de los microorganismos está influida por muchos factores: diferencias entre especies y cepas, entre células vegetativas y esporas, edad y fase del ciclo celular, temperatura y medio de crecimiento, pH, concentración de sales y de compuestos orgánicos del medio, etc.

Uno de los tratamientos térmicos más empleados es la **pasteurización**, tratamiento relativamente suave que inactiva enzimas y destruye una amplia población (99-99,9 %) de las células vegetativas. Su principal objetivo es eliminar las bacterias patógenas no esporuladas presentes en los alimentos y, puesto que también destruye una gran proporción de los microorganismos alterantes, aumenta su vida media (Wilbey, 1999). La pasteurización debe ser complementada con un envasado adecuado que prevenga la recontaminación. Además, los alimentos pasteurizados deben ser almacenados a baja temperatura para evitar el crecimiento de los formadores de endosporas. Por todo ello, su vida media depende del tipo de alimento y de las condiciones de pasteurización y almacenamiento. En la Tabla 3 se pueden ver los procesos de pasteurización más comúnmente empleados a nivel industrial.

Tipo de pasteurización	Tratamiento
L.T.L.T. Temperatura baja, tiempo corto	65 °C / 30 minutos
H.T.S.T. Temperatura alta, tiempo corto	75 °C / 15 segundos
U.H.T. Temperatura ultraalta	140 °C / 3 segundos

Tabla 3.- Valores de temperaturas y tiempos aplicados en los principales tipos de pasteurización

El **calentamiento óhmico** consiste en aplicar un calentamiento eléctrico directo haciendo pasar una corriente eléctrica a través del alimento con una alta resistencia a la conductividad, como si bombeara a través de un tubo. Es un proceso de alta temperatura aplicada un corto tiempo (HTST), que permite pasteurizar o esterilizar el material a más baja temperatura. Esta tecnología permite una producción continua sin transferencia de calor y además, al ser tan rápido, el efecto causado en los alimentos es mínimo ya que los nutrientes no son destruidos ni alteradas sus cualidades organolépticas. Es una tecnología limpia, respetuosa con el medio ambiente y con bajos costes energéticos. Combinada con un envasado aséptico proporciona un alto efecto conservante (Hugas *et al.*, 2002).

Tratamiento dieléctrico o radiofrecuencia. Tanto este tratamiento como el de microondas se basan en provocar oscilaciones muy rápidas de las moléculas de agua que producen fricción y, en consecuencia, calor. Además de los efectos letales del calor sobre los microorganismos, los campos electromagnéticos causan cambios iónicos que alteran la permeabilidad y funcionalidad de las membranas y producen la lisis celular. Se acepta, por lo general, que el término dieléctrico se aplique a las frecuencias comprendidas entre 1 y 100 MHz, que producen ondas de varios metros de longitud. Las ondas de radiofrecuencia se generan mediante un magnetrón que produce ondas electromagnéticas cuya energía y amplitud cambia al atravesar el alimento. Las principales ventajas de esta técnica respecto de los sistemas convencionales son una mayor velocidad, uniformidad y control del calentamiento, la capacidad de empezar e interrumpir el proceso de forma instantánea, la mejora en la calidad de ciertos alimentos que sufren un exceso de calentamiento en superficie con las técnicas tradicionales y los

cambios deseados en la funcionalidad de ciertos componentes alimentarios (desnaturalización de proteínas, gelificación del almidón etc.) (Hugas *et al.*, 2002).

Tratamientos con microondas. Es una variante del anterior que emplea frecuencias más altas, entre 300 MHz y 300 GHz, con longitudes de ondas inferiores, entre 1 mm y 1m. Aunque la base de este método es igual que la del tratamiento de radiofrecuencia, el equipamiento necesario es muy diferente.

Descompresión instantánea controlada (DIC). Es también un HTST ya que se trata de situar el alimento en una cámara a una temperatura por debajo de 200 °C, a una presión por debajo de 20 bares durante pocos segundos. Estas condiciones se alcanzan generalmente gracias al vapor de agua. A continuación se produce una brusca descompresión, lo que se consigue si la cámara se comunica de forma instantánea con un compartimento de un volumen mucho mayor y de baja presión, produciéndose de forma rápida la evaporación de parte del agua y el enfriamiento del material tratado, lo que detiene las reacciones de degradación térmica. Los microorganismos son destruidos mediante efectos térmicos y mecánicos. La DIC induce importantes efectos sobre la textura y las propiedades funcionales de los productos y puede ser una herramienta muy adecuada para conseguir artículos funcionales con nuevas presentaciones comerciales.

1.3.1.5. Irradiación

Es un proceso de exposición del alimento a radiaciones, bien UV o ionizantes, tales como rayos gamma emitidos por radioisótopos, electrones de alta energía o rayos X. Dependiendo de la dosis de radiación absorbida, pueden obtenerse diferentes efectos que redundan en una reducción de las pérdidas del alimento durante el almacenamiento, aumentando la vida media del producto y/o mejorando la seguridad microbiológica o parasitológica del alimento (Farkas, 2006). Sus efectos se ejercen directamente sobre el ADN.

La radiación UV más destructiva es la de 240-280 nm de longitud de onda (germicida). El principal obstáculo para su empleo en alimentos es su bajo poder de penetración. Por ello se emplea sobre todo en desinfección del aire y de alimentos líquidos: leche, cerveza y zumos de frutas, y también en el pan en rodajas, en las cámaras de maduración de los quesos y de los salchichones y en la desinfección del agua.

La radiación ionizante (RI) inhibe muy eficazmente la síntesis de ADN y de ahí que paralice la división celular. No altera los alimentos ni induce radioactividad en ellos ni en los envases y, además, su disponibilidad y costes hacen factible su uso comercial. La irradiación de los alimentos con RI representa una alternativa válida para proporcionar una dieta más variada y nutricionalmente más adecuada a la población en los lugares donde el transporte está dificultado y la refrigeración o no está disponible, o es demasiado costosa.

Los microorganismos presentan un grado muy diferente de resistencia a la radiación. Dentro de las bacterias, las más sensibles son las bacterias Gram-negativas en general y *Vibrio* spp en particular y las más resistentes son las endosporas bacterianas como las de *B. cereus* o los típicos organismos radiorresistentes como *Deinococcus radiodurans*. Los virus en general necesitan dosis de radiación mayores, del orden de 10-200 kGray. La resistencia de los microorganismos a la radiación está influenciada por diversos factores ambientales como la composición del medio, (mas resistentes cuanto más complejo es el medio), el grado de humedad, (a menor humedad los daños son menores), la temperatura (a temperaturas elevadas subletales p.e. 45 °C, se incrementan sus efectos letales), la congelación (causa un importante aumento en la resistencia), la presencia de oxígeno (incrementa enormemente la sensibilidad). Por todo ello es de gran importancia especificar las condiciones ambientales a la hora de establecer una pauta de irradiación con propósitos de conservación de los alimentos, ya que las dosis requeridas varían mucho dependiendo de las diferentes aplicaciones.

La irradiación presenta diversas ventajas sobre los tratamientos térmicos: no sube prácticamente la temperatura de los alimentos, puede ser aplicada a cualquier tipo de envase y después del envasado evitándose así la recontaminación, e incluso, en algunos casos, produce cambios químicos y físicos deseables, como el ablandamiento y el aumento de la permeabilidad. Sin embargo tiene efectos adversos, produciendo cambios inadecuados en los alimentos, sobre todo en aquellos con alto contenido en agua, en los que da lugar a malos olores y texturas. También está limitado por esta causa su uso en alimentos proteicos de origen animal.

1.3.1.6. Nuevos tratamientos físicos no térmicos

Encontrar tecnologías alternativas para eliminar o inactivar los microorganismos presentes en los alimentos sin aplicar tratamientos térmicos no es una idea nueva (Hite,

1899), pero si lo es su empleo en la conservación de los alimentos, que ha despertado recientemente el interés de los investigadores, como respuesta a la demanda por parte de los consumidores de alimentos más naturales y seguros. Estos tratamientos tienen la capacidad de inactivar a los microorganismos a temperatura ambiente o próxima a ella, evitando así los efectos negativos que el calor tiene sobre las propiedades organolépticas de los alimentos, no obstante algunos de estos procesos también pueden afectar dichas propiedades (Ross *et al.*, 2003).

Durante los últimos años varios tratamientos físicos no térmicos como la alta presión hidrostática y los campos eléctricos y magnéticos, han suscitado gran interés, por las posibilidades que ofrecen como herramientas para el procesado y conservación de los alimentos y también para desarrollar productos innovadores.

Alta presión hidrostática (APH). Se trata de aplicar al alimento presiones hidrostáticas elevadas o ultraelevadas (300 a 1000 Mpa) que se transfieren a través del mismo de forma instantánea y uniforme, lo que da lugar a cambios en el producto o en sus constituyentes. Normalmente se usan presiones isostáticas a temperatura ambiente entre 100 y 600 Mpa. La cámara de presión se carga con el alimento y se cierra, se desgasifica y la presión se transmite por medio de una bomba a través de un líquido, generalmente el agua.

La clave del efecto de la APH sobre las macromoléculas y los microorganismos es que acelera las reacciones que implican un cambio de volumen a nivel molecular, afectándose los enlaces no covalentes como los puentes de hidrógeno, los enlaces iónicos y los hidrofóbos de las proteínas y carbohidratos, que sufren cambios en sus estructuras moleculares. En general, la APH, a temperatura baja o moderada, causa la destrucción de las células microbianas vegetativas y la inactivación de enzimas, sin alterar las características organolépticas de los productos, dejando, además, las vitaminas intactas. Sin embargo la resistencia de los microorganismos es muy variable dependiendo de la cepa microbiana y de la matriz del alimento y su pH y, también, de la presión alcanzada, de la temperatura y del tiempo de exposición. Puesto que los tratamientos de APH pueden dar lugar a modificaciones de la textura y la estructura de los alimentos, esta técnica se puede emplear para desarrollar nuevos productos o para aumentar la funcionalidad de algunos ingredientes.

Campos eléctricos pulsados. Se basa en la aplicación de descargas de alto voltaje que provocan la creación de un potencial eléctrico en la membrana de las células que da

lugar a un aumento en la permeabilidad de la membrana (electroporación), lo que, si el campo eléctrico es muy alto, puede dar lugar a la salida del contenido de la célula y a su muerte. La inactivación microbiana depende del número y duración de los pulsos y de la fuerza iónica del medio y también de la temperatura y de la fase de crecimiento de los microorganismos. Las bacterias Gram-negativas son más sensibles que las Gram-positivas.

Efectos del campo magnético. El campo magnético (CM) causa cambios en la orientación de las biomoléculas y las biomembranas en relación con el campo magnético aplicado, lo cual puede afectar al crecimiento y a la reproducción de los microorganismos. Se ha encontrado que el CM oscilante puede inactivar células vegetativas y pasteurizar el alimento sin que tenga lugar un aumento significativo de la temperatura. Se cree que su efecto microbicida se debe a que carga energéticamente las partes magnetoactivas de las macromoléculas biológicas de manera que se rompen las uniones del ADN y de las proteínas.

1.3.2. Conservantes químicos

En un sentido amplio, un conservante es una sustancia química capaz de retardar o evitar el crecimiento de microorganismos, previniendo procesos de fermentación, acidificación o descomposición que causan deterioro en las propiedades organolépticas y/ o el valor nutritivo del alimento (Surekha *et al.*, 1999).

Para que una sustancia pueda ser considerada conservante, debe cumplir una serie de características, tales como, ser capaz de eliminar los microorganismos presentes en el alimento más que inhibirlos, permanecer en el alimento hasta el momento del consumo, tolerar los tratamientos aplicados al alimento, no provocar la aparición de cepas resistentes, carecer de toxicidad y, por supuesto, que su aplicación sea económicamente factible (Surekha *et al.*, 1999). De acuerdo con Davidson (1997), los conservantes alimentarios se pueden encuadrar en dos clases: conservantes químicos tradicionales, y los conservantes químicos naturales.

1.3.2.1. Conservantes químicos o tradicionales

Su definición es bastante arbitraria. Un conservante es clasificado como tradicional cuando cae dentro de cualquiera de las siguientes categorías: ha sido usado durante

muchos años, ha sido aprobado como antimicrobiano alimentario en muchos países, es producido de forma sintética o es inorgánico. Paradójicamente, muchos de los conservantes tradicionales de síntesis se encuentran en la naturaleza, como es el caso del ácido benzoico de los arándanos o el sórbico de las bayas de serbal.

Los ácidos orgánicos y sus ésteres. Tienen un efecto significativo sobre la membrana citoplasmática de las bacterias, interfiriendo con el transporte de metabolitos y el mantenimiento del potencial de membrana (Abee y Wouters, 1999). Es interesante señalar que sólo tienen actividad a pH ácido por debajo de 5,5. Incluyen:

- Ácido sórbico y sorbato: ácido graso insaturado, presente de forma natural en algunos vegetales, pero fabricado para su uso como aditivo alimentario por síntesis química. Presenta una mayor actividad a un pH por debajo de 6 (Eklund, 1983). Inhibe el crecimiento de algunos patógenos como *S. aureus* y *Salmonella*. Es poco tóxico y se utiliza en bebidas refrescantes, pastelería, ensaladas, derivados cárnicos y quesos.

- Ácido benzoico y benzoato: Es uno de los conservantes más empleados en el mundo. Tiene una mayor actividad a pHs entre 2,5 y 4,5 (Park *et al.*, 2001). Se usa en la conservación de productos de panadería, bebidas, frutas, ensaladas, jamón y gelatina.

- Ácido acético y acetato: Es uno de los agentes antimicrobianos usado desde más antiguo. Se produce en el metabolismo de las BAL, es capaz de inhibir a cepas de *Bacillus*, *Clostridium*, *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* y *Pseudomonas* (Doores, 1993). Se utiliza en carne y productos cárnicos, quesos y aceites.

- Ácido láctico y lactato: Es producido abundantemente en el metabolismo de las BAL durante la fermentación. Además de su uso como conservante se emplea también como agente de control del pH y como potenciador del sabor. Es eficaz frente a *S. aureus*, bacterias formadoras de endosporas y *Yersinia enterocolitica* (Bracket, 1987). A concentraciones entre 1 y 2% es eficaz para inhibir los microorganismos aerobios mesófilos de la carne y a Enterobacterias (Smulders *et al.*, 1986).

- Ésteres de sacarosa de ácidos grasos de cadena larga (estearato, palmitato, etc.): Bajo el nombre de E-473 y E-474, pertenecen al grupo de espesantes, emulsionantes y estabilizadores, si bien, en los últimos tiempos, se ha detectado que, bien por sí solos o combinados con otros conservantes químicos o biológicos, potencian el efecto inhibitorio de éstos (Kato y Arima, 1971; Hathcox1 y Beuchat, 1996). Están formados por la esterificación del ácido graso a una molécula de sacarosa por lo que se descomponen

fácilmente en el intestino y son metabolizados. Los diferentes sucroésteres (como también se les llama) se diferencian en el tipo de ácido graso con el que se forma el éster (se pueden emplear ácidos grasos con una longitud de cadena desde C8 a C22, si bien los más comunes son los C14 - C18) y en el grado de esterificación de los grupos hidroxilo de la sacarosa. El tipo de ácido graso determinará la presentación del producto (líquido, pasta o sólido en polvo). El grado de esterificación condiciona el carácter hidrófilo o lipófilo del sucroéster, de modo que un grado de sustitución bajo da lugar a productos hidrófilos, fácilmente absorbibles en el intestino y lo contrario determinaría productos no digeribles y eliminados por las heces. La ingesta diaria máxima recomendada es de 10 mg/K. Se utilizan como emulsionantes en la fabricación de margarinas, postres lácteos y helados; como lubricantes y modificadores de la viscosidad en chocolates, chicles y caramelos; como aireantes y estabilizantes de la espuma en helados, mousses y productos de pastelería; para reducir la sinéresis en los productos a base de almidón por interactuar con las moléculas de amilasa; en pastelería para retardar la cristalización del almidón alargando así la vida media del producto; como protección de las proteínas frente a la desnaturalización térmica en procesos de UHT o congelación; aquellos con un alto nivel de esterificación se usan como sustitutos de las grasas en alimentos ligeros, etc. (Boletín informativo, BDN, Food Tech., Octubre 1994). Su utilización en la industria alimentaria, según la directiva 95-2-CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de Febrero de 1995, referida a los aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes, establece su uso en una amplia gama de alimentos: café líquido enlatado, productos cárnicos tratados con calor, emulsiones de grasas para bollería, blanqueadores de bebidas, helados, postres, salsas, sopas y caldos, superficie de frutas frescas, bebidas no alcohólicas de varios tipos, bebidas espirituosas (con exclusión del vino y la cerveza), productos en polvo para la preparación de bebidas calientes, bebidas a base de productos lácteos, suplementos dietéticos, alimentos dietéticos destinados a fines médicos especiales, productos dietéticos para control del peso destinados a sustituir la ingesta diaria total o una comida aislada, chicle, sucedáneos de la nata, nata esterilizada con bajo contenido en materia grasa. Las concentraciones permitidas varían desde 2 hasta 20 g/L según el tipo de alimento.

Nitritos. Tanto la forma ácida como las sales se usan en productos cárnicos curados. Son más efectivos a bajos pHs. La concentración de nitrito usada en los productos

cárnicos está limitada a 156 ppm (mg/kg) para la mayoría de los productos y a 100-120 ppm en la panceta (Woods y Krieg, 1989).

Polifosfatos. Derivados de fosfatos, como pirofosfato sódico (SAPP), pirofosfato tetrasódico (TSP), tri-polifosfato sódico (STPP), tetrapolifosfato sódico, hexametafosfato sódico (SHMP), y fosfato trisódico (TSP) se consideran de grado alimentario. Tanto el tripolifosfato (STPP) como el hexametafosfato sódico (SHMP) pueden inhibir el crecimiento de *S. aureus* (Shelef y Seiter, 1993).

Cloruro sódico. Es la sustancia más utilizada entre todos los aditivos alimentarios. Inhibe el crecimiento de los microorganismos por su efecto plasmolítico. Un 13% de NaCl (equivalente a una a_w de 0,92) produce la inhibición de la mayoría de las bacterias; no obstante, *S. aureus* presenta una a_w mínima de 0,83 siendo un microorganismo halotolerante. Además de la influencia osmótica en el crecimiento de bacterias, el cloruro sódico ejerce otros posibles efectos tales como la limitación de la solubilidad del oxígeno, alteración del pH, intoxicación por iones sodio y cloruro, y pérdida de iones de magnesio (Banwart, 1979).

1.3.2.2. Conservantes químicos naturales

Son compuestos orgánicos naturales con actividad antimicrobiana que están presentes en diversos alimentos de origen animal: lactoperoxidasa, lactoferrina y otras proteínas captadoras de hierro, avidina, lisozima, o de origen vegetal: especias y aceites esenciales, alicina del ajo, isotiocianatos y compuestos fenólicos que se extraen de diversos órganos de las plantas (Doyle *et al.*, 1997).

1.3.3. Bioconservación

A pesar de todas las tecnologías existentes puestas al servicio de la conservación de alimentos, el control de las enfermedades transmitidas por los mismos sigue siendo un problema de gran importancia para las sociedades humanas.

Aún así, y como ya se ha comentado, en los países desarrollados hay una tendencia creciente por parte de los consumidores a demandar alimentos seguros pero, paradójicamente, mínimamente procesados y sin aditivos. Esto, unido a que ciertos alimentos pierden sus características organolépticas al ser sometidos a tratamientos

físicos o químicos y a que existen microorganismos capaces de superar los distintos tratamientos físicos o químicos aplicados a los alimentos, han provocado que, en los últimos años, la investigación en el campo de la conservación alimentaria esté volviendo sus ojos hacia los procesos de **bioconservación**.

De acuerdo con Stiles (1996) la bioconservación se puede definir como la extensión de la vida media y de la seguridad de los alimentos mediante el empleo de su microbiota natural o controlada y/o sus productos antibacterianos.

Los bioconservantes por excelencia son, sin lugar a duda, las bacterias del ácido láctico (BAL). La fermentación de alimentos debida a las BAL es, probablemente, después de la desecación, la forma de conservación más antigua.

El empleo seguro (no ligado en ningún caso a enfermedad o envenenamiento de los alimentos) de las BAL desde tiempo inmemorial les ha valido, en la actualidad el estatus de organismos GRAS (Generally Recognized As Safe: reconocidos en general como seguros). Hoy día su uso, ya programado, en las fermentaciones de alimentos, es aceptado por los consumidores como natural y saludable, representando una solución ecológica a la problemática de la conservación de los alimentos, sobre todo de aquellos mínimamente procesados.

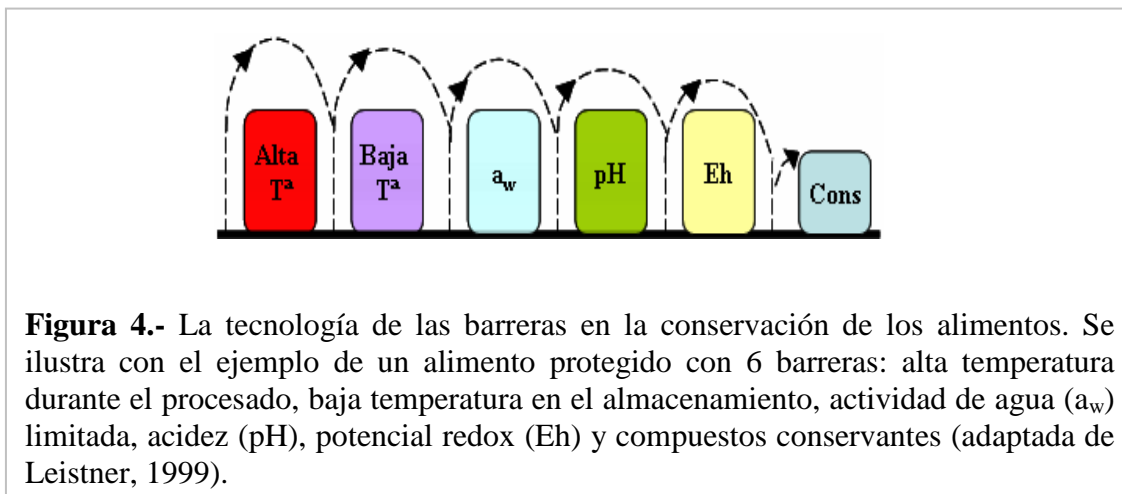
Volveremos sobre este aspecto más adelante, primero completemos esta visión general sobre las técnicas de conservación existentes y diversos aspectos relacionados con la aplicación racional y eficaz de las mismas.

1.3.4. La tecnología de las barreras en la conservación de alimentos

1.3.4.1. El concepto de efecto barrera y la tecnología de las barreras

La seguridad y estabilidad en la composición microbiológica así como en la calidad sensorial y nutricional de la mayoría de alimentos, se basa en la combinación de diversos factores de conservación llamados **barreras** (Leistner, 2000). El concepto de **efecto barrera**, en el que se basa esta tecnología, fue introducido por primera vez por Leistner en 1978. A partir del conocimiento, ya antiguo, de que las diversas y complejas interacciones de los diversos parámetros ambientales tales como temperatura, actividad de agua, pH, potencial redox, etc., son de gran importancia para la estabilidad microbiana de los alimentos, se desarrolló **la tecnología de las barreras**, encaminada a conseguir mejoras en la seguridad y calidad de los alimentos mediante el empleo de una

combinación deliberada e inteligente de tales barreras, de forma que actúen sinérgicamente. La base de esta tecnología es que la aplicación simultánea, a dosis moderadas, de varios factores que actúan a diferentes niveles, resulta mucho más eficaz que la aplicación de uno sólo, que actúa a un nivel, aunque se aplique a dosis muy alta (Leistner, 1999), no solo en lo que se refiere a la estabilidad y seguridad del alimento, sino también en lo tocante a sus cualidades sensoriales y a los costes, ya que requiere menos energía durante la producción y el almacenamiento.



Las principales barreras usadas para la conservación de alimentos son la temperatura (alta o baja), la actividad de agua, acidez, potencial redox, conservantes y diversos microorganismos competidores (bacterias del ácido láctico) (Leistner, 2000). Una misma barrera puede tener un efecto positivo o bien negativo sobre el alimento, dependiendo de su intensidad al ser aplicada, siendo necesario, por tanto, ajustar su aplicación de manera que las diferentes barreras se establezcan en su rango óptimo, considerando la seguridad y la calidad del alimento como un todo (Leistner, 1994a). No obstante, para cada alimento en particular, el tipo de barreras aplicables variará manteniendo, en cualquier caso, bajo control a la población “normal” de microorganismos de dicho alimento.

En los países industrializados la tecnología de las barreras tiene un gran interés sobre todo en la producción de alimentos escasamente procesados (calentados o fermentados moderadamente) y para extender la vida media y la seguridad de los nuevos alimentos llamados “saludables”, tales como son los que presentan bajo contenido en grasa y/o sal (Leistner, 1997). De igual forma es de aplicación en alimentos refrigerados en los que las bajas temperaturas son a menudo la única barrera,

ya que puede romperse, por ejemplo, durante la distribución del alimento, ocasionando la alteración y el envenenamiento del mismo. Por ello en tales alimentos es necesario incorporar controles adicionales, que actúen en lo que se podría llamar “tecnología invisible” (Leistner, 1999a), tal como ocurre con las BAL y sus compuestos. En los países en vías de desarrollo, en los que los alimentos frecuentemente se almacenan sin refrigerar, esta tecnología tendrá sin duda una importancia capital, ya que permitirá que los alimentos permanezcan estables, seguros y con las características organolépticas adecuadas (Leistner, 1999b).

Las diferentes barreras aplicadas en un alimento pueden tener no solo un efecto aditivo sobre la estabilidad microbiológica del mismo, sino que pueden actuar sinérgicamente si actúan simultáneamente sobre distintas dianas, ya sea la membrana celular, ADN, síntesis de enzimas, etc., del microorganismo alterante, afectando su homeostasis de alguna manera (Leistner, 2000).

1.3.4.2. Potenciales barreras en la conservación de alimentos

Las barreras empleadas en la conservación de alimentos, aplicadas bien como procesos o bien como aditivos son, según se ha mencionado más arriba:

- La temperatura (alta o baja).
- La actividad de agua, a_w (alta o baja).
- El pH (alto o bajo).
- El potencial redox, Eh (alto o bajo).
- La atmósfera modificada (nitrógeno, dióxido de carbono, oxígeno).
- El envasado (envasado aséptico, en atmósfera modificada o a vacío, recubrimiento comestible etc.).
- La presión (alta).
- La radiación (microondas, UV...).
- Otros procesos físicos (pulsos de alto voltaje, campo magnético oscilante, radiofrecuencia...).
- Los conservantes químicos (nitritos, sulfitos, ácidos orgánicos, compuestos naturales de origen vegetal y animal...).
- Microbiota competitiva (BAL) y sus compuestos antimicrobianos.

En la actualidad se está investigando extensamente sobre los procesos físicos no térmicos para ser usados en combinación con las barreras químicas convencionales y con las biológicas. Su uso puede conseguir la estabilización microbiana de los alimentos frescos, al reducir la carga microbiana de los mismos, sin alterar en gran medida sus cualidades nutricionales y sensoriales, siendo los microorganismos que persistan viables, inhibidos por otras barreras adicionales convencionales, como las bacteriocinas o los conservantes químicos.

Para aplicar de forma inteligente una combinación de las diferentes barreras en la producción de un alimento dado, incluidas las de tipo biológico, es necesario conocer las características del alimento, la microbiología predictiva del mismo y los puntos críticos de control. De esta forma se podrá graduar la intensidad y la calidad de las barreras para mejorar, no solo la estabilidad microbiana y la seguridad del mismo, sino también la calidad nutritiva y sensorial así como los costes del procesado. Así, es importante conocer si el contenido en agua del producto es compatible con su estabilidad, y si un incremento de la a_w puede ser compensado por otras barreras (pH, Eh etc.) que lo hagan más saludable y económico.

1.4. Microbiología predictiva

1.4.1. Concepto y objetivo de la microbiología predictiva

El concepto de microbiología predictiva supone que el conocimiento detallado de las respuestas de los microorganismos a las condiciones ambientales, permite una evaluación objetiva del efecto de las operaciones de procesado, distribución y almacenamiento sobre la calidad y seguridad microbiológica de los alimentos. Esto implica la obtención de modelos matemáticos que expliquen el comportamiento microbiano. La aplicación de estos modelos se hace a través de sistemas que recogen la información y la asocian a las condiciones medioambientales que experimentan los microorganismos en los distintos alimentos. Esto proporciona alternativas económicas a las técnicas de análisis tradicionales a la hora de estimar la vida media y seguridad del alimento (McMeekin *et al.*, 2002). Para ello es fundamental tener en cuenta parámetros tales como la temperatura, pH, concentración de sal y de los distintos conservantes, actividad del agua y atmósfera (aeróbica o anaeróbica) del alimento.

Dado que el crecimiento de las bacterias en el alimento incrementa el riesgo de una infección alimentaria, el objetivo principal de la microbiología predictiva es definir aquellas condiciones en las que no es posible el crecimiento (McMeekin *et al.*, 1997). Normalmente se desarrollan sobre cultivos de laboratorio formado de una mezcla de 4-6 cepas de los microorganismos bajo estudio, en los que se reproducen los mismos niveles de los factores ambientales que los que concurren en los alimentos y se sigue la evolución del cultivo 18-24 h. Así, se pueden establecer modelos para conocer el tiempo de muerte térmica de patógenos como *Listeria monocytogenes* o para conocer el tiempo de germinación-producción de toxina en el caso de *Clostridium botulinum*, lo que es de vital importancia.

El uso de estos modelos matemáticos permite una estimación inicial del comportamiento de los microorganismos. Sin embargo hay que considerarlos sólo como una de las muchas fuentes de información que debe manejar un microbiólogo. Es crítico que sean validados antes de que se les utilice como único instrumento para tomar decisiones sobre seguridad alimentaria. Para validarlos hay que comparar los datos obtenidos con ellos con los resultantes de inocular lotes de los alimentos específicos con los microorganismos. Y aún así hay que tomarlos con precauciones debido a la dificultad de estandarizar las condiciones que se dan en los alimentos.

1.4.2. Aplicaciones de la microbiología predictiva

La microbiología predictiva puede ayudar a:

- Predicción de la seguridad de los alimentos ya que puede estimar el riesgo de crecimiento o supervivencia de un patógeno después de un periodo de almacenamiento normal o de almacenamiento indebido.
- Control de calidad. Puede ayudar al desarrollo de programas de HACCP evidenciando cuales son las condiciones ambientales que permiten el crecimiento microbiano.
- Desarrollo de nuevos productos, ya que permite evaluar rápidamente las consecuencias que tienen los cambios en la composición y en el procesado de los alimentos sobre los microorganismos.
- Pero su principal aplicación, es, sin duda, predecir el comportamiento de los patógenos para verificar la probabilidad de que un alimento pueda causar enfermedad, para lo cual se debe disponer de información cuantitativa de los

números iniciales del patógeno en el alimento y de la dosis infectiva, entre otras cuestiones.

1.5. Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control

1.5.1. Concepto de Sistema de análisis de riesgos y de puntos de control críticos (HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Point System).

El Análisis de Riesgos y de Puntos de Control Críticos se fundamenta en un sistema lógico y estructurado que permite la detección y eliminación tempranas de riesgos específicos para los consumidores. Este concepto, no reemplaza las medidas de higiene tradicionales de Asepsia y Buenas Prácticas de Elaboración y Distribución (BPE), sino que más bien está basado en un concepto de higiene eficaz dentro de cualquier empresa (Untermann, 1999).

Aplicado a la producción de alimentos el sistema HACCP describe un sistema para identificar aquellos factores (riesgos) que introduzcan una probabilidad razonable de que el consumo de un alimento sea inseguro y llevar a cabo su control.

Se basa en una aplicación lógica de los principios técnicos y científicos al proceso entero de producción de los alimentos, desde la obtención de las materias primas hasta la mesa, evaluando los riesgos asociados con cada alimento en particular y empleando los resultados de la evaluación para desarrollar un plan dirigido a eliminar o reducir los riesgos hasta los niveles aceptables necesarios para producir un alimento seguro (Bernard, 1997).

1.5.2. Principios del HACCP

Según el Código Alimentario, se establecen siete principios que se deben seguir en el establecimiento de un sistema HACCP (FAO/WHO *Codex Alimentarius*, Comisión 1996).

Principio nº 1: Realizar un análisis de riesgos (HA). Preparar la lista de etapas en el proceso en las que puede ocurrir un riesgo significativo y describir las medidas preventivas.

Principio n° 2: Identificar los puntos críticos de control (CCP) del proceso. Un punto de control es cualquier punto, etapa o procedimiento en el que se pueda controlar cualquier factor, sea biológico, físico o químico, de manera que se prevenga (elimine o reduzca) el riesgo para la seguridad del alimento hasta niveles aceptables.

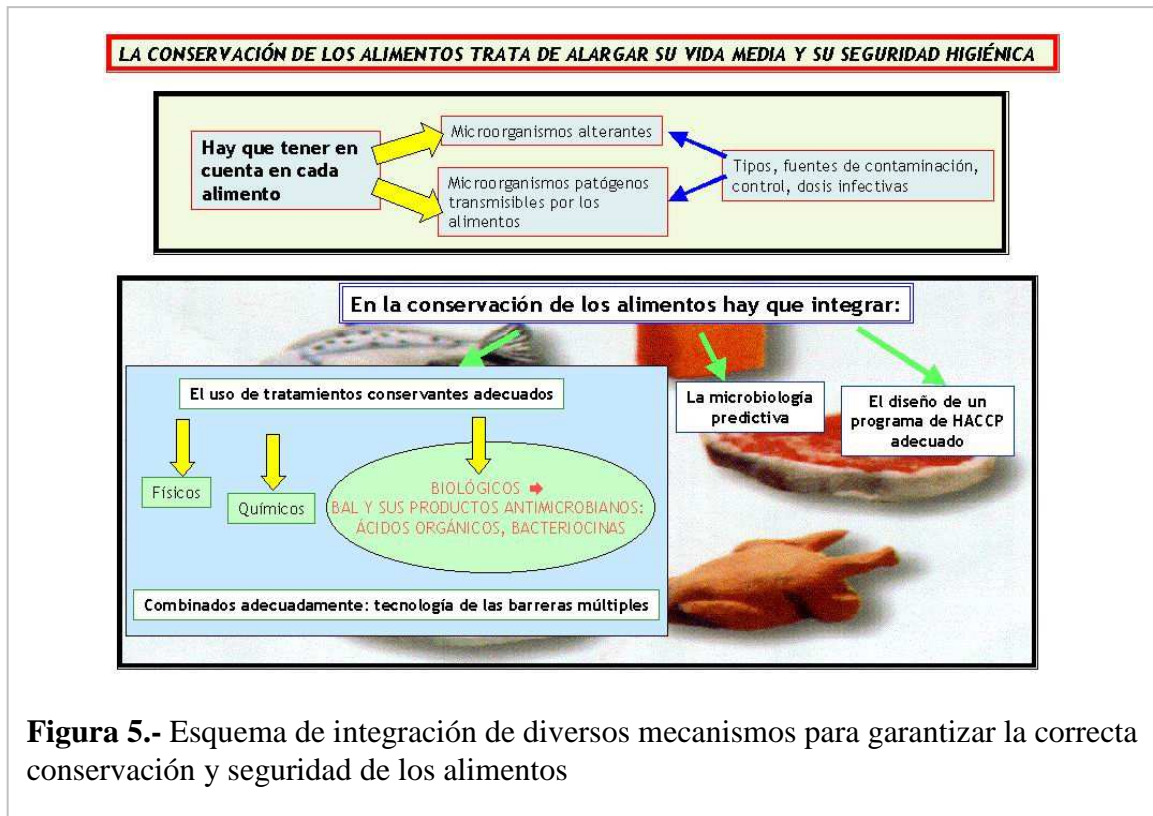
Principio n° 3: Establecer los límites críticos para las medidas preventivas asociadas con cada CCP identificado. El límite crítico es un valor que se establece para cada uno de los tratamientos físicos, químicos y biológicos que pueden ser aplicados para eliminar o reducir los riesgos asociados a un alimento en particular; puede ser considerado como la línea divisoria situada entre el tratamiento que da lugar a un producto aceptable y el que da lugar a uno inaceptable.

Principio n° 4: Establecer los requisitos para el seguimiento de los CCP. Establecer procedimientos para usar los resultados del seguimiento al objeto de ajustar el proceso y mantener el control. Se trata de llevar a cabo una secuencia planificada de observaciones o medidas (temperatura, pH, a_w) para verificar si un CCP está bajo control y usar la información obtenida para generar un registro correcto que pueda ser empleado en futuras comprobaciones.

Principio n° 5: Establecer una acción correctiva aplicable cuando el seguimiento indique que hay una desviación de uno de los límites críticos establecidos

Principio n° 6: Establecer procedimientos efectivos para almacenar los registros que documenten el sistema HACCP desarrollado.

Principio n° 7: Establecer procedimientos para verificar que el sistema HACCP está funcionando correctamente. Se puede hacer inoculando con un microorganismo simulador no patógeno que estadísticamente se haya demostrado que persistiría en un número suficiente de las unidades de producción del alimento en caso de error del sistema o llevando a cabo un programa de muestreo.



2. La conservación biológica de los alimentos

Como se ha dicho más arriba, la bioconservación se puede definir como la extensión de la vida media y de la seguridad de los alimentos mediante el empleo de su microbiota natural o controlada y/o sus productos antibacterianos. Una de las formas más usuales de bioconservación es la fermentación, proceso que podemos definir como la técnica de conservación de los alimentos que implica su transformación mediante la actividad de microorganismos presentes de forma natural en los mismos, o añadidos desde fuera, sobre todo bacterias del ácido láctico y también mohos y levaduras. Tal actividad determina la acumulación de ácidos orgánicos y de otros compuestos que confieren las características de olor, sabor y, también de seguridad alimentaria a estos productos.

Aunque los procesos de fermentación, eran ya utilizados hace miles de años como una técnica de conservación, no fue hasta el siglo XIX cuando se reconoció que eran los microorganismos presentes en el alimento los responsables de este proceso. Desde ese momento y hasta ahora se han ido descubriendo una serie de compuestos antimicrobianos responsables de la inhibición de la microbiota indeseable.

Tradicionalmente, un gran número de alimentos se han protegido de la alteración mediante procesos de fermentación natural, y este hecho, junto con el alto aprecio que las sociedades humanas antiguas y desde luego también las modernas, han tenido de las cualidades organolépticas y nutricionales que estas transformaciones aportan al alimento, han hecho muy populares los alimentos fermentados. Aunque en la mayoría de países en vías de desarrollo, los alimentos fermentados aún se obtienen siguiendo métodos tradicionales y, en ellos, este tipo de alimentos suelen constituir el 60 % de la dieta (Holzapfel *et al.*, 1995), la actual producción de alimentos a gran escala en los países industrializados explota el uso de sistemas definidos de microorganismos, conocidos como cultivos iniciadores, para asegurar la homogeneidad, calidad y seguridad del producto final.

2.1. Cultivos iniciadores y protectores

2.1.1 Cultivos iniciadores

Según Wigley (1999), los cultivos iniciadores pueden ser definidos como preparaciones de una o varias cepas de una o varias especies microbiológicas que inician el proceso de producción de un alimento, generalmente mediante fermentación. Históricamente, un cultivo iniciador era, simplemente una muestra del alimento fermentado que era utilizada en la siguiente elaboración del producto. Este tipo de actuación no siempre daba los resultados deseados por lo que hoy en día un proceso de fermentación tiene que ser predecible y consistente para asegurar la calidad del producto final. De ahí la gran importancia de los cultivos iniciadores comerciales en la actualidad.

Los cultivos iniciadores son utilizados fundamentalmente en la industria láctea, pero cada vez está más extendido su uso en la producción de otros alimentos fermentados tales como la carne, bebidas alcohólicas, productos vegetales y zumos. Las bacterias que se usan en la industria alimentaria son seleccionadas en virtud de sus propiedades sobre un tipo concreto de alimento. El metabolismo de este tipo de cultivos altera la composición química, física y biológica del alimento crudo, dando lugar a un producto con unas propiedades organolépticas atractivas para el consumidor.

Para que una cepa pueda ser considerada cultivo iniciador debe carecer de patogenicidad, no producir ningún tipo de sustancia que *per se* o tras su metabolismo

sea tóxica, debe ser genéticamente estable y su uso debe estar estandarizado y ser reproducible (Dass, 1999).

Actualmente, el desarrollo industrial de cultivos iniciadores está perfectamente regulado, las cepas utilizadas están estandarizadas e incluso en los últimos años se está trabajando en la selección y mejora de cepas mediante ingeniería genética. El proceso de producción de cultivos iniciadores comerciales incluye el crecimiento de las cepas en cultivos continuos que controlan en todo momento la proporción de cada cepa, la concentración de nutrientes, composición del medio y diversos factores tales como concentración de O₂ o CO₂, pH, etc., para lograr unas condiciones de producción totalmente estandarizadas. Una vez obtenidos los cultivos, son almacenados mediante diversas técnicas en una matriz láctea y posteriormente liofilizados. Los cultivos comerciales liofilizados son los más extendidos, se suelen suministrar en sobres de aluminio conteniendo un número dado de unidades de actividad, según una regla que refiere el número específico de unidades necesarias para la fermentación de 100 kg de alimento (Wigley, 1999).

Las bacterias del ácido láctico (BAL), son las responsables de la mayor parte de las fermentaciones conocidas por los humanos y la mayoría de sus representantes no suponen riesgo alguno para nosotros, y, si bien algunas especies pueden actuar como patógenos oportunistas (Aguirre y Collins, 1993; Adams, 1999), esto ocurre en contadas ocasiones. De todas formas, este posible riesgo para el ser humano no parece estar asociado con la presencia de estas BAL en el alimento.

Por otra parte, en una serie de alimentos, especialmente productos lácteos, el uso de cultivos iniciadores basados en las BAL, se cree que contribuye a los beneficios que sobre la salud presenta el producto, generalmente a través de la normalización del tracto gastrointestinal tras una enfermedad gástrica (Montville y Wikowski, 1997; Franz *et al.*, 1999).

2.1.2. Cultivos protectores

En ocasiones, se hace una distinción entre ambos tipos de cultivos, aunque en realidad se trata del mismo cultivo utilizado para distintos propósitos y bajo condiciones diferentes. En un cultivo iniciador, la actividad metabólica, como por ejemplo la producción de ácidos en el queso, tiene una gran importancia tecnológica, mientras que

la actividad antimicrobiana sería un factor secundario; para un cultivo protector, sin embargo, los objetivos son los contrarios.

Los cultivos protectores deberían ser considerados siempre como un factor de seguridad adicional y su implantación debe permitir la reducción del riesgo de crecimiento y supervivencia de microorganismos patógenos (Holzapfel *et al.*, 1995).

Lo ideal sería, por tanto, desarrollar cultivos en los cuales tanto la actividad metabólica como la actividad antimicrobiana sobre el alimento tuviesen el mismo peso.

2.2. Las Bacterias del Ácido Láctico

Las bacterias del ácido láctico (BAL) incluyen un grupo filogenéticamente diverso de géneros de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, cocos o bacilos, que presentan en su ADN un porcentaje de G+C menor del 55%, y fermentan los hidratos de carbono dando ácido láctico como producto único (homofermentadoras) o mayoritario (heterofermentadoras).

Las BAL ocupan muchos nichos ecológicos existentes en ciertos alimentos, la boca y el tracto gastrointestinal y urogenital de humanos y animales. También se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas, dominando en la microbiota fermentadora de ensilados y forrajes.

Las bacterias del ácido láctico (BAL), que incluyen los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Adams, 1999), juegan un papel esencial en las fermentaciones de alimentos de cuya microbiota son una parte importante y habitual siendo por tanto consideradas de grado alimentario y reconocidas con el *estatus* GRAS (Generally Recognised as Safe). Existe además una amplia variedad de cepas de BAL que son empleadas rutinariamente como cultivos iniciadores en la fabricación de derivados lácteos, cárnicos y encurtidos. La contribución más importante de estos microorganismos en el alimento es que, conservando sus cualidades nutritivas, aumentan la vida media del producto e inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos (O'Sullivan *et al.*, 2002). Esto se debe a la competencia por los nutrientes entre los distintos microorganismos del alimento y la presencia de sustancias inhibitoras producidas por los cultivos iniciadores, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Ray, 1992). Existen

numerosos trabajos sobre la inhibición de la alteración del alimento y del desarrollo de bacterias patógenas por las BAL, que han llevado a la identificación y caracterización de numerosas bacteriocinas producidas por estas bacterias (Nettles y Barefoot, 1993; Klaenhammer, 1993; Jack *et al.*, 1995; Cleveland *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002), muchas de las cuales tienen un uso potencial en la industria alimentaria. Dada la frecuencia con la que se aíslan estas BAL productoras de bacteriocinas de los diferentes alimentos, parece claro que las mismas han sido consumidas durante décadas sin representar riesgos para la salud por lo que su introducción como cultivos iniciadores no debería suponer problema alguno para los consumidores (Kelly *et al.*, 1996).

Entre las propiedades fisiológicas de este grupo de bacterias destacan algunas de aplicación tecnológica, como son: la resistencia a bacteriófagos (importante problema a la hora de obtener cultivos iniciadores (Wigley, 1999), su actividad proteolítica (importante en la curación del queso), fermentación de lactosa y citratos (responsables del aroma de numerosos productos frescos), producción de polisacáridos (importantes al conferir textura a determinados alimentos), su alta resistencia a la congelación y liofilización (importante en la conservación de fermentos comerciales como ya se ha indicado), su capacidad de adhesión a la mucosa digestiva (de ahí uno de sus usos como probióticos) y la producción de sustancias antimicrobianas (con acción preventiva de intoxicaciones alimentarias).

2.3. Bacteriocinas de las BAL

El término bacteriocina ha sufrido varias definiciones desde que Gratia descubrió en 1925 las colicinas. Actualmente, la definición más aceptada es la de Tagg (1992) y Jack *et al.*, (1995): “productos de síntesis ribosómica, bien primarios o modificados, que son secretados extracelularmente y presentan un espectro de acción bactericida relativamente estrecho.” En general, las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas, tales como las BAL, a diferencia de aquellas producidas por las Gram negativas, presentan un espectro antimicrobiano mucho más amplio, que afecta incluso a géneros taxonómicamente no relacionados (Tagg *et al.*, 1976; Jack *et al.*, 1995). El extenso conocimiento sobre muchas de las bacteriocinas de las BAL, junto con el estatus GRAS de que gozan las bacterias productoras, son bazas a favor de su empleo como conservantes biológicos para proteger los alimentos los procesados.

Hay que señalar que aunque el uso deliberado de las bacteriocinas fue formalmente propuesto por Hirsch en 1951, es lógico pensar que, aunque inconscientemente, la humanidad se ha estado aprovechando de sus efectos beneficiosos en la seguridad de los alimentos en los 8000 años de historia de los alimentos fermentados (Cotter *et al.*, 2005). Actualmente además, en el contexto de la tecnología de las barreras, las cepas productoras de bacteriocinas pueden ser utilizadas en los alimentos fermentados como un mecanismo de inmunidad innata que facilite el uso de otras barreras.

Las bacteriocinas producidas por las BAL presentan una serie de características que las convierten en candidatos adecuados para ser usadas como conservantes de alimentos, tales como el presentar:

- Naturaleza proteica, que hace que sean inactivadas por los enzimas proteolíticos del tracto gastrointestinal.
- Una aparente ausencia de toxicidad y escasa inmunogenicidad en animales de experimentación.
- Falta de actividad frente a eucariotas.
- Una general termorresistencia (sobre todo las bacteriocinas de pequeño tamaño) lo que determina que conserven la actividad antimicrobiana tras ser sometidas a temperaturas similares a las de pasteurización y esterilización de la leche y otros alimentos.
- Un amplio espectro antimicrobiano, siendo activas a bajas concentraciones (generalmente inferiores a 10 ppm) frente a la mayoría de las bacterias Gram-positivas patógenas, toxicogénicas o alterantes, más frecuentes en los alimentos. En determinados casos se ha demostrado que dicha actividad también se extiende a bacterias Gram negativas dañadas subletalmente por los tratamientos térmicos o por la presencia de agentes quelantes.
- En la mayoría de los casos, los determinantes genéticos se encuentran localizados en plásmidos, lo que facilita su manipulación genética y la obtención de cepas mejorables genéticamente. Asimismo, la posibilidad de manipulación mediante ingeniería genética incrementa potencialmente la variedad de análogos de péptidos naturales que pueden ser diseñados con las características deseables.

2.3.1. Clasificación de bacteriocinas de las BAL

Atendiendo a sus características estructurales y de actividad biológica, Klaenhammer (1993), estableció cuatro clases de bacteriocinas dentro de las BAL, de las que actualmente se mantienen tres. La existencia de la cuarta clase de bacteriocinas, moléculas complejas, compuestas de proteína más otros componentes (lípidos, carbohidratos), ha sido descartada con posterioridad, ya que muchas bacteriocinas tienden a formar agregados con componentes celulares así como del medio (Nes *et al.*, 1996).

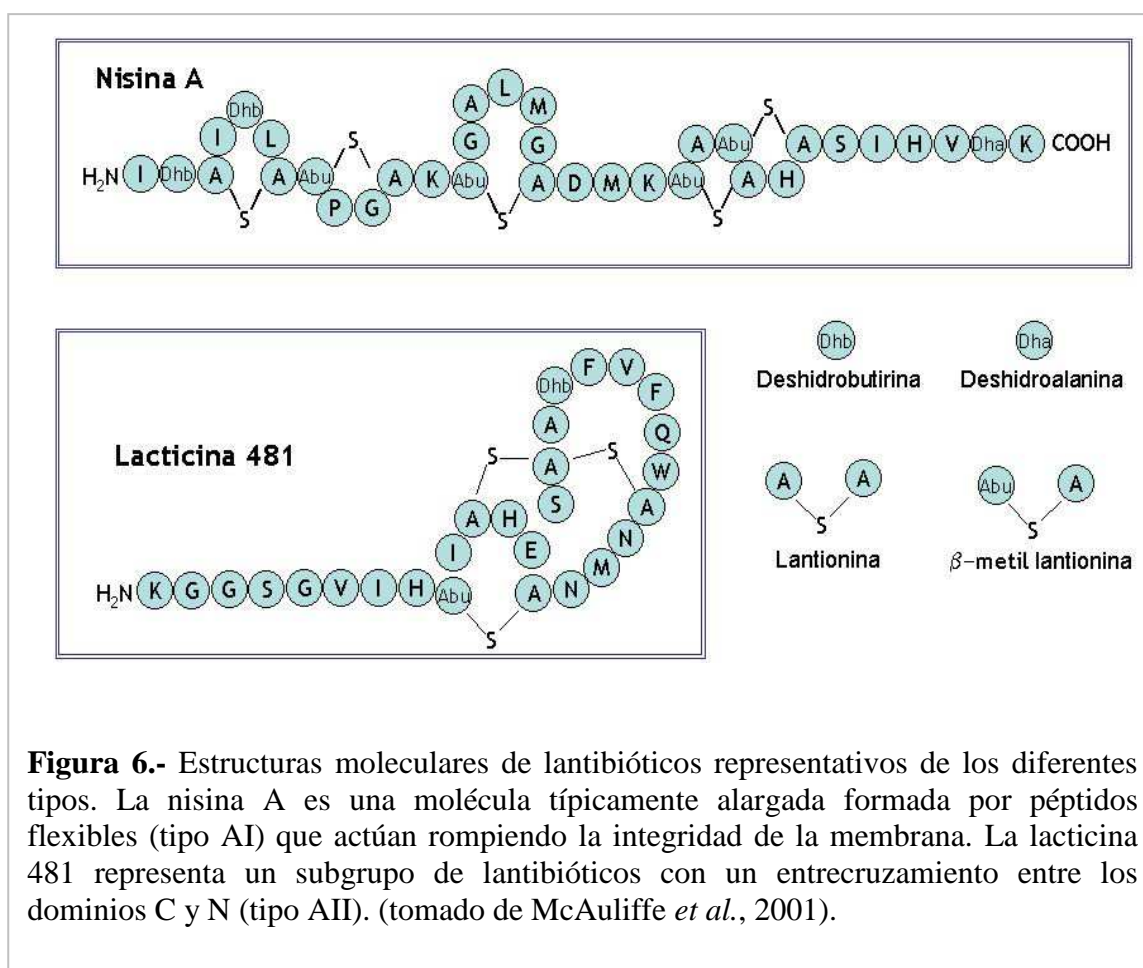
Clase I. Lantibióticos.

Clase II. Pequeños péptidos no lantibióticos, estables al calor.

Clase III. Proteínas termolábiles.

El descubrimiento y la caracterización de nuevas bacteriocinas ha impuesto modificaciones notables en la clasificación de Klaenhammer (Nes *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1999; Van Belkum y Stiles, 2000; Cleveland *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002; Ross *et al.*, 2002). Actualmente podemos hablar de tres grupos distintos o clases de bacteriocinas con varias subclases, siendo sin lugar a dudas la más variada y conflictiva la clase II:

Clase I.- Lantibióticos. Se trata de pequeños péptidos hidrófobos (<5 kDa), de síntesis ribosómica, singulares estructuralmente por su contenido en aminoácidos modificados, tales como lantionina, metil-lantionina, dideshidroalanina y dideshidrobutirina (Sahl *et al.*, 1995). Son altamente termoestables y actúan a nivel de membrana celular. Los lantibióticos han sido encontrados exclusivamente en bacterias Gram-positivas (McAuliffe *et al.*, 2001).



El prototipo de lantibiótico es la nisina, producida por *L. lactis* subsp. *lactis* (Rogers, 1928; Mattick y Hurst, 1944). Existen otros ejemplos de lantibióticos como la lacticina 481 de *L. lactis* (Piard *et al.*, 1993), la citolisina producida por *E. faecalis* con actividad bactericida-hemolítica (Gilmore *et al.*, 1990), la lacticina 3147 de *L. lactis* (Ryan *et al.*, 1999), y la estafilococina C55 de *Staphylococcus aureus* (Navaratna *et al.*, 1998). Jung en 1992 propuso la creación de dos subgrupos, tipo A (con dos subtipos AI y AII) y tipo B en base a características estructurales y funcionales.

Clase II.- Pequeños péptidos no-lantibióticos (<10 kDa). En esta categoría se incluye una serie de de péptidos termoestables anfipáticos mínimamente modificados, con variadas características genéticas y químicas que se caracterizan, además, por presentar un sitio de procesamiento Gly-Gly⁻¹-Xaa⁺¹ en el péptido inmaduro que ha de ser roto para dar lugar a la bacteriocina madura. Se encuentra tanto en bacterias Gram-positivas como en *E. coli* (colicina V y microcina 24) (Fath *et al.*, 1994; Håvarstein *et al.*, 1994; O'Brian y Mahanty, 1996), entre ellas se incluyen la pediocina PA-1/AcH producida por cepas del género *Pediococcus* (Henderson *et al.*, 1992; Lozano *et al.*,

1992). Al igual que la mayoría de las restantes bacteriocinas, presentan actividad a nivel de membrana (Bruno y Montville, 1993), en la que ocasionan la apertura de poros a través de los cuales se produce la pérdida de electrolitos; esto desencadena desequilibrio iónico y lisis de las células sensibles.

Se han propuesto varios subgrupos dentro de esta clase de bacteriocinas (Nes *et al.*, 1996; Van Belkum y Stiles, 2000 y Diep y Nes, 2002), pero su naturaleza heterogénea hace que una inclusión en una única clase sea complicada, estando basada la subclasificación, en general, en la presencia del motivo YGNGVXC cerca del extremo amino y en la presencia de residuos de cisteína conducentes a la formación de puentes -S-S-.

En cualquier caso en todos los sistemas de clasificación se admiten dos subgrupos: la clase IIa (bacteriocinas de la familia de la pediocina y con actividad anti *Listeria*) y la clase IIb (bacteriocinas formadas por dos péptidos).

Clase IIa: Incluye bacteriocinas que poseen el motivo YGNGVXC. Presentan un espectro de actividad estrecho pero presentan una alta actividad específica contra *L. monocytogenes*. Son ejemplos la pediocina PA-1/AcH del género *Pediococcus* (Henderson *et al.*, 1992; Lozano *et al.*, 1992), sakacina A (Holck *et al.*, 1992), y la enterocina A (Aymerich *et al.*, 1996).

Clase IIb: Bacteriocinas heterodiméricas, que requieren la actividad combinada de dos péptidos (α y β) y presentan un mecanismo de acción que implica la disipación del potencial de membrana, pérdida de iones y/o disminución de las concentraciones intracelulares de ATP (Garneau *et al.*, 2002). Ejemplos de esta clase son: la lactococcina G de *L. lactis* (Nissen-Mayer *et al.*, 1992), la lactacina F de *L. johnsonii* (Allison *et al.*, 1993), y las plantaricina EF y JK de *L. plantarum* (Anderssen *et al.*, 1998).

Van Belkum y Stiles (2000) subdividen la clase II en 6 subgrupos y Cotter *et al.* (2005) proponen dos subgrupos más aparte de los 2 arriba mencionados, clases IIc y IId, que serían:

Clase IIc: Las bacteriocinas pertenecientes a esta clase se agrupan sobre la base de presentar la unión covalente de sus extremos C y N, dando lugar a una estructura cíclica. Si bien hay pocas bacteriocinas cíclicas descritas, los autores proponen dos subdivisiones en esta clase en base al porcentaje de similitud en la secuencia de aminoácidos, la subclase *c(i)*, que comprende la enterocina AS-48 y la circularina A (no perteneciente a las bacteriocinas de las LAB) y la subclase *c(ii)*, que comprende la gasericina A, reutericina 6, la butirivibriocina AR10 (no perteneciente a las

bacteriocinas de las LAB) y, aunque aún no se ha determinado su estructura circular, la acidocina B.

Clase IIId: incluiría el resto de pequeñas bacteriocinas no lantibióticos formadas por un único péptido linear, sin homología con la pediocina. Algunos autores subdividen este grupo en función de sus secuencias líder. Como ejemplo, existen bacteriocinas que carecen de éste péptido líder: enterocinas L50A y L50B producidas por *E. faecium* (Cintas *et al.*, 1998) y la enterocina EJ97 producida por *E. faecalis* (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2003).

Clase III.- Grandes proteínas (>30 kDa) termolábiles. Se trata de bacteriocinas complejas en cuanto a su actividad y/o su estructura proteica. Como ejemplo cabe citar la helveticina J producida por una cepa de *L. helveticus* (Joerger y Klaenhammer, 1986), la bacteriocina Bc-48 producida por *E. faecalis* (López-Lara *et al.*, 1991) y la enterolisina de *E. faecium* (Nilsson, 1999). Actualmente este grupo también puede encontrarse bajo la denominación de bacteriolisinas y se desaconseja su inclusión entre las bacteriocinas (Cotter *et al.*, 2005).

Recientemente (Maqueda *et al.*, 2004) hemos propuesto la creación de clase IV de bacteriocinas de las BAL para incluir las de naturaleza cíclica, ya que este rasgo estructural se considera de suficiente entidad como para definir una nueva clase.

Las bacteriocinas mejor estudiadas de las BAL son las de las clases I y II, posiblemente debido a que al ser termorresistentes son más adecuadas para ser usadas en conservación de alimentos.

2.3.2. Aplicación de las bacteriocinas de las BAL en alimentos

Las estrategias seguidas para la aplicación de las bacteriocinas de las BAL en la conservación de alimentos son diversas.

- Inoculación del alimento con las BAL (como cultivos iniciadores o adjuntos a estos) para que produzcan las bacteriocinas *in situ*.
- Utilización del producto previamente fermentado con la cepa productora de la bacteriocina, como ingrediente en el procesado de alimentos. Dichos preparados tienen la ventaja de que pueden ser reconocidos más fácilmente que otros aditivos, como seguros (GRAS) para su uso directo en alimentos (NisaplinTM, MicrogardTM, AltaTM 2341).

- Adición de las bacteriocinas purificadas o semipurificadas. Este método permite aplicar dosis más exactas de la bacteriocina, y por tanto predecir mejor los resultados. Como contrapartida, la bacteriocinas purificadas son consideradas como aditivos, requiriendo autorización expresa para su uso (Fields, 1996).

2.3.2.1. Requisitos generales y aspectos reglamentarios del uso de una bacteriocina como bioconservante

Las aplicaciones potenciales de las bacteriocinas en alimentos se ven limitadas por sus propiedades individuales, como son el espectro de inhibición, su estabilidad al calor, solubilidad, etc. En general, para que una bacteriocina pueda ser aplicada en alimentos debe cumplir los siguientes requisitos (Holzapfel *et al.*, 1995):

- La cepa productora debe tener estatus GRAS
- La bacteriocina debe presentar un amplio espectro de inhibición frente a los principales patógenos transmitidos por alimentos o ser altamente específica sobre alguno de ellos
- La bacteriocina debe ser termoestable
- No debe presentar riesgo alguno para la salud
- Tener efectos beneficiosos sobre el producto, mejorando su seguridad, y no afectando a su calidad nutricional y propiedades organolépticas

Yang y Ray en 1994 establecieron que para que una bacteriocina sea aceptada como aditivo alimentario debe de haber pasado por una serie de estudios en los que se haya establecido:

- El espectro inhibidor
- Las características bioquímicas y genéticas de la cepa productora y de la bacteriocina
- La sensibilidad de la bacteriocina a los cambios de pH y temperatura
- Los factores que afectan su producción
- El proceso de purificación
- El coste de la adición de la bacteriocina a los alimentos

Es obvio que para que la adición de bacteriocinas a los alimentos sea efectiva, éstas deben conservar sus propiedades bajo los tratamientos que reciba dicho alimento. Para

ello es necesario establecer el comportamiento de las mismas en relación a los siguientes parámetros:

- Sensibilidad al pH: la industria alimentaria demanda bacteriocinas que sean estables a pHs neutros porque una gran variedad de bacterias patógenas se desarrollan en estas condiciones y la mayoría de los alimentos que requieren conservantes poseen pHs próximos a la neutralidad.
- Sensibilidad a proteasas: dada su naturaleza proteica, la mayoría de las bacteriocinas son sensibles a estas enzimas, lo que facilita su degradación una vez que son ingeridas evitándose así que lleguen a ocasionar trastornos intestinales.
- Tolerancia al calor: una de las características de las bacteriocinas producidas por las BAL es su tolerancia al calor, por lo que no sufren alteraciones con los tratamientos térmicos que se aplican a ciertos alimentos.

2.3.2.2. Factores que limitan la eficacia de las bacteriocinas en los alimentos

No obstante, la producción y eficacia de las bacteriocinas de las BAL puede verse limitada por varios factores que deben ser tenidos en cuenta a la hora de abordar el estudio de la aplicación potencial de cualquier bacteriocina:

En relación a la **producción** (Daeschel, 1993)

- Que el ambiente (pH, temperatura, nutrientes, etc.) sea inadecuado para su producción en el alimento.
- Que ocurra la pérdida espontánea de la capacidad productora de bacteriocina.
- Que la cepa productora sea inactivada por infección por fagos.
- Que la cepa productora sufra antagonismo por otros microorganismos presentes en los alimentos.

En relación a la **eficacia** (Schillinger *et al.*, 1996)

- Que se desarrollen patógenos o bacterias deterioradoras resistentes a la bacteriocina.
- Que concurren condiciones que desestabilicen su actividad biológica.

- Que se adhiera a los componentes de los alimentos tales como las partículas de grasa.
- Que sea inactivada o antagonizada por otros aditivos.
- Que sea poco soluble y/o se distribuya irregularmente en la matriz del alimento.
- Que el pH del alimento tenga efecto negativo sobre la estabilidad, la solubilidad y la actividad de la bacteriocina.

2.3.2.3. Producción industrial de bacteriocinas

Lactosueros como medio de producción

Para que la producción de bacteriocinas pueda considerarse útil a nivel industrial, es fundamental que el sustrato de crecimiento de las cepas productoras para la producción de bacteriocinas sea de grado alimentario y de bajo coste. Con este objetivo, es cada vez más frecuente la utilización de subproductos de la industria láctea como medio de crecimiento y producción alternativo a los medios de cultivo habituales, suministrados por casas comerciales. Fundamentalmente se utilizan lactosueros y lactalbúminas productos de desecho en las queserías.

El lactosuero es el subproducto líquido generado tras el proceso de cuajado en la fabricación del queso y la lactalbúmina es un subproducto obtenido a partir de éste, que al ser rico en lactosa, constituye un medio de crecimiento idóneo para las BAL. Estos productos resultan muy económicos y por otro lado, al ser utilizados como medio de crecimiento, se soslaya el problema ambiental que supone su eliminación. El lactosuero se ha empleado como medio de crecimiento y producción de pediocina (Pérez Guerra *et al.*, 2005), mutacina (Nicolas *et al.*, 2004), nisina (Liu *et al.*, 2004), una bacteriocina producida por *B. licheniformis* P40 (Cladera – Olivera *et al.*, 2004) o lacticina 3147 (Morgan *et al.*, 2001).

Concentración de la actividad

Para obtener preparaciones ricas en bacteriocina es necesario aplicar mecanismos que permitan concentrar la actividad antimicrobiana de los cultivos. La desecación de las preparaciones en cuanto que permita una mayor estabilización de la mismas es también un objetivo a alcanzar.

Actualmente los mecanismos que se perfilan como idóneos para estos fines serían:

- *Ultrafiltración*, proceso de filtración tangencial que permitiría la obtención de concentrados de bacteriocina a partir de un cultivo de BAL mediante el empleo de una membrana de tamaño medio de poro menor que el de la bacteriocina. Esta aplicación es aún muy reciente y se ha empleado en la concentración de proteínas de lactosuero (Atra *et al.*, 2005; Akoum *et al.*, 2005), o la purificación de la halocina C8 (Li *et al.*, 2003), a partir de medios de cultivo específicos para bacterias halófilas. En este caso los cultivos (3,8 L) al comienzo de la fase estacionaria se sometieron a centrifugación y los sobrenadantes obtenidos fueron sometidos a filtración tangencial, en un primer paso a través de una membrana de 50 kDa, se recuperó el 60 % de la actividad bacteriocinogénica. En el proceso de concentración, hasta un volumen final de 15 ml, se logró recuperar el 40 % de la actividad total.
- *Secado por electrospray*, este último ya aplicado a nivel industrial para la producción de bacteriocinas y que permite tras un proceso de evaporación que aumenta el contenido en sólidos del medio, liofilizar la muestra deseada, obteniendo un sustrato en polvo con muy poco contenido en células y muy activo que puede almacenarse durante varios meses. Mediante este procedimiento se han obtenido preparados activos de lacticina 3147 (Morgan *et al.*, 1999, 2001) patentada en los EE.UU con el número 6833150, preparado activo en la mezcla de las bacteriocinas producidas por *Lb. sakei*, *Lb. salivarius* y *Carnobacterium divergens* (Silva *et al.*, 2002) o de varias cepas de lactococos y lactobacilos a partir de cultivos en leche desnatada o lactosuero (Mauriello *et al.*, 1999).
- Intercambio iónico. Dado el carácter mayoritariamente catiónico de las bacteriocinas de las BAL el método de elección empleado para purificar un gran número de bacteriocinas ha sido su adsorción sobre matrices de intercambio catiónico y posterior elución a partir de las mismas. Ejemplos de esto son la enterocina AS-48, purificada mediante intercambio iónico por CM25 (Abriouel *et al.*, 2003), la enterocina P, purificada mediante intercambio catiónico en geles de sefarosa (Gutiérrez *et al.*, 2005), la enterocina F-58, mediante CM25 (Achemchem *et al.*, 2005), enterocinas A y B, mediante sefarosa

(Ennahar *et al.*, 2001), etc. También se ha acoplado este proceso al de ultrafiltración para lograr un grado de purificación mayor de la bacteriocina, tal es el caso de la halocina C8 (Li *et al.*, 2003).

2.3.2.4. Bacteriocinas de las BAL ensayadas para mejorar la seguridad alimentaria

Hasta la fecha la única bacteriocina cuyo uso alimentario está licenciado es la nisina (E-234). En 1969 un comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud dio el visto bueno al uso de esta bacteriocina en los alimentos al considerarla segura. En la actualidad posee el *status* GRAS en más de 45 países y es usada en derivados lácteos, cárnicos y vegetales, lo que permite eliminar o reducir los nitratos en ellos y aplicar tratamientos térmicos moderados y de ahí mejorar en el valor nutricional, aroma, textura y aspecto, además de ahorrar energía (Anónimo, 1969; Anónimo, 1988; Turtell y Delves-Broughton, 1998; Ross *et al.*, 2002).

Respecto a otras bacteriocinas, la nisina posee un espectro de acción, en general más amplio, que afecta a la mayoría de las bacterias Gram-positivas, incluyendo las patógenas transmitidas por alimentos tales como *L. monocytogenes* (Benkerroum y Sandine, 1988; Harris *et al.*, 1989) y *Clostridium* (Montville *et al.*, 1992). Aunque las bacterias Gram-negativas no son sensibles a la nisina, éstas se sensibilizan tras una permeabilización de su membrana externa mediante tratamiento con compuestos quelantes o por choque osmótico (Steven *et al.*, 1991; Hernández *et al.*, 1993) entre otros.

Las aplicaciones de la nisina como conservador de alimentos enlatados, productos cárnicos, vegetales fermentados, así como leche y derivados lácteos han sido recopiladas en diversas ocasiones (Delves-Broughton, 1990; Delves-Broughton *et al.*, 1996; Turtell y Delves-Broughton, 1998; Thomas *et al.*, 2000; Thomas y Delves-Broughton, 2001; Ross *et al.*, 2002). Los usos y concentraciones permitidas varían dependiendo del país. En España solo está permitido su uso en quesos madurados a una concentración máxima de 12,5 mg/Kg pero, por el contrario, en Australia se emplea en quesos, tomates y sopas enlatados, puré, pastas, cerveza, sin límite de cantidad y en molletes, panqueques (tortas de avena) y piquillos para el té a una concentración máxima permitida de 250 mg/Kg (Turtell y Delves-Broughton, 1998). Danisco Cultor, la empresa que comercializa actualmente una de las preparaciones comerciales más

usadas de la nisina, Nisaplin™, ha verificado experimentalmente muchas de sus aplicaciones en sistemas alimentarios: queso y derivados lácteos pasteurizados (Delves-Broughton, 1990), vegetales enlatados (Delves-Broughton, 1990), productos de panadería de alta humedad (molletes) (Jenson *et al.*, 1994) ovoproductos líquidos pasteurizados (Delves-Broughton *et al.*, 1992), embutidos (Davies *et al.*, 1999). Recientemente se ha comprobado su eficacia para controlar a *Alicyclobacillus acidoterrestris*, bacteria ácidotolerante y termorresistente, responsable de la alteración de los zumos de frutas pasteurizados (Komitopoulou *et al.*, 1999). Además diversos investigadores han comprobado la efectividad de la nisina y/o cepas productoras de nisina para: prevenir la formación del efecto de hinchado en los quesos (Hirsch *et al.*, 1951), inhibir a *Listeria* en quesos tipo Camembert (Sulzer y Busse, 1991; Maisnier-Patin *et al.*, 1992), cottage (Ferreira y Lund, 1966; Benkerroum y Sandine, 1988), ricotta (Davies *et al.*, 1997) y Manchego (Núñez *et al.*, 1997), controlar las bacterias del ácido láctico alterantes en bebidas alcohólicas, cerveza (Ogden y Tubb, 1985) y en vino (Radler, 1990 a,b). Se ha empleado también en el envasado antimicrobiano de productos cárnicos (jamón, pechuga de pavo, o ternera) incluyéndola en películas y recubrimientos comestibles hechos de silicona o celulosa (Daeschel *et al.*, 1992; Ming *et al.*, 1997). Nuevos objetivos de esta bacteriocina son *B. sporothermodurans*, que causa alteraciones en centrales de leche UHT y *Brochothrix thermofacta* que causa deterioro en carnes y pescados y que han mostrado ser sensibles a ella (Thomas y Delves-Broughton, 2001).

La actividad de la nisina en los sistemas alimentarios, al igual que ocurre con otras bacteriocinas, depende mucho de las características de los alimentos. Uno de los principales factores que limitan la efectividad de las bacteriocinas hidrofóbicas es el contenido de los alimentos en grasas. Esto ha sido comprobado mediante su ensayo frente a *L. monocytogenes* en leche (Jung *et al.*, 1992). Por otra parte aunque la nisina posee un espectro antimicrobiano muy amplio frente a bacterias Gram-positivas, no es activa frente a muchos microorganismos alterantes y patógenos de interés (Hernández *et al.*, 1993). El empleo de la nisina o del preparado comercial Nisaplin™ está dificultado por varios factores, como es la baja solubilidad y estabilidad de dicha molécula a pH neutro o alcalino, que limita su uso a alimentos de pH ácido (Rollema *et al.*, 1995) o el hecho de que interacciona fuertemente con los fosfolípidos, lo que limita su utilización en alimentos con emulsificantes, y, finalmente, el que el microorganismo productor no se desarrolla adecuadamente en substratos no lácteos (Hernández *et al.*, 1993). Otros

problemas destacados del uso de la nisina como bioconservante es la existencia de cepas resistentes a su acción y la modificación del sabor de los alimentos (Davies *et al.*, 1996; Song y Richard, 1997). Esto hace que su aplicación esté limitada y que sea necesaria la búsqueda de otras bacteriocinas que puedan ser usadas en sustitución a conjuntamente con la nisina.

Otro candidato para ser aplicado en la industria cárnica es la pediocina AcH (PA-1) producida por *P. acidilactici*. Durante la fermentación del salchichón, sola o en combinación con el diacetato, muestra actividad frente a *L. monocytogenes* y *L. curvatus* (Nielsen *et al.*, 1990). La aplicación de la pediocina PA-1 (2,400 UA/g) durante la preparación de pollos cocidos redujo los niveles de listerias 5,3 unidades logarítmicas respecto a un control sin pediocina después de 28 días de almacenamiento a 5°C (Goff *et al.*, 1996). Tanto en la fabricación de yogures como de ensaladas, la adición de la pediocina aumenta la vida útil de los productos (Vedamuthu *et al.*, 1992; Cleveland *et al.*, 2001). También se ha ensayado con éxito en diversos tipos de embutidos para controlar a *L. monocytogenes* (Berry *et al.*, 1991; Foegeding *et al.*, 1992; Luchansky *et al.*, 1992; Baccus-Taylor *et al.*, 1993). También se han empleado cepas de *L. lactis* productoras de pediocina AcH como cultivos iniciadores en la fabricación de queso Cheddar, consiguiendo una reducción en los recuentos de *L. monocytogenes* hasta 10^2 ufc/g en una semana (Buyong *et al.*, 1998). Asimismo la pulverización de un cultivo de *L. plantarum* productor de esta pediocina sobre la superficie de queso Munster suprimió el crecimiento de *L. monocytogenes* en los 11 primeros días de la maduración, haciéndola desaparecer por completo el día 21 (Ennahar *et al.*, 1998). Sin embargo su aplicación como aditivo no está permitida por el momento. La pediocina ha sido también incorporada con éxito a películas de celulosa usadas como recubrimiento en productos cárnicos para controlar a *L. monocytogenes* (Ming *et al.*, 1997). Por último, la expresión del operón responsable de la pediocina en *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado efectiva en la conservación de vinos y de productos de pastelería (Schoeman *et al.*, 1999).

También es de interés la lacticina 3147, producida por *L. lactis* que muestra capacidad para reducir hasta 10 veces el nivel de las bacterias lácticas no deseadas responsables de las alteraciones del sabor y la formación de cristales durante la fabricación de los quesos Cheddar (Ryan, 1996, Ross *et al.*, 2002). Igualmente se ha ensayado la eficacia de cepas productoras para controlar a *L. monocytogenes* en queso

cottage, encontrándose que producen una reducción del 99,9% en 5 días a 4 °C (McAuliffe *et al.*, 1999). Asimismo se ha probado el buen funcionamiento de una preparación de polvo de lactosuero conteniendo lacticina 3147 en yogur, queso cottage y sopa, en el control de *L. monocytogenes* y de *B. cereus* (Morgan *et al.*, 2001).

Otras diversas bacteriocinas han sido ensayadas, aunque no tan extensamente, en alimentos. Tales son los ensayos de control de *L. monocytogenes* por piscicolina 126 en queso Camembert (Wan *et al.*, 1997), enterocina AS-48 de *E. faecalis* INIA 4 en leche y queso Manchego (Rodríguez *et al.*, 1997; Núñez, *et al.*, 1997), lactocina 705 en carne (Vignolo *et al.*, 1996), enterocina EFM01 en queso de pasta blanda (Richard, 2000) o los de *L. monocytogenes* y *S. aureus* por la enterocina CCM 4231 en productos lácteos (Lauková *et al.*, 1999 a,b). También se ha verificado que la leucocina A de *L. gelidum*, controla el crecimiento de *L. sakei* en productos cárnicos conservados al vacío (Leistner *et al.*, 1996), que la lactocina 705 controla a *L. monocytogenes* en carne de vacuno (Vingolo *et al.*, 1996), que una cepa de *Brevibacterium lines*, productora de la linocina M-18, utilizada como cultivo iniciador en la fabricación de quesos rojos de untar permite la reducción de 2 unidades logarítmicas de *L. ivanovi* y *L. monocytogenes* (Eppert *et al.*, 1997). Otras bacteriocinas de posible interés aplicado son las enterocinas A y B, empleadas frente a *L. monocytogenes* en diferentes condiciones y productos cárnicos (Aymerich *et al.*, 2000 a,b).

Recientemente se ha comprobado el efecto inhibitor sobre *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* O157:H7 en queso de diversas cepas productoras de pediocina (Rodríguez *et al.*, 2005) añadidas como cultivos adjuntos; también frente a *L. monocytogenes* se ha ensayado el efecto de una cepa de *Carnobacterium piscicola* productora de bacteriocina en diversos jugos de pescado que ha mostrado resultados prometedores para su posterior aplicación en sistemas alimentarios reales (Alves *et al.*, 2005), y en salami, se ha ensayado la actividad de las cepas productoras de plantaricina 423 y curvacina DF 126 frente a *L. monocytogenes* (Dicks *et al.*, 2004).

La enterocina AS-48 se ha ensayado con éxito en el control de *B. cereus* en distintos tipos de alimentos, tales como queso (Muñoz *et al.*, 2004), arroz (Grande *et al.*, 2006), en el control de *S. aureus* en salchichón (Ananou *et al.*, 2005) y quesos (Muñoz *et al.*, enviado para publicación), frente a *L. monocytogenes* en quesos (en preparación), en salchichas (Ananou *et al.*, 2005b), en verduras (Molinos *et al.*, 2005) y frente a otras bacterias en zumos de fruta (Ananou *et al.*, 2005c; Grande *et al.*, 2005).

2.3.2.5. Las bacteriocinas en la tecnología de las barreras

Además del uso en solitario de las bacteriocinas, a veces muy discutible por su limitada eficacia, en la actualidad existe un gran interés en la búsqueda de combinaciones de ellas que actúen de forma sinérgica frente a bacterias patógenas en alimentos, y también en la aplicación coordinada de bacteriocinas y tratamientos físicos y químicos moderados, que amplíen, además, su espectro de acción a bacterias Gram-negativas. Existen numerosos ejemplos de aplicaciones fructíferas de bacteriocinas combinadas con otras barreras:

- La nisina ha sido aplicada en combinación con numerosos tratamientos para inhibir diversos patógenos: para inhibir *B. cereus* combinada con carvacrol (Periago y Moezelaar, 2001), para inhibir *L. monocytogenes*, conjuntamente con el sistema lactoperoxidasa (Boussouel *et al.*, 2000), en combinación con EDTA y otras barreras para inhibir diversos patógenos (Alexander *et al.*, 2003, Hill y Holey, 2000), etc.
- Se ha referido la sinergia entre la APH y varias bacteriocinas: nisina, pediocina, enterocinas A y B, sakacina K para controlar la proliferación de patógenos como *L. monocytogenes* (Garriga *et al.*, 2002).
- La enterocina AS-48 ha sido utilizada en combinación con tratamientos físico químicos permeabilizantes de la membrana externa para inhibir *S. aureus* en medios de cultivo de laboratorio (Ananou *et al.*, 2004) y también a *E. coli* O157:H7 en zumo de manzana (Ananou *et al.*, 2005c).
- Las altas presiones también han sido combinadas con diversas cepas productoras de las bacteriocinas AS-48, lacticina 481, nisina A, bacteriocina TAB 57 y enterocina 1, para inhibir el crecimiento de *E. coli* en quesos (Rodríguez *et al.*, 2005).

3. La enterocina AS-48

Los primeros datos sobre la enterocina AS-48 fueron publicados por Gálvez *et al.* en 1985, dentro de un estudio acerca de la producción de sustancias tipo bacteriocina en el género *Enterococcus*. La cepa productora de AS-48, identificada como *Enterococcus faecalis* subsp *liquefaciens* S-48, produce además una segunda bacteriocina de alto Pm

(80 kDa), denominada Bc-48 perteneciente a la Clase III, codificada en el plásmido pMB1 que tiene un espectro de acción bastante limitado (López-Lara *et al.*, 1991). Poco después, mediante tratamientos clásicos de curación de plásmidos (bajas concentraciones de anaranjado de acridina y bromuro de etidio), se obtuvo en nuestro laboratorio el mutante A-48-32, que sólo produce la enterocina AS-48 (Martínez-Bueno *et al.*, 1990).

Dentro de las BAL y cada vez con mayor frecuencia, hemos visto cómo una misma bacteriocina puede ser producida por distintas cepas o incluso por diferentes especies bacterianas. Se trata en realidad de variantes naturales con pequeñas diferencias en cuanto a la composición aminoacídica, los niveles de producción o incluso el espectro de inhibición de las mismas (Maqueda *et al.*, 1998). Este ha sido también el caso de la enterocina AS-48 publicada bajo diferentes nombres, como la enterococina EFS2, producida por una cepa de *E. faecalis* aislada de una muestra de corteza de queso (Maisnier-Patin *et al.*, 1996), la enterocina 4 (Joosten *et al.*, 1996) y la bacteriocina 21 (Tomita *et al.*, 1997). Por último la producción de AS-48 también ha sido recientemente referida en las cepa 7C5 (Folli *et al.*, 2003) y RJ16 (Abriouel *et al.*, 2005) de *E. faecium*.

3.1 Características bioquímicas de AS-48

La producción de AS-48 tiene lugar en diversos tipos de medios, tanto sólidos como líquidos, desde el comienzo de la fase exponencial de crecimiento indicando que se trata de un metabolito primario (Gálvez *et al.*, 1986). Se trata de una molécula de naturaleza exclusivamente peptídica, y por tanto sensible a diversas endopeptidasas (tripsina, proteinasa K o proteasa V-8), no obstante, su carácter circular le confiere resistencia a las exopeptidasas. Es muy estable y activa en un amplio intervalo de pH (3 a 9) (Gálvez *et al.*, 1986; Abriouel *et al.*, 1998) y muy resistente al calor (Abriouel *et al.*, 2001). El análisis de su composición en aminoácidos muestra, además de la ausencia de cisteína o de aminoácidos modificados propios de los lantibióticos, una alta proporción de aminoácidos básicos, lo que explica su carácter fuertemente catiónico (pI = 10,5). Además contiene una gran cantidad de residuos hidrófobos (Ala, Pro, Val, Met, Ile, Leu y Phe) e hidrofílicos sin carga neta (Ser, Gly, Thr, y Tyr) lo que le confiere un carácter anfifílico (Gálvez *et al.*, 1989a)

Se ha establecido la estructura primaria de AS-48 (Fig. 7A) y también su masa molecular (7149,25) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Este valor se corresponde exactamente con el calculado sumando la masa de los diferentes residuos de AS-48, disminuída en una molécula de agua que se libera durante la formación de la unión peptídica cabeza-cola, responsable de la ciclación de la molécula. Tal hipótesis ha sido confirmada confrontando los resultados de la secuenciación del gen estructural de AS-48 (Martínez Bueno *et al.*, 1994) con los de la secuencia aminoacídica de los fragmentos obtenidos mediante digestión del péptido con las endoproteinasas Glu-C y Lys-C (Samyn *et al.*, 1994). Fue el primer ejemplo de modificación postraduccional de un péptido, los residuos situados en ambos extremos, Met1 y Trp70, tras la separación del péptido señal.

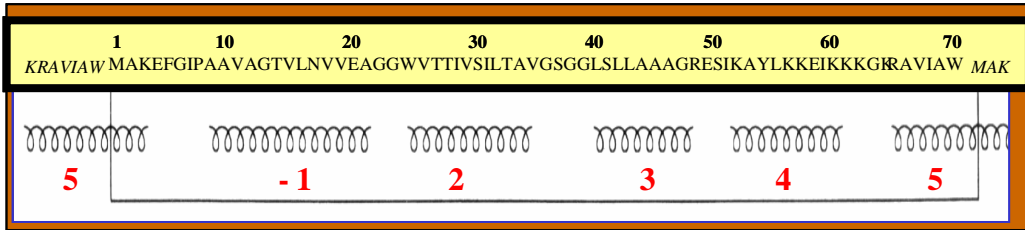
Recientemente se ha realizado un estudio de resonancia de protones (^1H RMN) de AS-48 en solución acuosa, cuyos resultados han permitido establecer la estructura secundaria de este péptido (Fig. 7A) (Langdon *et al.*, 1998), requisito imprescindible para la resolución de su estructura tridimensional. AS-48 se encuentra plegada en cinco hélices α de acuerdo con la topología indicada en la Fig. 7B. Las cinco hélices corresponden a los residuos Ala9-Ala21 (α -1), Val25-Ala34 (α -2), Ser37-Ala45 (α -3), Ile51-Lys62 (α -4) y Lys64-Phe5 (α -5) que se encuentran conectadas por cortas regiones de giro. Esta organización da lugar a una fuerte acumulación de cargas positivas en una zona superficial de la proteína, lo que se considera determinante de su actividad formadora de poros en las membranas bacterianas (González *et al.*, 2000).

La estructura global de AS-48 aparece muy compacta, con las cadenas laterales hidrofóbicas de las hélices α formando el corazón de la proteína (Fig. 7B). Sin embargo resultados obtenidos en el análisis de cristales de AS-48 con Rayos X han permitido comprobar que se trata de una molécula flexible capaz de adaptar su estructura molecular a las condiciones ambientales (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003). Se ha podido también comprobar que la molécula adopta dos formas diméricas: (Fig. 7C) abreviadas como DF-I y DF-II que pueden explicar el mecanismo de inserción en membrana descrito para esta bacteriocina (Sánchez-Barrena *et al.*, 2003; Maqueda *et al.*, 2004).

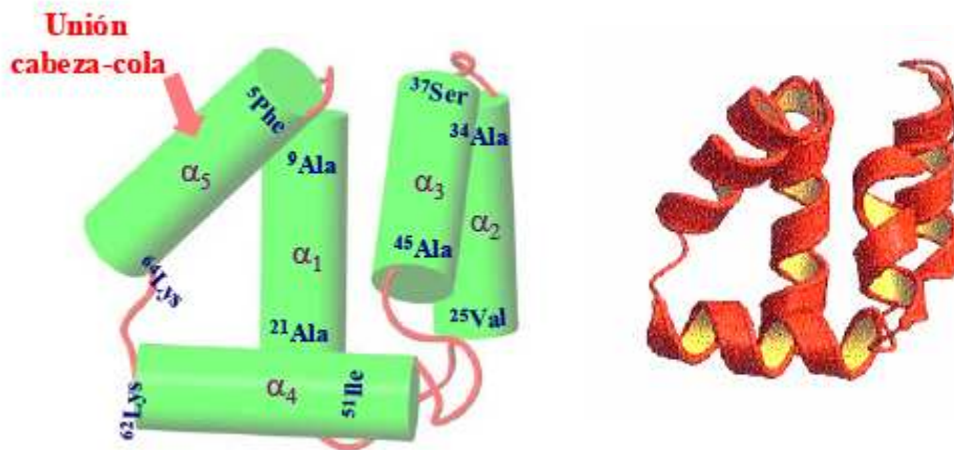
Es un hecho indiscutible que la ciclación confiere una gran estabilidad a la molécula como lo demuestran los resultados obtenidos en un estudio sobre la desnaturalización térmica de AS-48, que requiere temperaturas superiores a los 102 °C (Cobos *et al.*, 2001). A ello se une la distribución asimétrica de las cargas en superficie, que parece importante para desempeñar su función biológica, y la unión cabeza-cola que se

produce en mitad de la 5ª hélice α , factores todos ellos que tienen un profundo efecto en la estabilidad de la estructura tridimensional de AS-48. Ello permite explicar las condiciones extremas en las que se produce el desplegamiento de la molécula, que requiere altas concentraciones de guanidina ($> 7M$). Los estudios cinéticos del desplegamiento-replegamiento de la proteína, muestran que se trata de una de las proteínas globulares con mayor velocidad de plegamiento descrita hasta ahora, recuperando la conformación original al restablecerse las condiciones iniciales. Este hecho, de nuevo está relacionado con el bajo coste entrópico de este proceso, debido a la circularización de la cadena polipeptídica (Cobos *et al.*, 2002).

A) Estructura primaria y secundaria



B) Estructura terciaria



C) Formas diméricas

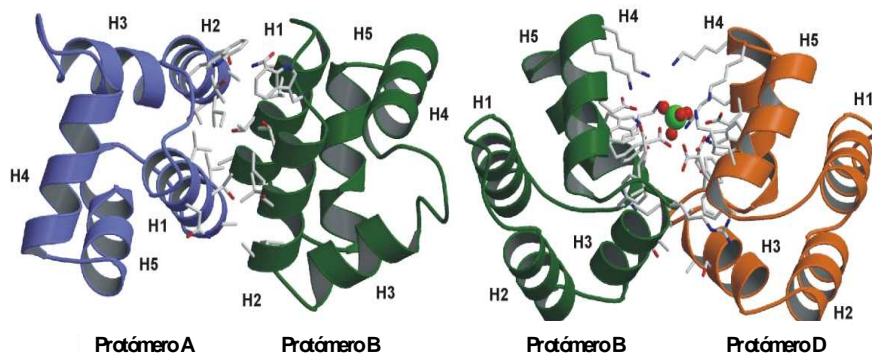


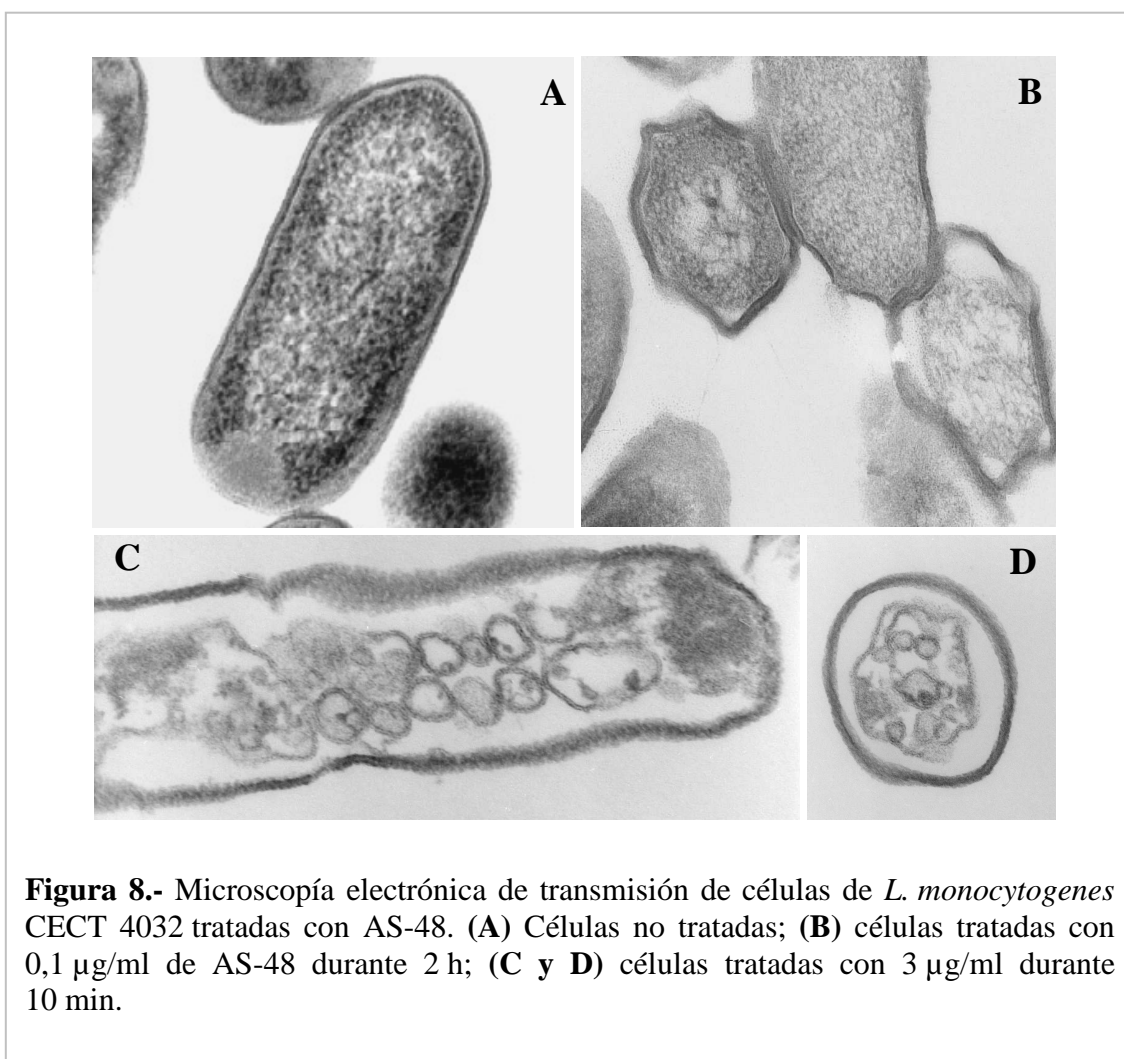
Figura 7.- Estructura de la enterocina AS-48

3.2 Actividad biológica y mecanismo de acción de AS-48

AS-48 presenta actividad bactericida sobre la mayoría de las bacterias Gram positivas ensayadas, siendo especialmente sensibles las estirpes de *Enterococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Planococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Nocardia*. Estos tres últimos géneros, que tienen en común la presencia de ácido micólico en la pared celular están entre los que presentan mayor sensibilidad. Tal vez la incrementada naturaleza hidrofóbica de esta estructura facilita la unión y el acceso de la molécula AS-48 a su diana celular (Gálvez, 1987; Gálvez *et al.*, 1989). Aunque AS-48 afecta también a diversas especies de bacterias Gram-negativas, éstas son mucho menos sensibles debido al efecto protector que les proporciona la membrana externa (Gálvez *et al.*, 1989b; Abriouel *et al.*, 1998). En general, AS-48 no muestra actividad frente a la mayoría de los organismos eucariotas ensayados, tales como las levaduras *Candida albicans*, y *Saccharomyces cerevisiae*, las amebas de vida libre, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba*, eritrocitos y las líneas celulares Hela y MCDK. Dentro de este amplio espectro de acción, es interesante destacar la sensibilidad que muestran bacterias patógenas transmitidas por alimentos y/o alterantes de los mismos, entre las que destacan *Listeria monocytogenes* (Mendoza *et al.*, 1999), *Bacillus cereus* (Muñoz *et al.*, 2004) y *Staphylococcus aureus* (Ananou *et al.*, 2004). Muchas otras cepas, *a priori* resistentes, se vuelven sensibles cuando se emplean tratamientos combinados, como es el caso de *S. choleraesuis* (Abriouel *et al.*, 1998) y de *E. coli* O157:H7 (Ananou *et al.*, 2005c).

El modo de acción de AS-48 se ha establecido investigando su efecto sobre bacterias intactas, así como sobre protoplastos y vesículas de membrana (Gálvez *et al.*, 1989a, 1989b, 1991). La diana celular primaria de AS-48 es la membrana citoplasmática, y su adición a células sensibles determina el cese inmediato de la captación de precursores y la pérdida de la capacidad para mantener los niveles citoplasmáticos de sodio y potasio. Como consecuencia de la permeabilización de la membrana celular, se produce un rápido colapso del potencial de membrana. AS-48 actúa también sobre liposomas de fosfatidilcolina, en los que provoca la libre y rápida difusión de pequeñas moléculas (uridina o rubidio), y también la de solutos de mayor tamaño (dextrano), en los que tratamientos algo más prolongados producen la fusión de las bicapas dando lugar a agregados multilamelares (Gálvez *et al.*, 1991). El estudio en profundidad del mecanismo de acción de AS-48 se ha abordado analizando su efecto

sobre la conductividad de bicapas lipídicas planas. La adición de AS-48 a bajas concentraciones desencadena una serie de señales eléctricas que se corresponden con la apertura de canales cuyo diámetro podría ser estimado de forma muy aproximada en 0,7 nm (Gálvez *et al.*, 1991). Este mecanismo de acción permitiría la despolarización celular y la difusión de solutos de bajo peso molecular, disipando el potencial de la membrana y volviendo así a la célula inviable. Como efecto secundario, en una gran parte de las bacterias ensayadas se observa también un descenso en la densidad óptica de los cultivos, debida a la lisis celular (Gálvez, 1987; Gálvez *et al.*, 1989b). En *E. faecalis*, dicha acción es dependiente de iones Mg^{2+} , siendo atribuible a la actividad de las autolisinas presentes en la pared. Tras los daños letales ocasionados a nivel de membrana se produciría la activación de las autolisinas, encargadas de digerir la pared celular (Gálvez *et al.*, 1990).



Empleando la balanza de Langmuir, ha sido posible la formación de monocapas puras o mixtas de AS-48, lo que nos ha permitido llevar a cabo un estudio sobre el tipo de interacción que AS-48 pueda establecer con algunos componentes de la membrana citoplasmática. De esta forma se ha podido comprobar que la principal interacción que se produce entre AS-48 y el ácido dipalmitoil fosfatídico (ácido graso mayoritario en la membrana de los enterococos) es de tipo electrostático, ya que ocurre cuando el lípido está más cargado y el péptido más desplegado (pH 10,5) (Abriouel *et al.*, 2001). Ello podría explicar el notable incremento de actividad de AS-48 a pH 9 frente a bacterias Gram-negativas (Abriouel, 2000).

Sus especiales características de resistencia a temperatura, actividad en un amplio intervalo de pH, y actividad frente a numerosos patógenos transmitidos por alimentos, la convierten en una candidata idónea para su aplicación como bioconservante en alimentos. De hecho ya ha sido demostrada su eficacia en sistemas alimentarios, bien aplicada en solitario en productos cárnicos para controlar a *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Ananou *et al.*, 2005a, 2005b) y en diversos alimentos de origen vegetal para controlar a *Alycyclobacillus acidoterrestris*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*, (Grande *et al.*, 2005; Cobo Molinos *et al.*, 2005; Grande *et al.*, 2006) como en combinación con otras barreras en zumo de manzana para controlar a *E. coli* (Ananou *et al.*, 2005c).

3.3. Determinantes genéticos de AS-48: resistencia y producción

El carácter AS-48 (producción e inmunidad) está codificado por un plásmido conjugativo de 68 Kb denominado pMB2, que es responsable tanto de la producción del péptido como de la resistencia frente al mismo (Martínez-Bueno *et al.*, 1990).

Los estudios moleculares realizados han permitido identificar en pMB2 al gen estructural, *as-48A* (Martínez-Bueno *et al.*, 1994) y una serie de 9 genes situados corriente debajo de éste, *as-48B*, *as-48C*, *as-48C1*, *as-48D*, *as-48D1*, *as-48E*, *as-48F*, *as-48G* y *as-48H*, como los determinantes genéticos responsables de la expresión del carácter AS-48 en enterococos (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Díaz, 1999; Díaz *et al.*, 2003). La extensa región genética *as-48*, ha sido clonada y expresada en pAM401, un plásmido bifuncional para *Enterococcus-E. coli*.

Los primeros estudios moleculares realizados nos permitieron identificar el determinante *as-48D1*, que codifica un pequeño péptido de 56 aminoácidos fuertemente hidrófobo, como el gen responsable de la inmunidad (Martínez-Bueno *et al.*, 1998). Sin

embargo no se puede descartar la implicación de otros productos identificados en la región genética *as-48*, que aumentan la resistencia frente a AS-48 administrado de manera exógena.

El mecanismo de secreción de AS-48 ha sido asignado a las proteínas As-48C1D que constituyen un sistema de exporte de tipo ABC, de acuerdo con el análisis de homología llevado a cabo con proteínas bien caracterizadas de las bases de datos. Si bien los resultados obtenidos con mutantes de inserción han demostrado que As-48B también es imprescindible para la producción de AS-48. Parece pues concluyente que las proteínas As-48B junto a As-48C1D, asociadas o no, son las encargadas de la secreción y/o maduración de AS-48 (Martínez-Bueno *et al.*, 1998).

Sin embargo, en la región genética *as-48* hay dos transportadores de tipo ABC, la bomba *as-48C₁D* responsable del exporte de las moléculas de bacteriocina sintetizadas por la célula, que le confiere bajos niveles de inmunidad, pero que en ningún caso puede ser sustituida por la presencia de un segundo transportador, *as-48EFGH*, mas bien relacionado con la capacidad de resistencia de la cepas productora, frente a AS-48 administrado de manera exógena, manteniendo la concentración de moléculas por debajo del nivel crítico necesario para dañar la membrana (formación de poros) (Díaz, 1999; Díaz *et al.*, 2003).

La existencia de estos dos sistemas de tipo ABC descrita en esta y otras bacteriocinas de las BAL puede representar un mecanismo de resistencia que se ha conservado durante la evolución, por conferir funciones de secreción y/o protección, actuando, probablemente de forma cooperativa con la proteína de la inmunidad

El seguimiento de la expresión de *as-48* llevado a cabo mediante análisis de transcripción, ha permitido comprobar que la región *as-48* está organizada en dos operones de expresión constitutiva (*as-48ABC* y *as-48C1DD1EFGH*) aunque un ARNm para el gen estructural *as-48A* es fácilmente detectable gracias a un procesamiento del primer transcrito (T_{ABC}) (Fernández *et al.*, 2006) Además se ha comprobado que los cuatro últimos genes, *as-48EFGH*, pueden transcribirse de forma independiente cuando los niveles de As-48C1D y As-48D1 son adecuados y suficientes en la célula (Martínez-Bueno *et al.*, 1998, Díaz *et al.*, 2003).

La caracterización de la región genética *as-48* es un paso previo y esencial para desarrollar el potencial tecnológico de AS-48 en la industria de los alimentos, en la que su aplicación probablemente pueda complementar la acción de otras bacteriocinas actualmente en uso. En la actualidad se trabaja en desarrollar una cepa de grado

alimentario que pueda ser empleada en alimentos sin despertar recelos en los consumidores. En un primer paso se ha introducido el plásmido pAM401-81E5, que contiene la región genética *as-48* completa en la cepa UJ32 de *E. faecium* aislada de queso y carente de determinantes de virulencia. Esta cepa expresa la producción y la inmunidad a la bacteriocina en niveles similares a los de la cepa salvaje (Rodríguez Fernández, 2004).

OBJETIVOS

Los objetivos prioritarios de esta Memoria de Tesis Doctoral eran, de un lado abaratar los costes de producción de la bacteriocina AS-48 utilizando subproductos de la industria láctea, y, de otro, evaluar su potencial como bioconservante en alimentos.

Para ello era necesario estudiar los distintos factores que influyen en la producción de AS-48, empleando lactosuero y productos derivados como medio de cultivo base, y establecer las condiciones óptimas de recuperación de la bacteriocina a escala semipreparativa.

Para evaluar su potencial uso como bioconservante en alimentos lácteos y cárnicos era preciso ensayar la actividad de AS-48, producido *in situ* o *ex situ*, sobre microorganismos patógenos y alterantes, comúnmente encontrados en alimentos, estudiando cuando fuera posible el efecto de AS-48 sobre las características físico químicas de los productos tratados y su persistencia en el alimento.

Los resultados globales, permitirán evaluar la viabilidad de la aplicación de AS-48 como bioconservante en este tipo de alimentos, y su capacidad para alargar la vida media de los mismos y/o permitir el empleo de tratamientos físicos o químicos más suaves para su conservación, así como de procesos más controlados para su elaboración.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Microorganismos

1.1. Cepas bacterianas empleadas

Las características más relevantes de las cepas empleadas en este trabajo así como sus respectivas procedencias y referencias son detalladas en la Tabla 1. *Enterococcus faecalis* A-48-32, *E. faecalis* EFS2 y *E. faecium* 34-81 han sido utilizadas como cepas productoras de enterocina AS-48. Para detectar y valorar la actividad inhibidora de AS-48 en medio sólido se emplearon las siguientes cepas indicadoras, *E. faecalis* S-47, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HP, *Listeria innocua* CECT 4030 y *L. monocytogenes* LO28H. Las cepas patógenas o alterantes enfrentadas a la acción inhibidora de AS-48 en alimentos han sido *Bacillus cereus* LWL1, *L. monocytogenes* CECT 4032, *Staphylococcus aureus* CECT 976, *Salmonella cholerasuis* LT2, y *Brochotrix thermophacta* CECT 847.

En la fabricación del queso se emplearon fermentos lácticos liofilizados comerciales (ref. EZAL MA 4001), como cultivos iniciadores.

Cepa	Características Relevantes	Procedencia	Referencia
<i>Enterococcus faecalis</i> A-48-32	Productora de AS-48, <i>E. faecalis</i> S-48 tratada con naranja de acridina	Nuestra colección	Martínez-Bueno <i>et al.</i> , 1990
<i>Enterococcus faecalis</i> EFS 2	Productora de AS-48	Superficie de queso tradicional	Maisnier-Patin <i>et al.</i> , 1996
<i>Enterococcus faecium</i> 34-81	Productora de AS-48 <i>E. faecium</i> 34(pAM 401-81E5)	Nuestra colección	Fernández, 2004
<i>Enterococcus faecalis</i> S-47	Indicadora	Nuestra colección	Gálvez <i>et al.</i> , 1985
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> HP	Indicadora	Colección Moorepark, Cork, Irlanda	
<i>Listeria innocua</i> CECT 4030	Indicadora	CECT	
<i>Listeria monocytogenes</i> LO28H	Indicadora	Colección Moorepark, Cork, Irlanda	

Tabla 1.- Características de las cepas empleadas en este trabajo.

Cepa	Características Relevantes	Procedencia	Referencia
<i>Bacillus cereus</i> LWL1	Psicrotrofica, productora de enterotoxina diarreaica	Dr. F.M. van Leusden. Microbiological Lab. for Health Protection, Natl. Inst. Publ. Health and Environ., Holanda	Dufrenne <i>et al.</i> , 1994
<i>Staphylococcus aureus</i> 976	Productora de enterotoxina estafilocócica A. Implicada en envenenamiento de alimentos cárnicos	CECT	
<i>Salmonella choleraesuis</i> LT2		Nuestra colección	
<i>Listeria monocytogenes</i> 4032	Aislada de un caso de meningitis asociado a ingesta de queso	CECT	
<i>Brochotrix thermosphacta</i> 847	Aislada de salchichas frescas de cerdo alteradas	CECT	
Cultivos iniciadores para la fabricación de queso	Fermentos lácticos comerciales mesofílicos	Rhodia Food, Dangé Saint Romain, Francia	EZAL MA 4001

Tabla 1.- Continuación

1.2. Conservación de las bacterias

Las cepas bacterianas empleadas en este trabajo fueron conservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a partir de cultivos líquidos en fase logarítmica de crecimiento adicionados de glicerol al 50 %, para evitar la pérdida de caracteres genéticos durante las sucesivas resiembras.

2. Medios de cultivo

2.1. Medios generales de crecimiento

La composición de los medios utilizados, a menos que se indique lo contrario, se expresa en gramos por litro de agua o tampón (fosfato monosódico-disódico 0,1 M, pH 7,2). Se adicionaron de agar al 1,5% cuando fue preciso emplear medios sólidos. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos excepto la leche que se calentó a 120 °C durante 3 minutos. Los diferentes medios de cultivo fueron suministrados por Sharlab (Barcelona), excepto los lactosueros: Lacprodán (Arla Foods, Viby, Dinamarca), Lysolac 30 (GMBH, Mannheim, Alemania), lactosuero crudo (DHUL, Granada) y lactalbúmina (DWV Internacional, Veghel, Holanda).

- **Caldo infusión de cerebro-corazón (brain-heart infusion, BHI)**

BHI fue el medio líquido rutinariamente empleado para el crecimiento bacteriano. El medio comercial deshidratado se reconstituyó a razón de 37 g/L.

Infusión de cerebro de ternera	200 g
Infusión de corazón de buey	250 g
Peptona de gelatina	10 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato disódico	2,5 g
Glucosa	2 g

Para las determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) sobre *Brochothrix thermosphacta* a diferentes pHs, este medio fue reconstituido en los tampones glicocola-NaOH y ortofosfórico-NaOH descritos más adelante.

- **Caldo tripticaseína de soja (TSC)**

Este medio fue empleado alternativamente al caldo BHI para el crecimiento de determinadas bacterias. El preparado comercial se disolvió a razón de 30 g/L de agua destilada.

Triptona	17 g
----------	------

Peptona de soja	3 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato dipotásico	2,5 g
Glucosa	2,5 g

- **Caldo M-17**

Este medio fue empleado en su forma sólida para el crecimiento y recuento de los fermentos lácticos empleados en los experimentos con leche y quesos.

Triptona	2,5 g
Peptona de carne	2,5 g
Peptona de soja	5 g
Extracto de levadura	2,5 g
Extracto de carne	5 g
Glicerofosfato sódico	19 g
Sulfato magnésico	0,25 g
Ácido ascórbico	0,5 g
Lactosa	5 g

- **Agua de peptona**

Medio de pre-enriquecimiento empleado en los ensayos en carnes tipo salchicha y hamburguesa para la detección de salmonelas y como vehículo para las diluciones seriadas en los experimentos en carne con *Brochothrix*.

Peptona de carne	1 %
Cloruro sódico	0,5 %

Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2.

- **Agua de peptona (modificada)**

Utilizada para la extracción de las bacterias y de la bacteriocina de carnes contaminadas con *Brochotrix*. De composición igual que la anterior pero adicionada de 0,1 % de Tween 20.

- **Medio PCA (Plate Count Agar)**

Utilizado para el recuento de mesófilos totales en carnes tipo salchicha y hamburguesa, de acuerdo con la normativa vigente para análisis microbiológicos en carnes.

Triptona	5 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa	1 g
Agar	15 g

- **Leche desnatada**

La leche desnatada fue el medio escogido en los cocultivos bacterianos de las cepas patógenas diana con los enterococos productores de AS-48, como paso previo a su uso en quesos. El preparado comercial deshidratado se reconstituyó a razón de 110 g/L de agua destilada.

Grasa	0,5 %
Proteína	33 %
Cenizas	8 %
Humedad	5 %
Ácido láctico	1,5 %

- **Lactosuero (LS)**

Se emplearon diversos tipos de lactosueros como medios de producción de AS-48, reconstituidos al 6% en agua destilada. La composición de cada uno de ellos se detalla a continuación:

LACTOSUERO CRUDO (DHUL, Granada)

Lactosa	5,1 %
Proteína	0,90–0,97 %
Sólidos	6,50–6,60 %
Grasa	0,55–0,68 %
pH (10 g / 100 mL)	6,5–6,6

LACTOSUERO LACPRODAN 30 (Viby, Dinamarca)

Lactosa	52 ± 4 %
Proteína	30 ± 2 %
Sólidos	7,55 %
Minerales	Máx. 8 %
Humedad	Máx. 5 %
Grasa	Máx. 4 %
pH (10 g /100 ml)	6 – 6,7

LACTOSUERO LYSOLAC 30/NF (GMBH, Mannheim, Alemania)

Lactosa	10 %
Proteína	14,5 %
Sólidos	31,8 %
Sales orgánicas lácticas	41,1 %
Humedad	2,7 %
Grasa	0,5 %
pH (10 g/100 ml)	6-7

LACTOSUERO TIPO BELLAC (Hispanoland, Barcelona)

Lactosa	70-74 %
Proteína	12-14 %
Sólidos	Máx 8,5 %
Humedad	Máx. 5 %
Grasa	Máx. 2 %

pH (10g / 100 ml) > 6,2

- **Lactalbúmina Esprión 300 (DMW Internacional, Veghel, Holanda) (LA)**

Para su empleo se reconstituyó inicialmente al 6% en agua destilada

Lactosa	52 %
Proteína	30 %
Sólidos	8,7 %
Sales orgánicas lácticas	4,3 %
Humedad	3,5 %
Grasa	1,5 %

pH (10 g / 100 ml) 6,7

2.2. Medios selectivos de crecimiento

A menos que se indique lo contrario, estos medios se expresan como g/L de agua o tampón. Cuando fue preciso el empleo de medios sólidos se adicionó agar al 1,5 % u otro porcentaje indicado en la composición. Todos los medios fueron suministrados por Sharlab (Barcelona) excepto el medio Palcam, suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania) y el STAA suministrado por Oxoid (Hampshire, Reino Unido). Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, excepto en los casos en que se especifiquen otras condiciones.

- **Medio Kenner Fecal (KF):**

Fue el medio selectivo utilizado, en su forma sólida, para el crecimiento y recuento de enterococos en aquellos cocultivos en los que fue preciso diferenciarlos del resto de microorganismos, lácticos y no lácticos, presentes. Tras el autoclavado se estabilizó su temperatura en baño a 50 °C y se le adicionó 0,001 g/L de cloruro de trifeníl tetrazolio (CTT) previamente esterilizado por filtración. En este medio *E. faecalis* crece formando colonias de color rojo oscuro debido a la reducción del CTT.

Hidrolizado de peptona	10	g
Extracto de levadura	10	g
Cloruro sódico	5	g
Glicerofosfato sódico	10	g
Maltosa	20	g
Lactosa	1	g
Azida sódica	0,4	g
Púrpura de bromocresol	0,015	g

- **Medio PALCAM**

Fue el medio empleado para el recuento de *Listeria*. Tras el autoclavado se estabilizó la temperatura a 50 °C y se le adicionó en condiciones de esterilidad el suplemento suministrado por el fabricante siguiendo sus indicaciones (Van Netten *et al.*, 1989). En este medio *L. monocytogenes* forma colonias brillantes de color negro intenso debido a la reacción de los productos de la hidrólisis de la esculina con el hierro del medio.

Peptona	23	g
Extracto de levadura	3	g
Almidón	1	g
Cloruro sódico	5	g

Agar	13 g
D (-) Manita	10 g
Citrato de amonio y hierro (III)	0,5 g
Esculina	0,8 g
Glucosa	0,5 g
Cloruro de litio	15 g
Rojo de fenol	0,08 g
SUPLEMENTO (por cada 500 ml)	
Polimixina-B Sulfato	5 mg
Ceftacidima	10 mg
Acriflavina	2,5 mg

- **Medio de Vogel Johnson**

Utilizado en los quesos tipo fresco para el recuento de estafilococos.

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
Fosfato dipotásico	5 g
Piruvato sódico	10 g
D- manitol	10 g
Cloruro de litio	5 g
Glicocola	10 g
Rojo fenol	25 mg
Agar	13 g

Tras esterlizar en autoclave se estabilizó la temperatura a 50 °C y se le añadieron, en condiciones de esterilidad, 0,24 g/L de telurito potásico.

- **Medio Baird – Parker**

Se utilizó en los experimentos en carnes tipo hamburguesa y salchicha para la búsqueda presuntiva de estafilococos según la normativa vigente.

Peptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	1 g
Piruvato sódico	10 g
Glicocola	12 g
Cloruro de litio	5 g

Tras el autoclavado se estabilizó la temperatura a 50 °C y se le adicionó en condiciones de esterilidad una emulsión de yema de huevo en solución salina estéril (3:7, v:v) a razón de 50 ml/L y 1% de una solución de telurito potásico al 1% esterilizada por filtración. Las colonias de estafilococos aparecen de color negro brillante.

- **Caldo Selenito – Cistina**

Medio de enriquecimiento empleado en los experimentos en carnes tipo salchicha y hamburguesa para la detección de *Salmonella*.

Peptona	5 g
Cistina	0,01 g
Lactosa	4 g
Selenito disódico	4 g
Fosfato disódico	10 g

- **Agar Shigella – Salmonella**

Medio selectivo y diferenciador empleado en los experimentos en carnes tipo salchicha y hamburguesa para la detección de salmonelas.

Peptona	10 g
Lactosa	10 g

Bilis de buey	8,5	g
Citrato sódico	10	g
Tiosulfato sódico	8,5	g
Citrato amónico férrico	1	g
Verde brillante	0,0003	g
Rojo neutro	0,025	g
Agar	13	g

Este medio se prepara en el momento de su utilización y no se esteriliza en autoclave. El aspecto de las colonias de *Salmonella* es translúcido con un botón negro en su centro debido a la producción de sulfhídrico o sin él.

- **Agar Hektoen**

Medio selectivo y diferenciador empleado en los experimentos en carnes tipo salchicha y hamburguesa para la detección de salmonelas.

Peptona	12	g
Extracto de levadura	3	g
Lactosa	12	g
Sacarosa	12	g
Salicina	2	g
Sales biliares	9	g
Cloruro sódico	5	g
Tiosulfato sódico	5	g
Citrato amónico férrico	1,5	g
Fucsina ácida	0,1	g
Azul de bromotimol	0,064	g
Agar	14	g

Este medio se prepara en el momento de su utilización y no se esteriliza en autoclave sino que se deja 1 minuto en ebullición como máximo. El aspecto de las colonias de *Salmonella* es verde azulado (lactosa negativas) con centro negro o sin él.

- **Caldo lactosado biliado verde brillante (Brila)**

Medio empleado en los experimentos en carne tipo salchicha y hamburguesa para estimar el número de coliformes.

Peptona	10	g
Lactosa	10	g
Bilis de buey	20	g
Citrato sódico	10	g
Verde brillante	0,0133	g

El medio se reparte en tubos en los que se dispone una campana de Durham. Los coliformes fermentan la lactosa con producción de ácidos y gases que se recogen en la campana.

- **Medio EMB (Eosina Azul de Metileno)**

Medio empleado en los experimentos en carne tipo salchicha y hamburguesa para determinar el número de coliformes.

Peptona	10	g
Fosfato dipotásico	2	g
Lactosa	5	g
Sacarosa	5	g
Eosina Y	0,4	g
Azul de metileno	0,07	g
Agar	13,5	g

Las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias rojas o rosadas. *Escherichia coli* forma colonias rojo oscuras planas y con brillo verde metálico.

- **Medio Saboureaud con cloranfenicol**

Medio empleado en los experimentos en carne tipo hamburguesa y salchicha para el recuento de hongos y levaduras.

Peptona de caseína	5	g
Peptona de carne	5	g
D (+)Glucosa	40	g
Cloranfenicol	0,5	g
Agar	15	g
pH 5,6 ± 0,2		

- **Medio STAA (Estreptomina - Acetato de Talio Agar)**

Medio selectivo empleado para el recuento de *Brochothrix thermosphacta* en experimentos en masas cárnicas. El medio fue adicionado de 7,5 g/0,5 L de glicerol. Tras esterilizar en autoclave, el medio se atemperó a 50 °C y se adicionó el suplemento proporcionado por el fabricante (1 vial por cada 500 ml de medio) en condiciones de esterilidad.

Peptona	20	g
Extracto de levadura	2	g
Fosfato dipotásico	1	g
Sulfato magnésico	1	g
Agar	13	g
SUPLEMENTO SELECTIVO:		
Sulfato de estreptomina	500	mg
Acetato de talio	50	mg
Cicloheximida	50	mg

2.3. Medios empleados para ensayos de actividad antibacteriana

La composición de los medios utilizados se expresa en gramos por litro de tampón fosfato monosódico-disódico, 0,1 M, pH 7,2. Los medios, suministrados por Sharlab, se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

- **Agar de Mueller Hinton tamponado (MHA-T)**

Utilizado como capa base (10 ml) en los ensayos en placa para determinar la actividad antibacteriana de muestras líquidas.

Extracto de carne	2 g
Hidrolizado ácido de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	17 g

- **Medio BHA blando**

Empleado en las sobrecapas inoculadas con la bacteria indicadora o bien como capa base (20 ml) y en este caso contenía 1 % de agar.

BHI	15 g
Agar	8 g
Tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,2	1000 ml

- **Medio TSA blando**

Empleado en las sobrecapas (0,8% agar) utilizadas para cubrir la capa base una vez inoculadas con la bacteria indicadora o bien como capa base (1 % agar) para valorar la actividad de la bacteriocina según la técnica de Parente y Hill (1992).

TSB	15 g
Agar	8 g
Tampón fosfato sódico 0,1 M, pH 7,2	1000 ml

3. Tampones y soluciones

- **Solución salina fisiológica (Ringer)**

Empleada para la dilución de los cultivos previo a su inoculación en placa o en alimentos.

Cloruro sódico	9 g
Agua destilada	1000 ml

- **Tampón fosfato sódico 0,2 M, pH 7,2:**

Empleado para amortiguar los cambios de pH en los medios destinados al ensayo de la actividad bacteriocinogénica.

Fosfato dipotásico (Solución X)	0,2 M
Fosfato monopotásico (Solución Y)	0,2 M

Se mezclaron 36 ml de solución X con 14 ml de solución Y y se completó con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml. (Gomori, 1955).

- **Tampón glicocola-NaOH, 0,050 M, pH 8,6 (variación Gomori, 1955):**

Se preparó mezclando 25 ml de una solución de glicocola 0,2 M y 2 ml de NaOH 0,2 M y adicionando agua destilada hasta un volumen final de 100 ml.

- **Tampón ácido ortofosfórico – NaOH, 0,2 M, pH 5,5:**

Se preparó adicionando poco a poco NaOH 1 M a una solución 0,2 N de ácido ortofosfórico en agua destilada hasta obtener el pH deseado.

- **Solución para la extracción de bacteriocina en carnes**

Fue empleada para la extracción ácida de AS-48 en masa cárnica tipo salchicha y hamburguesa (Garriga *et al.*, 2002).

Acetato sódico	0,050 M
----------------	---------

EDTA	0,1	M
Tritón X 100	0,2	%
pH 5		

- **Emulsión de ésteres de sacarosa**

Empleada para el ensayo de su efecto combinado con AS-48 frente a *L. monocytogenes* en leche desnatada. Los ésteres empleados fueron palmitato y estearato de sacarosa (Degusta, Barcelona). La emulsión se preparó a una concentración de 10 mg/ml en agua destilada estéril fría, calentando a continuación y en agitación hasta alcanzar 80 °C y manteniendo la suspensión 10 minutos a esta temperatura. La emulsión se puede conservar en frío (5 °C) durante varios días.

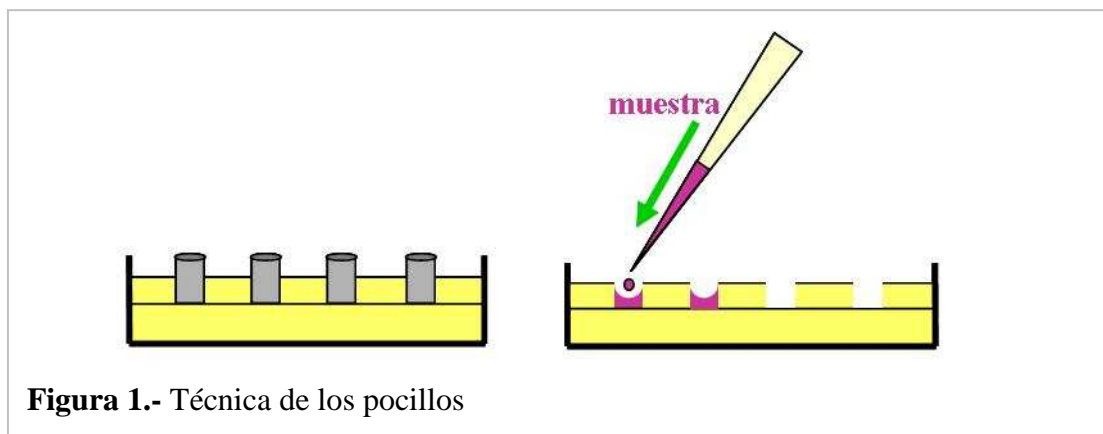
- **Solución de tripolifosfatos (TPF)**

Empleada para estudiar su efecto combinado con AS-48 en los experimentos con loncheados de jamón cocido. Se prepararon soluciones al 0,3 y 0,5 % en agua destilada esterilizadas en autoclave.

4. Métodos empleados en la detección y titulación de la actividad de bacteriocina

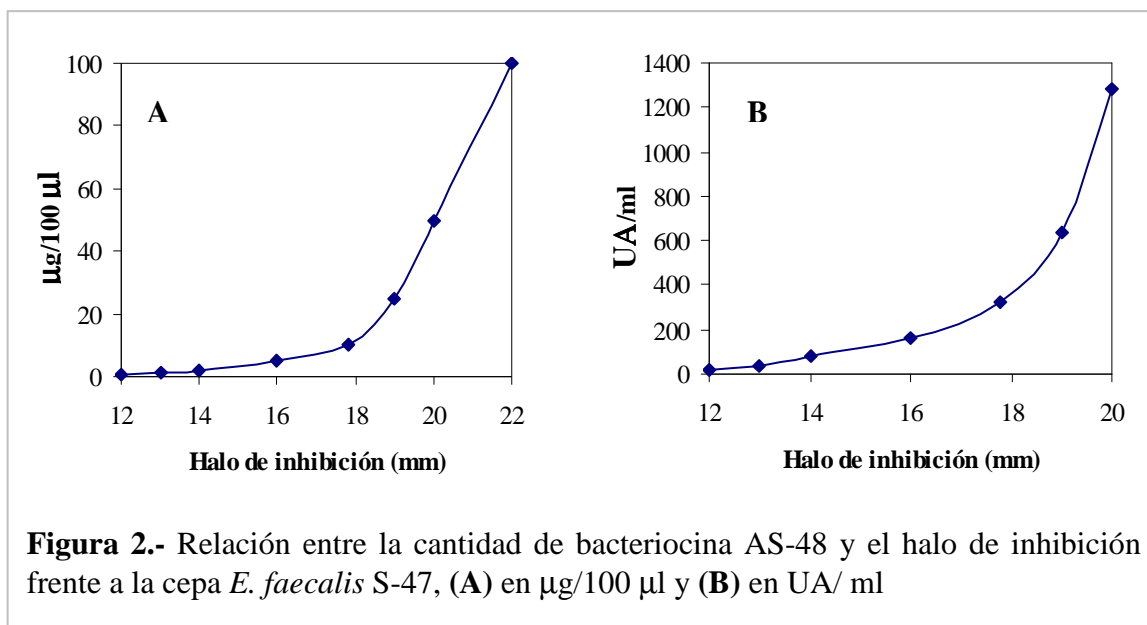
- **Técnica de los pocillos (Tagg y Mcgiven, 1971)**

Sobre una placa conteniendo una capa base de medio MHA-T (10 ml) con la superficie bien seca, se depositaron torres de acero inoxidable (8 mm de diámetro x 10 mm de altura). Seguidamente se vertieron sobre la placa 6 ml de medio BHA blando, mantenido en sobrefusión a 45 °C e inoculado con, aproximadamente 3×10^8 UFC de la cepa indicadora. Una vez solidificada la sobrecapa, se retiraron las torres, en cuyos huecos (pocillos) se depositaron 100 µl de la muestra a ensayar. Las placas fueron posteriormente incubadas a 37 °C durante 18-24 h. Tras el crecimiento de la cepa indicadora se midió el diámetro del halo de inhibición aparecido alrededor de cada muestra.



La actividad de las muestras se ha expresado en unas ocasiones mediante el diámetro del halo de inhibición de la cepa indicadora y en otras, mediante unidades arbitrarias por ml (UA/ml), definido como el recíproco de la última dilución que produce un halo visible de inhibición de la cepa indicadora (9 mm) multiplicado por 10.

Para aproximar la concentración de bacteriocina a $\mu\text{g/ml}$ se utilizó una curva patrón previamente realizada con bacteriocina purificada, que relaciona el diámetro de los halos de inhibición producidos frente a *E. faecalis* S-47, con la concentración de proteína de la muestra, estimada por el método de Bradford.



- **Técnica de los pocillos (Parente y Hill, 1992)**

Sobre una placa se vertieron 20 ml del medio TSA blando, mantenido en sobrefusión a 45 °C e inoculado con, aproximadamente, 3×10^8 UFC de la cepa indicadora. Una vez solidificado el medio, se practicaron en el mismo, mediante pipeta Pasteur, huecos de un diámetro de 4,5 mm donde se depositaron 50 µl de la muestra a ensayar. Las placas fueron posteriormente incubadas a 37 °C durante 18-24 h. Tras el crecimiento de la cepa indicadora se midió el diámetro del halo de inhibición producido alrededor de cada muestra. Esta técnica se ha empleado ocasionalmente para la valoración de la actividad de la preparación desecada obtenida mediante pulverización en vacío.

5. Métodos de extracción de la bacteriocina

5.1. Extracción a partir de cultivos en medios definidos convencionales

Los cultivos de las cepas productoras de bacteriocina o bien aquéllos adicionados de ésta, fueron centrifugados en una microcentrífuga Hettich EBA 12 a 12000 r.p.m durante 10 minutos para retirar la mayor parte de las células. Los sobrenadantes se calentaron a 90 °C durante 5 minutos para inactivar las células viables residuales y se determinó su actividad inhibidora mediante alguno de los métodos descritos en el apartado anterior.

5.2. Extracción ácida a partir de leche y queso

Para determinar la producción de AS-48 en leche y queso, se extrajeron muestras de 0,5 ml de leche o de 5 g de queso y se homogenizaron con 0,5 ml o 5 ml de HCl 0,02 N, respectivamente, en un vórtex o un homogeneizador de paletas, según el caso. Después de centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se ajustó el pH del sobrenadante a 6,0 con NaOH 1 N, y se calentó a 90 °C durante 5 minutos para eliminar las células

viables para ensayar la actividad inhibidora mediante la técnica de los pocillos de Tagg y McGiven.

5.3. Extracción a partir de masas cárnicas tipo salchicha y hamburguesa

La bacteriocina presente en las masas cárnicas se extrajo siguiendo el procedimiento descrito por Garriga *et al.* (2002). Para ello, las muestras (10 g) de masa cárnica fueron adicionadas de 90 ml de la solución previamente descrita, y trituradas durante 1 minuto en un homogenizador Ultraturrax T25 (Jauke and Kunkel, IKA Labor technik, Sweden) o Masticator (Basic, IUL, Valencia, España). Tras calentar la mezcla a 100 ° C durante 10 minutos se recogió la fase líquida, se filtró por papel de filtro y se precipitó con sulfato amónico al 50 % de saturación (300 g/L) durante 30-45 minutos a 4 ° C. Los precipitados fueron recogidos mediante centrifugación y resuspendidos en 2 ml de tampón fosfato 50 mM pH 7. Este procedimiento es útil para concentrar las muestras aunque el grado de purificación alcanzado es muy bajo. Las muestras fueron calentadas a 90 ° C durante 10 minutos para inactivar las bacterias que pudieran quedar. La valoración de la bacteriocina se realizó mediante dilución al límite de la preparación extraída y posterior ensayo de la actividad según Tagg y McGiven.

5.4. Extracción a partir de jamón cocido loncheado

Para la extracción de la bacteriocina presente en jamón cocido loncheado y de la ternera se tomaron porciones de 25 cm² a las que se añadieron 25 ml de agua de peptona modificada, sometiéndose a continuación a homogeneización (Masticator Basic, IUL, Valencia, España) durante dos minutos. Para la detección de bacteriocina se siguió el procedimiento detallado en el apartado 5.1.

6. Optimización de la producción y de la recuperación de AS-48 a partir de sustratos lácteos

La optimización de la producción de una sustancia se puede hacer mejorando/modificando la cepa productora para que la sobreproduzca o bien, modificando el medio de cultivo para incrementar y abaratar su producción. Además, en el caso particular de que la finalidad sea su aplicación en alimentos, hay que utilizar un sustrato de partida de grado alimentario, ya que es de esperar que una parte de los componentes de medio de cultivo persistan en el preparado de bacteriocina.

6. 1. Optimización de la producción por mutagénesis

Para obtener clones con mayor capacidad de producción de AS-48 se aplicaron a la cepa *E. faecalis* A-48-32 diversos tratamientos físicos y químicos con acción mutagénica preferencial sobre el ADN plasmídico. Una vez efectuado el tratamiento y para revelar la existencia de clones hiper-productores, se cubrieron las placas de la cepa productora con una sobrecapa inoculada con *L. innocua* y se incubaron a 37 °C durante una noche, poniendo la cepa salvaje sin tratamiento como control.

6.1.1. Mediante mutación espontánea

A partir de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento se efectuaron diluciones en solución salina estéril hasta alcanzar aquella con una concentración aproximada de 10^3 UFC/ml, que fue inoculada en placas de BHA tamponadas e incubadas a 37 °C.

6.1.2. Tratamiento con naranja de acridina

A partir de un cultivo en fase estacionaria de crecimiento, se efectuaron diluciones que se inocularon en tubos con 5 ml de BHI para obtener una concentración del orden de 10^4 UFC/ml. A los distintos tubos se añadieron concentraciones crecientes de naranja de acridina (0, 5, 7 y 12 µg/ml) y se incubaron a 37 °C hasta que se desarrolló una turbidez evidente en alguno de ellos (una noche). Se tomó el tubo con la mayor concentración de colorante en que se observó crecimiento y se centrifugó a 12000 rpm/

durante 10 minutos para recoger las células. A continuación las células fueron resuspendidas en agua destilada estéril y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones para eliminar el colorante. El sedimentó fue resuspendido en solución salina estéril, realizándose diluciones seriadas para sembrar la apropiada en placas con BHA tamponado e incubando a 37 °C.

6.1.3. Tratamiento con bromuro de etidio

Se siguió el procedimiento seguido con naranja de acridina, añadiendo concentraciones crecientes de bromuro de etidio (0, 2,5 y 5 µg/ml) e incubando igualmente durante 24 h a 37 °C.

6.1.4. Tratamiento con altas temperaturas

Se inocularon 2 ml de BHI tamponado al 4 % con un cultivo en fase estacionaria de la cepa productora y se incubó hasta alcanzar la fase logarítmica. Entonces se tomaron 0,5 ml de este cultivo y se transfirieron a un tubo con 5 ml de medio BHI-T fresco. Se incubó durante 24 h a 52 °C y se hicieron diluciones seriadas en solución salina estéril que fueron sembradas en placas de BHA tamponado e incubadas a 37 °C.

6.1.5. Tratamiento con luz ultravioleta

A partir de un cultivo en fase estacionaria de crecimiento, se realizaron diluciones en solución salina estéril hasta alcanzar una concentración en torno a 10^4 - 10^5 UFC/ml. Estas diluciones fueron irradiadas durante 6 y 8 min. con una lámpara UV ($E = 0.25 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en agitación continua. A continuación se procedió a centrifugar a 12000 rpm/ durante 10 minutos y después a resuspender las células en 5 ml de BHI tamponado, incubándose a 37 °C durante una noche para después sembrar la dilución adecuada en placas de BHA tamponado.

6.2. Optimización de la producción de bacteriocina a partir de sustratos lácteos

La producción de la bacteriocina en medio líquido se llevó a cabo en recipientes de diferentes capacidades, según los propósitos, conteniendo sustratos lácteos (LS o LA) adicionados de diversos tipos de complementos nutritivos, que fueron inoculados con un cultivo en fase estacionaria de la cepa productora. Tras 14-20 horas de incubación a 28 °C, se procedió a tomar muestras para el ensayo de la actividad inhibidora según la técnica de los pocillos. Con la finalidad de obtener una máxima producción de bacteriocina a partir del cultivo en sustratos lácteos, se procedió a estudiar el efecto diversos parámetros:

Tipo y concentración del sustrato

Adición de complementos nutritivos: glucosa, distintas fuentes de nitrógeno

Temperatura de incubación

Condiciones de oxigenación: reposo y agitación

Volumen del inóculo

Estabilización del pH a distintos valores

Para ello se prepararon los distintos tipos de medio y se aplicaron las distintas condiciones de incubación, que se especifican en el capítulo de Resultados. A intervalos regulares de tiempo se tomaron muestras de los cultivos para determinar la actividad bacteriocinogénica de los mismos.

6.3. Recuperación de AS-48 a partir de cultivos en sustratos lácteos

6.3.1 Mediante cromatografía

Cromatografía de intercambio catiónico

La bacteriocina presente en los cultivos se recuperó mediante cromatografía de intercambio iónico sobre Carboximetil-Sephadex CM25 (Amerschan Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra).

Preparación del gel: El producto comercial (microparticulado) fue reconstituido por adición de tampón fosfato sódico 0,02 M pH 7,02 durante 24 horas a 4 °C y lavado en un embudo Buchner, con dos volúmenes de NaCl 1,5 M y tres volúmenes de tampón fosfato. En estas condiciones 1 g del producto en polvo da lugar a 9-10 ml de gel.

El gel se adicionó al cultivo en proporción 1:30 (v/v) agitando suavemente durante 60 minutos y se dejó decantar durante 45 minutos. Posteriormente se retiró el medio y el gel se lavó varias veces con agua destilada para eliminar el mayor número de células posible. Entonces fue empaquetado en una columna de vidrio (10 x 50 cm) y lavado con agua destilada hasta retirar todo el material no adsorbido. La elución del gel se realizó a un flujo de 300 ml/h aplicando primero un volumen de NaCl 0,5 M, seguido de dos volúmenes de NaCl 1,5 M. El eluido de la columna fue recogido de forma manual en fracciones de 50 ml para determinar posteriormente la actividad antibacteriana y la concentración de proteínas.

Las muestras con actividad fueron almacenadas a -20°C . Antes de su uso los preparados de bacteriocina obtenidos por este procedimiento fueron esterilizados por filtración a través de filtros bacteriológicos de baja retención de 0,22 μm de diámetro de poro (Millex GV, Millipore Corp., Belford, EE.UU) o choque térmico de 90 °C durante 5 minutos. Excepcionalmente fueron concentrados mediante liofilización o purificados por cromatografía de fase reversa, según se describe más abajo.

Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Empleada para purificar a homogeneidad la bacteriocina producida en sustratos lácteos, verificar el rendimiento del proceso completo y comprobar que se trataba de la misma molécula que la secretada en medio BHI, al objeto de poder emplear este sustrato para obtener bacteriocina pura con el propósito de realizar estudios estructurales. Las muestras con actividad antibacteriana procedentes de intercambio iónico fueron repurificadas mediante cromatografía de fase reversa de alta resolución, utilizando una columna Vydac 218TP510 (10 x 250 mm; The Separation Group, Hesperia, Calif.) con un relleno tipo C18 de tamaño medio de partícula de 10 micras, y un tamaño de poro de 300 Å. La muestra se aplicó a un flujo de 3 ml/min sobre la columna equilibrada previamente en solvente A (ácido trifluoroacético, TFA, 10 mM en agua de grado MilliQ). El material no adsorbido sobre la columna se eliminó mediante lavado con solvente A, hasta que la absorbancia del efluente (A_{210}) descendió a línea base. El material retenido en

la columna fue eluido mediante un gradiente lineal compuesto (0-40 % B en 5 min; 40-80 % B en 20 min; 80-100 % B en 5 min), siendo el solvente B una mezcla de isopropanol:acetonitrilo (2:1, v/v) en TFA 4 mM, a un flujo de 3 ml/min. El efluente de la columna fue recogido en distintas fracciones de acuerdo con los picos de absorbancia (a 280 y a 210 nm) detectados. Dichas fracciones fueron posteriormente congeladas y liofilizadas mediante una centrífuga SpeedVac (Thermosavant, Waltham, Ma., EE.UU) conectada a un equipo de liofilización (Telstar, Thermovac TM 210, Barcelona, España) y finalmente redisueltas en 1 ml de agua destilada antes de ensayar su actividad antimicrobiana.

En todas las etapas cromatográficas de alta resolución se utilizó agua desionizada de grado Milli-Q. Se utilizó un equipo cromatográfico provisto de los siguientes módulos: dos bombas peristálticas de alta presión (HPLC Pump 2248, Pharmacia-LKB) con mezclador dinámico en alta presión y un detector de luz ultravioleta (VWM 2141, Pharmacia-LKB), controlados desde un sistema informático. Asimismo, se empleó un registrador gráfico BD41 de Kipp & Zonen. Para la recogida de fracciones se utilizó un microcolector de fracciones Gilson Mod. 203.

Determinación de la concentración de proteínas.

La determinación cuantitativa de proteínas se llevó a cabo por el método descrito por Bradford (1976), basado en la unión del colorante azul Coomassie brillante G-250 a las proteínas, lo que provoca un desplazamiento en el máximo de absorbancia del colorante desde 465 nm a 595 nm que sirve para determinar la concentración de proteínas.

Preparación del reactivo de Bradford: Se disolvieron 100 mg de azul Coomassie brillante G-250 en 50 ml de etanol al 95 % y se adicionan a continuación, 100 ml de ácido fosfórico (85 % peso/volumen), completándose hasta un volumen final de 1 litro con agua destilada. La solución se filtró al menos tres veces a través de un papel de filtro, hasta que perdió la coloración azul. El reactivo preparado está disponible en el kit de BioRad (Protein Assay Kit II, München, Alemania).

Micrométodo: Se depositaron 200 µl de la muestra problema en una cubeta de espectrofotometría de 1 ml (Sharlab, Barcelona) junto con 700 µl de agua destilada, adicionándose, a continuación, 100µl de la solución de reactivo de Bradford. Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente unos 10 minutos. Seguidamente se

midió la densidad óptica de la muestra a 595 nm frente a un blanco consistente en 900 μl de agua destilada y 100 μl de reactivo de Bradford.

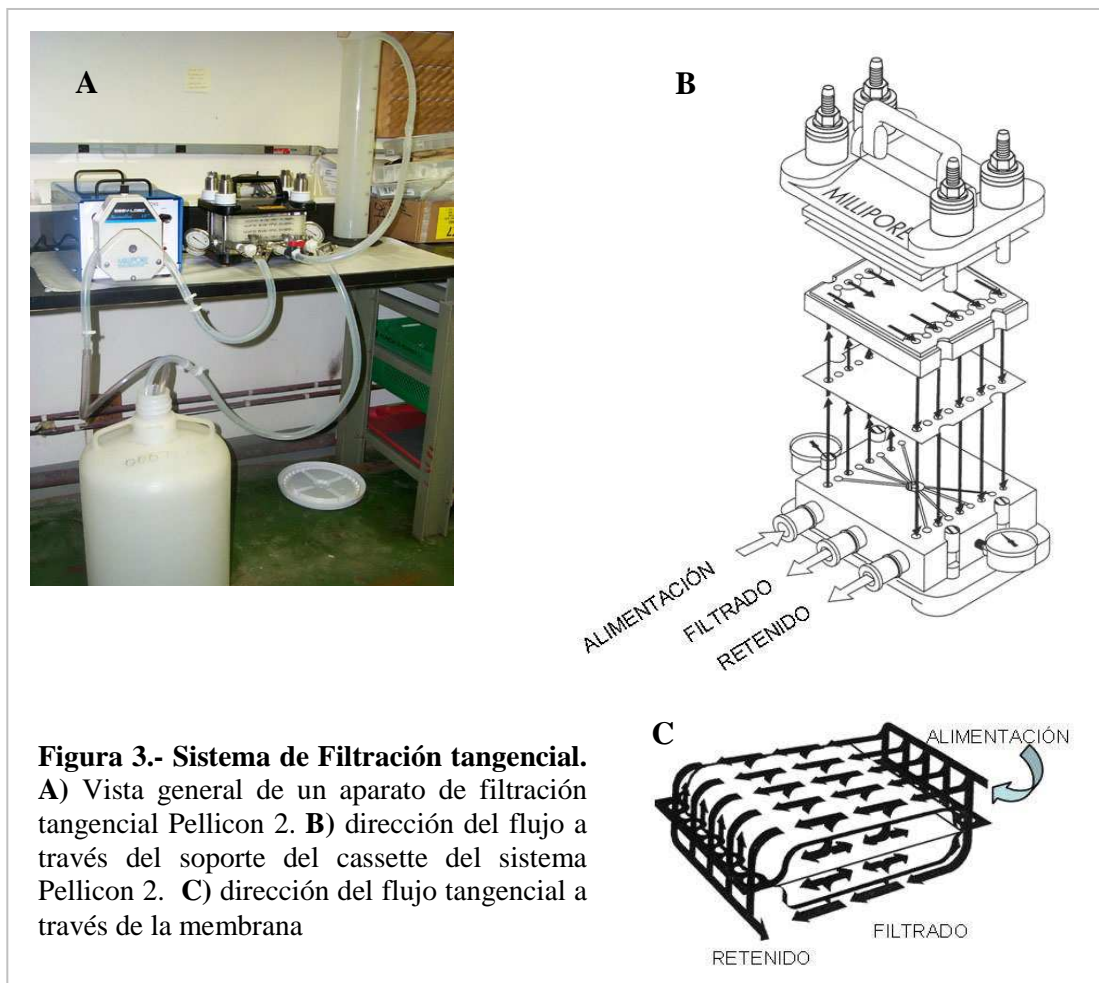
La cantidad de proteína presente en las muestras ensayadas se dedujo a partir de una curva estándar obtenida titulando cantidades crecientes (1-20 μg) de albúmina bovina cristalizada (Sigma).

6.3.2. Mediante filtración tangencial

Una vez producida la bacteriocina, los cultivos fueron sometidos a filtración tangencial en un sistema Pellicon®-2 (Millipore, Watford, Reino Unido). Este proceso tenía dos finalidades principales, de un lado eliminar la mayor parte de las células de la cepa productora y, de otro, concentrar la bacteriocina existente. En todos los casos la muestra del tanque de alimentación se hizo pasar a través del canal de alimentación en virtud a una bomba peristáltica conectada al sistema. Los materiales menores al tamaño medio de poro pasan a través de la membrana, mientras que aquellos de un tamaño mayor quedan retenidos en la membrana retornando al tanque de alimentación.

El proceso de filtración tangencial se realizó en dos pasos. El primero, de clarificación, se realizó a través de membranas de tamaño medio de poro de 0,45 μm (Durapore, PVDF, screentype C, 0,5 m^2) o 0,22 μm (Durapore, PVDF, screentype V, 0,5 m^2), y tenía por objeto retirar células y sólidos del medio. En él se esperaba generar una fracción con aquellos componentes que atraviesan la membrana (permeado o filtrado), con un volumen prácticamente igual al del cultivo y que debería contener la bacteriocina y una fracción de mucho menor volumen (retenido), conteniendo las células y sólidos del cultivo. El segundo paso, de concentración a través de membranas de 5 kDa de tamaño medio de poro (Biomax, polietersulfona, screentype A, 0,5 m^2), da lugar a dos fracciones, un permeado, al que pasa el agua, las sales minerales y las moléculas orgánicas de tamaño menor de 5 kDa, y un retenido donde debería quedar la bacteriocina cuyo P_m es de 7149 Da. Las condiciones de limpieza/recuperación y conservación de las membranas fueron las especificadas por el fabricante: tras su uso se sometieron a una recirculación a 45 °C de lejía (300 ppm), en el caso de las membranas de 0,45 y 0,22 μm o de NaOH 0,1 % en el caso de la membrana de 5 kDa, seguido de

inmersión durante una noche a 45 °C en una solución de proteasa al 0,2 %. Las membranas se conservan sumergidas en una solución al 2 % de formaldehído a 4 °C.



6.3.3 Secado por electrospray

La producción del preparado desecado con actividad se realizó a partir de un cultivo de 18 h de la cepa productora *E. faecalis* EFS 2 inoculada al 4% en un medio formado de polvo de lactosuero desmineralizado reconstituido a diferentes concentraciones. Estos ensayos se llevaron a cabo tanto sin control del pH como a pH controlado a 6,5 en un atomizador/desecador a vacío (Büchi Spray Drier, modelo B 191, Flawil, Suiza) con una entrada de aire a 170 °C y una salida a 90 °C. En cada experimento se atomizaron 400 ml de cultivo con un contenido de sólidos en torno al 10 %. El liofilizado fue retirado del vaso de recogida y transferido en condiciones asépticas a bolsas de plástico que fueron almacenadas a 6 °C. Estos experimentos se llevaron a cabo

en el Dairy Products Research Centre (Teagasc, Fermoy, Cork) al no disponer en nuestro laboratorio del dispositivo necesario.

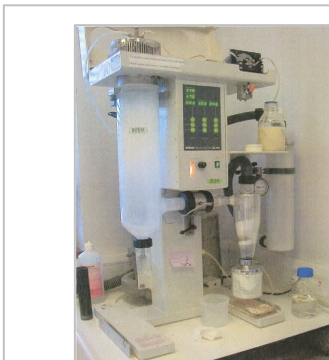


Figura 4.- Vista general de un sistema de desecación por pulverización a vacío Büchi B-191

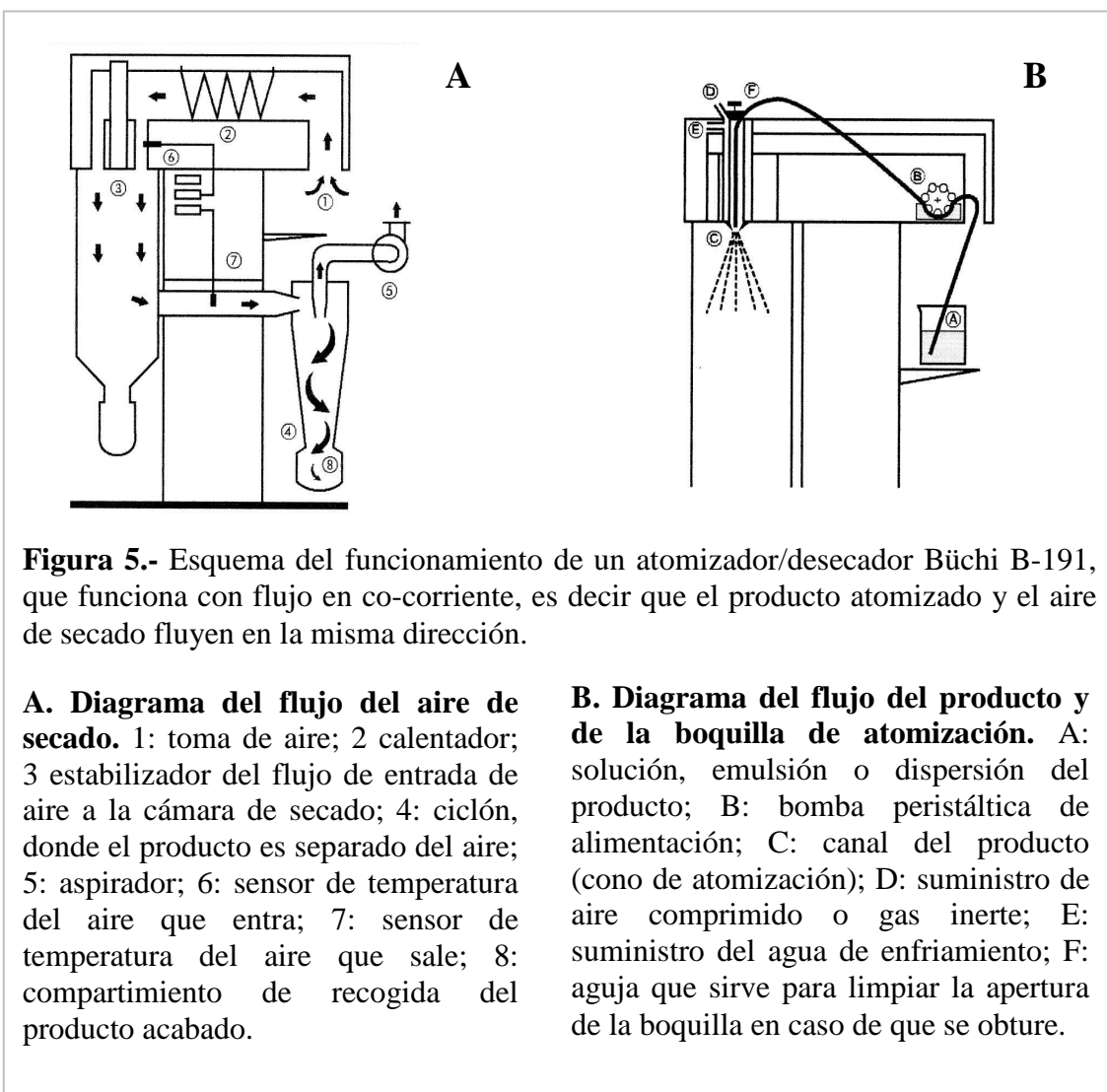


Figura 5.- Esquema del funcionamiento de un atomizador/desecador Büchi B-191, que funciona con flujo en co-corriente, es decir que el producto atomizado y el aire de secado fluyen en la misma dirección.

A. Diagrama del flujo del aire de secado. 1: toma de aire; 2 calentador; 3 estabilizador del flujo de entrada de aire a la cámara de secado; 4: ciclón, donde el producto es separado del aire; 5: aspirador; 6: sensor de temperatura del aire que entra; 7: sensor de temperatura del aire que sale; 8: compartimiento de recogida del producto acabado.

B. Diagrama del flujo del producto y de la boquilla de atomización. A: solución, emulsión o dispersión del producto; B: bomba peristáltica de alimentación; C: canal del producto (cono de atomización); D: suministro de aire comprimido o gas inerte; E: suministro del agua de enfriamiento; F: aguja que sirve para limpiar la apertura de la boquilla en caso de que se obture.

7. Estudio del efecto de AS-48 en leche y quesos para controlar el desarrollo de cepas patógenas

7.1. Efecto de la adición de AS-48 producido *ex situ*

7.1.1. Efecto del liofilizado activo obtenido mediante atomización/desecación a vacío

La actividad de las preparaciones de AS-48 obtenidas mediante esta técnica se evaluaron reconstituyendo una alícuota del mismo en agua destilada al 10 % y ensayando su actividad mediante la técnica descrita por Parente y Hill frente a las cepas *L. lactis* subsp. *lactis* HP y *L. monocytogenes* LO28H. Una vez determinada la actividad de las muestras se procedió a ensayar el efecto de distintas concentraciones del liofilizado (entre 1 y 10 %) en BHI frente a la cepa patógena *L. monocytogenes* CECT 4032 (concentración inicial de 10^3 UFC/ml) para, a continuación, evaluar el efecto del mismo, reconstituido al 10 %, frente a *L. monocytogenes* (concentración inicial de 10^3 UFC/ ml) en leche desnatada.

7.1.2. Efecto de la combinación de AS-48 y ésteres de sacarosa sobre el desarrollo de diversas cepas patógenas transportadas por alimentos lácteos

La dosis máxima permitida de estos ésteres en productos lácteos es de 3 a 5 mg/g. Por ello se ensayaron cantidades menores (0,01 % y 0,2 %) al objeto de ver si la combinación con AS-48 aumentaba su eficacia y permitía rebajar la concentración efectiva de ambos antimicrobianos. Estos ésteres se ensayaron, por duplicado, en leche desnatada frente a *L. monocytogenes* CECT 4032 (concentración inicial de listerias de 10^3 UFC/ ml y 0,5 μ g/ ml de AS- 48) a 37 °C durante 72 h. en agitación (al presentarse los ésteres en emulsión), llevando en paralelo un control en leche en ausencia de ésteres y AS-48. A intervalos regulares de tiempo (0, 4, 8, 24, 48 y 72 h) se extrajeron muestras para determinar el número de listerias viables y la actividad inhibidora. El mismo procedimiento se siguió con las cepas de *S. aureus* 976 y *S. choleraesuis* LT2, si bien la concentración de AS-48 adicionada fue de 50 μ g/ ml y los experimentos se continuaron durante 48 y 24 h respectivamente.

7.2. Efecto de AS-48 producido *in situ* en leche: biocontrol

7.2.1. Cocultivo en leche de cepas productoras de AS-48 con *B. cereus* LWL1

Los ensayos se realizaron por duplicado en leche desnatada (100 ml) inoculada con la cepa bacteriocionogénica *E. faecalis* A-48-32 y con *B. cereus* LWL1, en una relación inicial de 10^5 enterococos- 10^4 bacilos (UFC/ml), (proporción 10:1). Como control se utilizó un cultivo inoculado con la cepa no productora *E. faecalis* S-47 y con *B. cereus* LWL1.

Los cocultivos fueron incubados a 30 °C y, a intervalos de tiempo comprendidos entre 0 y 72 - 96 horas se tomaron muestras para realizar los análisis microbiológicos y las determinaciones de bacteriocina y enterotoxina. Para estimar el número de células viables de uno y otro tipo, se realizaron diluciones seriadas de muestras extraídas de ambos lotes en solución salina fisiológica estéril, que fueron inoculadas por triplicado en placas con medios selectivos o diferenciadores adecuados, KFA para recuento de enterococos y TSA para el de *B. cereus*. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h antes de contar el número de colonias aparecidas, calculando el promedio del número de UFC/ml en cada caso.

La concentración de AS-48 en las muestras se determinó como se ha descrito en el apartado 5.2, ensayando la actividad de las mismas por la técnica de los pocillos y se expresó como el diámetro del halo de inhibición en mm.

Determinación de la concentración de enterotoxina de *Bacillus cereus*

Se utilizó un sistema comercial basado en la técnica de aglutinación reversa en látex (*Bacillus cereus* enterotoxin, diarrhoeal type, test kit BCET-RPLA, Oxoid, Hampshire, Inglaterra) recomendado para la detección de la enterotoxina diarreica de esta bacteria en alimentos y filtrados de cultivos. El test se desarrolló en placas de microtitulación con el fondo en V. Las muestras se homogenizaron tal como se ha descrito en el apartado 5.2 para la detección de AS-48 en leche y quesos, filtrando los sobrenadantes, previamente neutralizados, a través de filtros con 0,22 µm de poro (Millex GV, Millipore Corp., Belford, EE.UU). A continuación se realizaron diluciones de las

muestras en dos filas de pocillos y se añadió el volumen apropiado de la suspensión de látex portadora de los anticuerpos. Paralelamente se llevaron dos controles, uno negativo con un látex control portador de globulinas no inmunes y otro positivo con enterotoxina liofilizada. El título de enterotoxina se expresó como el recíproco de la última dilución que causaba una aglutinación visible.

7.2.2. Cocultivo en leche de cepas productoras de AS-48 con *Listeria monocytogenes* CECT 4032

Los ensayos se realizaron por duplicado en leche desnatada (100 ml) inoculada en todos los casos, control y tratados, con fermentos lácticos comerciales (aprox. 10^6 UFC/ml) (EZAL MA 4001) y *L. monocytogenes* ($4,5 \times 10^4$ UFC/ml). En los cocultivos con las cepas bacteriocinogénica *E. faecalis* A-48-32 o *E. faecium* UJA32-81 realizados, la proporción inicial resultó ser de 38:1 entre *E. faecalis* A-48-32 ($1,7 \times 10^6$ UFC/ml) y *L. monocytogenes* ($4,5 \times 10^4$ UFC/ml) o de 20:1 entre *E. faecium* UJA32-81 ($8,63 \times 10^5$ UFC/ml) y *L. monocytogenes* ($4,25 \times 10^4$ UFC/ml).

Los cocultivos fueron incubados a 30 °C y, a intervalos de tiempo comprendidos entre 0 y 72 horas se tomaron muestras para realizar los análisis microbiológicos y la determinación de bacteriocina. Para determinar el número de células viables de los distintos tipos, se realizaron diluciones seriadas de las muestras extraídas de los tres lotes en solución salina fisiológica estéril, que fueron inoculadas por triplicado en placas con medios selectivos o diferenciadores apropiados, KFA para el recuento de enterococos, PALCAM para el recuento de *Listeria* y M17 para el recuento de los fermentos. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h y se contó el número de colonias calculando el promedio del número de UFC/ml en cada caso.

La concentración de AS-48 de las muestras se determinó tal y como se ha descrito en el apartado 5.2, ensayando la actividad de las muestras por la técnica de los pocillos, la cual fue expresada como el diámetro del halo de inhibición en mm.

7.2.3. Cocultivo en leche de cepas productoras de AS-48 con *Staphylococcus aureus* CECT 976

Los ensayos se realizaron por duplicado en leche desnatada (100 ml) que fue inoculada en todos los casos, control y tratados, con fermentos lácticos comerciales (aprox. 10^6 UFC/ml) (EZAL MA 4001) y *S. aureus* ($5,96 \times 10^4$ UFC/ml). En los cocultivos con las cepas bacteriocinogénicas la proporción inicial resultó ser de 2,45:1 entre *E. faecalis* A-48-32 ($1,46 \times 10^5$ UFC/ml) y *S. aureus* ($5,96 \times 10^4$ UFC/ml) y de 1,32:1 entre *E. faecium* UJA32-81 ($5,96 \times 10^4$ UFC/ml) y *S. aureus* ($4,5 \times 10^4$ UFC/ml).

Los cocultivos fueron incubados a 30 °C y, a intervalos de tiempo comprendidos entre 0 y 72 horas se tomaron muestras para realizar los análisis microbiológicos y la determinación de bacteriocina. Para determinar el número de células viables de los distintos tipos, se realizaron diluciones seriadas de las muestras extraídas de los tres lotes en solución salina fisiológica estéril, que fueron inoculadas por triplicado en placas con medios selectivos o diferenciadores adecuados, KFA para recuento de enterococos, Vogel Johnson para recuento de *Staphylococcus* y M17 para recuento de los fermentos. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h y se contó el número de colonias calculando el promedio del número de UFC/ml en cada caso.

La concentración de AS-48 de las muestras se determinó y se expresó tal y como se ha descrito en el apartado 5.2, ensayando la actividad de las muestras por la técnica de los pocillos.

7.3. Efecto del empleo de cepas productoras de AS-48 como cultivos adjuntos en la fabricación de quesos sobre el control de bacterias patógenas

7.3.1. Fabricación del queso

FABRICACIÓN DEL QUESO DE PASTA DURA

Se realizó en la planta piloto del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA, CSIC), en la que se hicieron por duplicado dos ensayos completos para cada tipo de experimento en queso de pasta dura de tipo manchego.

En las cubas de fabricación se dispuso el volumen adecuado de leche de vaca desnatada y pasteurizada (72 °C, 15 segundos) y se mantuvo a 32 °C suplementándose con 0,02 g/L de CaCl₂ a partir de una solución de la sal al 20%. Cada cuba fue inoculada entonces con 10⁷⁻⁸ UFC/ml de un cultivo iniciador comercial mesofílico (EZAL MA 4001) y contaminada con el microorganismo seleccionado en cada caso. Las cubas que darían lugar a los quesos experimentales (o tratados) fueron además inoculadas con alguna de las cepas productoras de AS-48. Después de 45 minutos se añadieron 0,25 g/L de renina de ternera (actividad 1:10000, Laboratorios Arroyo, Santander) y se dejó coagular la leche a 32 °C durante 70 minutos. La cuajada se cortó en dados de aprox. 5 mm de lado, se calentó a 37 °C y se mezcló con el suero durante 30 minutos aproximadamente, hasta que adquirió la consistencia idónea. El suero se eliminó y la cuajada final se repartió en moldes que se sometieron durante 1,5 h a una presión de 1,5 Kg/cm². Posteriormente se desmoldaron las porciones y se introdujeron durante 5 h en salmuera saturada. La maduración tuvo lugar a 12 °C, con una humedad relativa del 90%, durante un mes. Se tomaron muestras de la leche, de la cuajada y del queso a los 5, 10, 15 y 30 días de maduración para realizar el análisis microbiológico y de detección de bacteriocina y de enterotoxina, si procedía.

FABRICACIÓN DE QUESO FRESCO

Se realizó también en la planta piloto del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA, CSIC), en la que se hicieron por duplicado dos ensayos completos para cada tipo de experimento en este queso fresco.

En las cubas de fabricación se dispusieron 15 L de leche de vaca desnatada pasteurizada (72 °C, 15 segundos) que se enfriaron hasta 26 °C. Cada cuba fue inoculada entonces con aprox. 3.2 x 10⁷ UFC/ml de un cultivo iniciador comercial mesofílico (EZAL MA 4001) y contaminada con la bacteria patógena seleccionada. Los lotes de leche experimentales fueron además inoculados con alguna de las dos cepas bacteriocinogénicas. 2 h después de la adición de los cultivos iniciadores se adicionó renina de ternera (0.0025%, actividad 1:10000, Laboratorios Arroyo,

Santander) y se dejó transcurrir la coagulación durante 16 horas, momento en el que el suero empezó a separarse de la cuajada. La cuajada se cortó suavemente en dados de aprox. 20 mm de lado que se dejaron drenar y después se colocaron en recipientes circulares perforados, cubiertos por un lienzo durante una noche a temperatura ambiente, para que se eliminara el suero por completo. A continuación se saló la cuajada (adicionando sal al 1,5%) y se dispusieron los quesos en envases cilíndricos estériles de 200 ml para ser almacenados a 4 °C hasta un máximo de 30 días. Se tomaron muestras de la leche, de la cuajada, y del producto final (queso de 1 día) y a los 7, 15 y 30 días de almacenaje para realizar los pertinentes análisis microbiológicos y físico-químicos.

7.3.2. Biocontrol de *B. cereus* LWL1 en un queso desnatado de pasta dura por una cepa productora de AS-48

Los experimentos se realizaron por duplicado en dos cubas de fabricación en las que se dispusieron 50 L de leche de vaca desnatada y pasteurizada (72 °C, 15 segundos). Cada una fue inoculada con 10^{7-8} UFC/ml de un cultivo mesofílico iniciador comercial (EZAL MA 4001) y con aprox. 10^5 UFC/ml de *B. cereus*. La cuba denominada test (T) fue además inoculada con aprox. $1,78 \times 10^6$ UFC/ml de la cepa productora de bacteriocina, *E. faecalis* A-48-32, mientras que la reservada como control (C) no se inoculó con esta cepa.

A intervalos de tiempo comprendidos entre 0 (cuajada) y 30 días se tomaron muestras para los análisis microbiológicos y las determinaciones de bacteriocina y toxina (tal como se ha descrito para el caso de los cocultivos en leche) así como los análisis físico-químicos que se detallan más adelante.

Análisis microbiológicos de los quesos

Para realizarlos se tomaron asépticamente muestras de leche (10 ml), cuajada y queso (10 g). Las muestras de cuajada y queso se homogenizaron en 90 ml de una solución estéril de citrato sódico al 2 %, precalentada a 42 °C en un homogeneizador de paletas (Stomacher Lab-Blender, Seward Medical, Londres). Una vez homogeneizadas las muestras, se hicieron diluciones decimales seriadas de las mismas en solución salina estéril, que fueron inoculadas por triplicado en el medio adecuado, incubándose a

continuación a 30 °C durante 48 h para el posterior recuento de las colonias. El recuento de enterococos se realizó a partir de las placas de KFA suplementado con CTT y el de *B. cereus* en placas de TSA. La evolución de los cultivos iniciadores se siguió, restando el número de enterococos del estimado para las BAL totales determinada por siembra en medio M17.

Determinación de la concentración de bacteriocina

Para determinar la concentración de AS-48, las muestras se sometieron a homogeneización y extracción ácida según se describe en el apartado 5.2 ensayándolas a continuación mediante la técnica de los pocillos.

Determinación de la concentración de enterotoxina de *Bacillus cereus*

Se realizó según se ha descrito para leche, con las variaciones correspondientes a la diferente homogenización del queso.

7.3.3. Biocontrol de *Listeria monocytogenes* CECT 4032 en un queso desnatado de pasta dura por cepas productoras de AS-48

En tres cubas de fabricación se dispusieron 15 L de leche de vaca desnatada pasteurizada (72 °C, 15 segundos). Cada una fue inoculada con 10^8 UFC/ml de un cultivo mesofílico iniciador comercial (EZAL MA 4001) y con 5×10^3 UFC/ml de *L. monocytogenes*. Las dos cubas denominadas test (T1 y T2) fueron además inoculadas con una de las cepas productoras de bacteriocina: aprox. 3×10^5 UFC/ml de *E. faecalis* A-48-32 y aprox. $2,7 \times 10^5$ UFC/ml de *E. faecium* UJA32-81 respectivamente, mientras que la reservada como control (C) no se inoculó con ninguna de las cepas bacteriocinogénicas. Los experimentos se realizaron por duplicado.

A intervalos de tiempo comprendidos entre 0 (cuajada) y 30 días se tomaron muestras para los análisis microbiológicos, la determinación de bacteriocina (tal como se ha descrito para el caso de los cocultivos en leche) y los análisis físico-químicos que se detallan más adelante.

Análisis microbiológicos de los quesos y determinación de la concentración de bacteriocina

Para realizarlos se tomaron asépticamente muestras de leche (10 ml), cuajada y de los tres tipos de quesos (10 g) y se procedió como se indica en el apartado correspondiente a los quesos contaminados con *B. cereus* pero en este caso el recuento del microorganismo contaminante, *L. monocytogenes*, se realizó en el medio selectivo PALCAM adicionado del suplemento específico.

La concentración de AS-48 se determinó según se ha especificado anteriormente (apdo. 5.2).

7.3.4. Biocontrol de *Staphylococcus aureus* CECT 976 en un queso fresco desnatado por cepas productoras de AS-48

En las tres cubas de fabricación se dispusieron 15 L de leche de vaca desnatada y pasteurizada (72 °C, 15 segundos). Cada una fue inoculada con el cultivo mesofílico iniciador comercial (EZAL MA 4001) y con aprox. $7,45 \times 10^3$ UFC/ml de *S. aureus*. Las dos cubas denominadas test (T1 y T2) fueron, además, inoculadas con una de las cepas productoras de bacteriocina: aprox. $4,2 \times 10^5$ UFC/ml de *E. faecalis* A-48-32 (cuba T1) y del orden de $2,9 \times 10^5$ UFC/ml de *E. faecium* 32-81 (cuba T2), mientras que la reservada como control (C) no fue inoculada. Como es habitual, los experimentos se realizaron por duplicado.

A intervalos de tiempo comprendidos entre 0 y 30 días, se tomaron muestras para los análisis microbiológicos, la determinación de bacteriocina (tal como se ha descrito para el caso de los cocultivos en leche) y los análisis físico-químicos que se detallan más adelante.

Análisis microbiológicos de los quesos y determinación de la concentración de bacteriocina

Para realizarlos se tomaron asépticamente muestras de leche (10 ml), cuajada y queso (10 g) de los tres tipos de quesos y se procedió como se indica en el apartado correspondiente a los quesos contaminados con *B. cereus*, pero en este caso la selección y recuento del microorganismo contaminante, *S. aureus*, se realizó en el medio selectivo Vogel Jonson adicionado de telurito potásico.

La concentración de AS-48 se determinó según se ha especificado anteriormente en el apartado 5.2.

7.4. Determinaciones físico-químicas

- **Medida del pH y de la acidez titulable**

La determinación del pH en **leche y suero** se realizó de manera directa empleando un pHmetro Crison modelo 2001 (Crison Instruments S.A. Barcelona, España), previa la estabilización de la temperatura de la leche a 20 °C. En **queso** esta determinación se llevó a cabo del mismo modo que en la leche pero homogenizando previamente la muestra de queso en agua destilada (1:5, p:v).

La acidez titulable se determinó según el método de Bradley *et al.*, (1992). Para ello, a 9 ml de la muestra (**leche o suero**) atemperada a 20 °C y homogenizada se adicionaron unas gotas de fenolftaleína al 2% y se añadió gota a gota sosa Dornic (NaOH 0.111 N) con una bureta graduada hasta alcanzar el pH del punto de viraje del indicador (8,3). Entonces se anotaron los ml de sosa gastados.

Cálculos:

- Los ml de NaOH empleados en la valoración multiplicados por 10 proporcionan el resultado en grados Dornic.
- Los ml de NaOH empleados en la valoración divididos por 10 representan los gramos de ácido láctico por 100 ml de leche.

La **acidez del queso** se determinó homogenizando la muestra de queso con agua destilada (1:5, p:v), filtrando el homogeneizado por papel Whatman y enrasando hasta 100 ml con agua destilada. A 25 ml del filtrado se le añadieron 10 gotas de fenolftaleína y se valoró con sosa Dornic expresando los resultados en gramos de ácido láctico por 100 gramos de cuajada o de queso, de acuerdo con la siguiente ecuación:

Cálculos:

$$\frac{\text{g ác. láctico}}{100 \text{ g queso}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ ml NaOH } 0,1 \text{ N} \times 0,009}{\text{N}^\circ \text{ gramos de muestra}} \quad (\times 100)$$

En la que se tiene en cuenta que 1 ml de sosa 0,1 N neutralizarán 1 ml de ácido láctico 0,1 N, esto es 0,009 g de ácido láctico, y de ahí el factor de corrección.

- **Determinación de proteína total y fracciones nitrogenadas**

Determinación de proteínas totales (FIL-IDF 20A/1986)

El valor de la proteína total o bruta (PB) de una muestra de origen lácteo se obtiene multiplicando el valor absoluto del nitrógeno total (NT) de dicha muestra por el factor 6,38 y se expresa como g de proteína total/100 ml de leche o 100 g de cuajada o queso (el factor 6,38 se corresponde con el contenido medio de nitrógeno en las proteínas de la leche y productos lácteos).

El contenido en NT se obtuvo mediante el método Kjeldahl según se describe en las normas FIL-IDF 20B71993 y FIL-IDF 25/1964 para leche y quesos respectivamente. Este método está basado en un proceso de digestión húmeda que destruye todos los compuestos orgánicos con H_2SO_4 concentrado en presencia de $CuSO_4$, empleado como catalizador.

Para la determinación del NT de la **leche** se introdujeron 5 ml de leche en los tubos de digestión de un sistema de digestión Tecator 6 1700, pesados con una exactitud de 4 decimales, anotando la pesada para, a continuación, añadir media pastilla de catalizador de la digestión. Posteriormente se añadieron 20 ml de H_2SO_4 concentrado a cada tubo y se colocaron los tubos en la batería calefactora cerrándolos con las tapas de vidrio conectadas al extractor y abriendo a continuación el grifo que acciona éste. La muestra se calentó durante 30 minutos a potencia 4 y seguidamente se elevó la temperatura al máximo, manteniéndola así durante 90 minutos (hasta que la muestra se vuelve totalmente transparente y de un color verde brillante). Tras el enfriado de la muestra (sin desconectar el extractor) se procedió a su destilado en un destilador Kjeltex System 1026 (Tecator). Para ello se adicionaron 50 ml de ácido bórico al 4 % y unas gotas de indicador mixto (color violáceo) en el destilador, fijando las condiciones adecuadas de destilación con 3 emboladas de NaOH al 40 %. Al final de la destilación se recogieron unos 200 ml de destilado verde brillante que se valoraron con una solución de HCl 0,1 N, anotándose los mililitros gastados para realizar los correspondientes cálculos de NT.

Cálculos:

% NITRÓGENO TOTAL (NT) = $(1,4 \times n^{\circ} \text{ ml HCl } 0,1 \text{ N})/\text{gramos de muestra}$.

% PROTEÍNA BRUTA (PB) = % NT x 6,38

La PB se expresó como gramos por cada 100 gramos de producto.

Para determinar las PB en el **queso** se partió de 1 g de queso rayado y homogeneizado que se pasó a un tubo de digestión al que se añadió media pastilla de catalizador. A continuación se añadieron 20 ml de H₂SO₄ arrastrando bien todas las partículas al fondo del tubo. Las muestras se colocaron en la batería calefactora del digestor con las tapas de vidrio conectadas al extractor y la mezcla fue digerida a potencia 5 durante 30 minutos, subiendo, pasado ese tiempo, la potencia al máximo durante 2–3 horas hasta conseguir una muestra transparente verde brillante. Tras enfriar a temperatura ambiente y destilar, se valoró el destilado con HCl 0,1 N de concentración exacta y factor conocido y los resultados se expresaron tal como se indica para la leche.

Determinación del nitrógeno no caseínico (NNC)

La fracción de NNC se obtuvo determinando el nitrógeno soluble a pH 4,6 tras la precipitación de la caseína soluble con ácido acético 10%. Una vez retirado el precipitado por filtración se determina, mediante el método Kjeldahl, el nitrógeno del filtrado representado por proteínas séricas diferentes a la caseína (albúminas, globulinas, proteosas-peptosas) y el nitrógeno no proteico.

La determinación del NNC en **leche** requirió de 50 a 100 ml de muestra. La leche, previamente calentada a 35–40 °C, se centrifuga a 3000 rpm durante 30 minutos con el fin de retirar la capa de grasa que se forma en superficie (aunque no fue necesario en este caso por tratarse de leche desnatada). A continuación se procedió a la adición de 75 ml de agua y 1 ml de ácido acético al 10 % por cada 10 ml de leche, mezclando y dejando reposar 10 minutos. Entonces, se añadió 1 ml de acetato sódico 1 M, ajustándose el pH a 4,6 y enrasando hasta 100 ml con agua, dejando en reposo la muestra durante una hora en una estufa a 30 °C de modo que el fosfato micelar se disuelva y la caseína precipite. Posteriormente se centrifugó en frío (0–4 °C) durante 30 minutos a 6000 rpm y se filtró la muestra por lana de vidrio. El filtrado, que constituye el extracto de NNC, se valoró siguiendo el método Kjeldahl referido anteriormente. Para obtener el porcentaje de NNC se aplica finalmente la fórmula:

$$\% \text{NNC} = [1,4 \times N \times (V1-V2)]/P] \times 0,994 \times 10 P$$

N: normalidad del HCl empleado en la valoración en el método Kjeldahl

V1 y V2: volumen en ml del HCl usado en la determinación y el blanco

P: peso en gramos de la leche utilizada en la determinación del NNC

0,994: factor de corrección por el volumen del precipitado

10: factor aplicado por el volumen del extracto y la dilución de la muestra inicial.

La determinación de NNC en **queso** se realizó mediante el método Kjeldahl homogenizando previamente una muestra de 20 g de queso con 45 ml de agua destilada a 6800 rpm durante 1 minuto. A continuación se ajustó el pH a 4,6 con ácido acético al 20 %. Posteriormente la muestra se dejó en baño maría a 20°C con agitación durante 60 minutos y se centrifugó a 6000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, desgrasando con espátula y filtrando por lana de vidrio. Se tomaron 10 ml del filtrado (conteniendo el nitrógeno soluble, no caseínico) para su valoración por el método Kjeldahl y se reservó el resto del sobrenadante para la determinación de NNP.

Determinación del nitrógeno no proteico (NNP)

Para la determinación del NNP se precipitaron 25 ml de **leche** con 60 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % y se enrasó con agua destilada hasta 100 ml, (concentración final de TCA del 12 %) dejando reposar durante una hora para que las proteínas precipiten. A continuación se filtró la muestra a través de papel Whatman n° 40. El filtrado constituyó el extracto de NNP del que se tomaron 10 ml para su valoración por duplicado mediante el método Kjeldahl.

Para la determinación del NNP en **queso** se tomaron 25 ml del extracto de NNC (que equivalía a una muestra original de 1 gramo) a los que se añadieron 60 ml de TCA al 20 %, enrasando a 100 ml con agua destilada. Tras dejar reposar 60 minutos y filtrar por papel Whatman, se tomaron 20 ml del filtrado para determinar el NNP por el método Kjeldahl.

Cálculos:

$$\text{NNP} = [1,4 \times 0,1 \times (V2-V1)/P] \times 0,988$$

V1 y V2: volumen en ml de HCl usado en la determinación y el blanco.

P: peso en gramos de la leche utilizada en la determinación del NNC.

0,994: factor de corrección de pérdida del volumen de la muestra en el precipitado.

- **Determinación del extracto seco total** (UNE. 34-824-83; FIL 21/1962)

Para ello fue necesaria la homogenización de la muestra (previamente atemperada a 20 °C) hasta conseguir la dispersión de la grasa. A continuación se cerró la cápsula vacía y se introdujo en la estufa a 102 °C durante 30 minutos, transcurridos los cuales se pesó la cápsula anotando su peso exacto con cuatro decimales, tarando así la balanza. Seguidamente se añadieron 3 ml de leche, anotando el peso de la muestra y se desecó la muestra a 103 °C durante 3 horas. Se dejó enfriar la cápsula tapada en el desecador durante unos 30 minutos y se determinó el peso con cuatro decimales, repitiendo el ciclo de desecación hasta que el peso se mantuviese constante (diferencia entre dos pesadas inferior a 0,5 mg).

$$\text{EST}\% = (\text{Peso en g de la muestra seca} / \text{Peso en g de la muestra}) \times 100$$

Restándole a este valor el contenido en materia grasa se obtiene el Extracto Seco Magro (ESM).

La determinación del extracto seco y humedad del **queso** requirió pesar la cápsula sin tapa con la arena y la varilla, anotando el peso con cuatro decimales y tras la tara de la balanza se pesaron 3 gramos de la muestra. Seguidamente la muestra se machacó con la varilla y la arena hasta obtener una mezcla homogénea para aumentar la superficie de evaporación, tras lo cual se colocó la cápsula con la varilla dentro y la tapa al lado en la estufa a 102 °C durante 3 horas. Una vez enfriada la cápsula se pesó repitiendo el proceso de secado (30 minutos), enfriado y pesada hasta llegar a un peso constante.

- **Determinación de cloruros**

Para poder determinar la presencia de cloruros en la **leche** se hizo una dilución de la muestra con agua desionizada al 1:1 (v:v). La concentración de cloruros de la muestra se midió en el clorurómetro (Model 926) previamente calibrado con un patrón de 200 mg/L de NaCl, tomando una alícuota de 0,5 ml de la dilución, y multiplicando por dos

(factor de dilución) el resultado obtenido. Las unidades se expresaron como mg/100g de leche (sal) o mg/L (cloruros).

Al igual que para la leche, la determinación de cloruros en **queso** se llevó a cabo en el clorurómetro a partir de 1 g de queso triturado y homogenizado con agua MilliQ (1:50, p:v). Tras la centrifugación de la muestra durante 15 minutos a 5000 rpm, se llevó hasta 100 ml en un matraz aforado sin remover el sedimento y se tomó una alícuota de 0,5 ml que se midió en el clorurómetro. La concentración real de la muestra sería % de mg de NaCl (dividiendo por 10 la lectura) y % de cloruros dividiendo por 100.

- **Determinación de lactosa y ácidos orgánicos**

Se utilizó el método descrito por Cárcoba *et al.* (2000). Sobre 5 ml de **leche** o 5 g de **queso**, se añadieron 25 ml de H₂SO₄ 4,5 mM y se mezclaron durante una hora en una incubadora orbital a 37 °C. El sobrenadante se separó por centrifugación y se filtró por papel de filtro Whatman del nº 1. La separación de las fracciones se llevó a cabo sobre una columna de intercambio iónico HPX-87H Aminex (300 x 7,8 mm) protegida por un cartucho catiónico Microguard H⁺ (Bio Rad, Richmon, California, EE.UU). Como fase móvil se usó H₂SO₄ 3 mM en agua Milli-Q a una temperatura de 65 °C, con un flujo de 0,7 ml/min y un volumen de inyección de 50 µl. Se conectaron en serie un detector fotodiódico para la determinación de ácidos orgánicos y un refractómetro diferencial a 410 nm para la determinación de lactosa, controlados por el software el sistema Millennium 2010 (Waters, Milford, EE.UU). Las longitudes de onda elegidas para las medidas fueron 210 y 280 nm, respectivamente.

Los estándares de ácidos orgánicos y azúcares fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St Louis, EE.UU). Las soluciones de cada tipo de ácido se prepararon en agua, excepto para el orótico y el úrico, que se prepararon en NaOH 0,1 N. Los ácidos se mezclaron en distintas proporciones para obtener las curvas de calibrado así como una solución estándar de lactosa.

8. Estudio del efecto de AS-48 en masas cárnicas

8.1. Efecto de la adición de AS-48 a masas cárnicas tipo salchicha y hamburguesa

El ensayo, efectuado para investigar la evolución de la población de mesófilos totales que determina la vida media del preparado, se realizó con una mezcla de carne de cerdo y vacuno (50 % de panceta de cerdo y 50 % de magro (40 % de magro de cerdo y 60 % de magro de vacuno)) sometida a una operación de picado continuo mediante picadora provista con placas de orificios de 6 mm de diámetro.

La mezcla cárnica para salchichas fue adicionada de un preparado comercial específico (DMC: 20 g/K sal, 10 g/K almidón, 4 g/K azúcares, 2 g/K pimienta, 8 g/K aromas naturales, 1 g/K E-221, 0,5 g/K E-316, 0,25 g/K citrato sódico, 0,15 g/K E-128 y 0,08 g/K E-120) en una proporción del 10 %. La mezcla para hamburguesas fue adicionada de 18 g de sal y de 1,5 g de pimienta por kilo. Este preparado se dispersó, en el caso de los lotes control, en agua fría (20 %, p:v, para ambos productos, salchichas y hamburguesas) a la que se le había eliminado el cloro o, en los tratados, en una preparación de AS-48 semipurificada por CM25 a una concentración estimada de 500 µg/ml y posteriormente se mezcló con las carnes picadas amasando homogéneamente de 3 a 4 minutos (concentración final máxima de AS-48 = 100 µg/g carne). Los lotes destinados a la elaboración de salchicha pasaron a la embutidora (tripa de cordero) y aquellos destinados a la fabricación de hamburguesa pasaron a la formadora de hamburguesas. El producto terminado, 2 tripas de salchicha o 6 hamburguesas, se almacenó en bandejas de poliestireno tapadas con plástico alimentario a temperatura de refrigeración (5 °C aprox.). Periódicamente (0, 2, 4 y 6 días en el caso de las hamburguesas y 1, 5, 8 10 y 14 días en el de las salchichas) se extrajeron muestras por triplicado de los dos lotes (control y tratado) procediéndose al análisis de las mismas.

Para el análisis microbiológico de las muestras se procedió según la metodología empleada en DOMCA, en esencia descrita por Pascual Anderson (1999).

Para la determinación de bacterias mesófilas totales, estafilococos y mohos y levaduras, las muestras fueron homogeneizadas mediante un homogeneizador de paletas

(Masticator, IUL) y, a continuación, el extracto fue diluido decimalmente en solución salina estéril, inoculado en los medios apropiados e incubado a las temperaturas que se relacionan en la tabla siguiente.

Para determinar la presencia de *Salmonella* 25 g del producto cárnico fue inoculado en 225 ml de agua de peptona, mezclado e incubado a 37 °C durante 18 h. A continuación 10 ml del cultivo de pre-enriquecimiento se inocularon en 100 ml de caldo selenito-cisteína, incubándose 18 h a 37 °C. A partir de los cultivos líquidos de enriquecimiento se sembraron mediante asa y por duplicado sobre dos medios sólidos selectivos y diferenciadores para *Salmonella*: agar Hektoen y agar *Shigella-Salmonella*. Las colonias que presentaban el aspecto típico de *Salmonella* fueron posteriormente confirmadas mediante las oportunas pruebas bioquímicas (triple azúcar-hierro, ureasa, lisina descarboxilasa).

Para la determinación de coliformes totales se prepararon tres series de tubos conteniendo 10 ml de caldo lactosado biliado verde brillante (Brila) y se procedió con ellos de la siguiente forma:

- En cada uno de los tubos de la primera serie se vertió 1 ml de la dilución 1:10 de la muestra.
- En cada uno de los tubos de la segunda serie se vertió 1 ml de la dilución 1:100 de la muestra.
- En cada uno de los tubos de la tercera serie se vertió 1 ml de la dilución 1:1000 de la muestra.

A continuación se incubaron las tres series a 30 ° durante 24 y 48 h y se registraron los tubos positivos de cada serie, con gas en la campana, y con ayuda de la Tabla del Número Mas Probable se obtuvo el recuento de coliformes totales por gramo de muestra.

Para la investigación y recuento de los coliformes fecales se subcultivaron mediante asa todos los tubos que habían dado positivo en la determinación de coliformes totales en nuevos tubos conteniendo el mismo medio Brila con campana Durham y se incubaron a 44 °C durante 24 y 48 h. Los tubos positivos, con gas en la campana, se confirmaron diseminando mediante asa en agar EMB para obtener colonias típicas, rojo oscuro con centro negro y brillo verde metálico. Estas fueron confirmadas mediante la prueba de indol.

Microorganismo	Medio de cultivo-T ^a de incubación	Tiempo de lectura
Mesófilos	PCA, 30 °C	24, 48 y 72 h
Estafilococos	Agar Baird-Parker, 37 °C	24 y 48 h
Salmonelas:		
Pre-enriquecimiento	Agua de peptona, 37 °C	18 h
Enriquecimiento	Caldo Selenito–cistina, 37 °C	18 h
Aislamiento e identificación	Agar <i>Shigella–Salmonella</i> , 37 °C	24 y 48 h
	Agar Hektoen, 37 °C	24 y 48 h
Coliformes totales	Caldo Brila, 30 °C	24 y 48 h
Coliformes fecales	Caldo Brila, 44 °C	24 y 48 h
<i>E. coli</i>	EMB, 44 °C	24 h
Mohos–levaduras	Saboureaud Cm, 25 °C	5 d

Tabla 2.- Medios de cultivo, temperaturas de incubación y tiempos de lectura empleados para los distintos grupos de microorganismos analizados en carnes.

Para el análisis sensorial, las muestras fueron cocinadas a la plancha sin grasas y se escogió una paleta de 6 catadores que determinaron el sabor, olor, textura y color de las muestras.

La presencia de bacteriocina se determinó según lo descrito en el apartado 5.3.

8.2. Efecto inhibitor de AS-48 sobre *Brochothrix thermosphacta*

8.2.1 En medios de cultivo de laboratorio. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) para *Br. thermosphacta*

La concentración mínima bactericida (CMB) se define como la concentración mínima de bacteriocina que provoca la muerte del 99,9 % del cultivo inicial. Para su determinación, se adicionaron diferentes concentraciones de bacteriocina a cultivos

líquidos en medio BHI en fase logarítmica de crecimiento (aprox 10^6 UFC/ml) y se incubaron a 4, 15 o 26 °C, según el caso y se determinó el número de células viables tanto en el momento de la adición como tras 24 h y 48 h de incubación.

Se comprobó también la influencia del pH en la sensibilidad de *Br. thermosphacta* a la bacteriocina, adicionándola a cultivos en medio BHI disuelto en tampón a pH 5,5, 7, o 8,6 incubando a 26 °C y procediendo como se ha expuesto mas arriba.

8.2.2. En alimentos cárnicos

Para estudiar el efecto inhibitor de AS-48 en sistemas cárnicos, se emplearon como sistemas modelo, filetes de carne de ternera de aproximadamente 0,5 cm de grosor y jamón cocido loncheado, por ser estos alimentos en los que mas frecuentemente se han referido problemas de alteración debidos a esta bacteria. Siguiendo el protocolo descrito por Cutter y Siragusa (1998), las muestras se aplicaron sobre lonchas de carne de 7,5 x 7,5 cm previamente irradiadas con luz UV (Cutter y Siragusa, 1994). Los cultivos de una noche de *B. thermosphacta* se diluyeron en solución salina en proporción 1: 1000 para obtener una suspensión de células de aprox. 10^6 UFC/ ml. El inóculo fue pulverizado en condiciones asépticas a razón de 10 ml por cada 3 unidades de carne para obtener un recuento inicial en torno a 10^{3-4} UFC/ cm^2 y dejado en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente. La solución de bacteriocina, preparada a partir de una muestra semi-purificada sobre CM25, tenía una concentración aproximada de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y fue dializada para eliminar el contenido en sales y diluida hasta una concentración de 10, 25 y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en agua destilada estéril. Su aplicación se realizó mediante pulverización de forma similar que la suspensión de bacterias dejando reposar 5 min. Se hicieron dos experimentos independientes para cada concentración de bacteriocina consistentes en dos lotes cada uno, el tratado y el no tratado. Por cada tiempo de muestreo (0, 1, 2, 7 y 14 días) se dispusieron 3 unidades de carne que se envasaron en condiciones asépticas en papel de aluminio esterilizado y se almacenaron a 4 °C. Para los muestreos se tomaron 3 porciones de 25 cm^2 de cada unidad que fueron trituradas con 25 ml de agua de peptona modificada en bolsas provistas de filtro en un homogeneizador de paletas (Masticator) durante 2 minutos. Un mililitro del filtrado resultante fue centrifugado a 13000 rpm durante 5 minutos para retirar las células y

ensayar la actividad por la técnica de los pocillos y/o de la gota. Para cada muestra se prepararon diluciones seriadas que fueron sembradas en medio STAA, selectivo para *Brochothrix* e incubadas durante 48 h a 26 °C antes de realizar los recuentos.

En el caso del jamón cocido loncheado se ensayó, además, el efecto combinado de AS-48 y el tripolifosfato sódico (TPF) al 0,3 o 0,5 % y, en este caso, la bacteriocina fue diluida en la solución estéril de TPF y pulverizada sobre el alimento. Se hicieron dos experimentos independientes para cada concentración de bacteriocina consistentes en tres lotes (tratado con TPF, con TPF y AS-48 y sin tratar) y se procedió de idéntica forma que en el caso anterior.

9. Análisis estadístico

En los experimentos realizados en sistemas alimentarios se aplicó un análisis estadístico a los resultados. Para ello se utilizó el programa SPSS-PC 12.0 (SPSS, Chicago, Illinois, EE.UU). Los datos relativos a los recuentos microbiológicos, pH, acidez, consumo de lactosa, producción de ácidos orgánicos, proteína, extracto seco, etc., en los diferentes tiempos de incubación se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) usando como factor la presencia o ausencia de las cepas bacteriocinogénicas o de la enterocina en su caso.

RESULTADOS CAPÍTULO I

I. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA RECUPERACIÓN DE AS-48 A PARTIR DE SUSTRATOS LÁCTEOS

En el desarrollo tecnológico de una sustancia antimicrobiana para su aplicación como conservante alimentario es necesario determinar, según las características del alimento y de acuerdo con la legislación vigente, la forma del preparado más adecuada y con mayor actividad, sea en forma de cultivo iniciador o de preparado activo crudo o semipurificado. Dicho preparado debe mantenerse activo en el tiempo y su obtención ser económicamente viable.

Debido a que los medios de cultivo empleados rutinariamente para el crecimiento de nuestras cepas productoras y la producción de la enterocina eran de alto coste y estaban suplementados con extractos de vísceras, se recurrió a distintos subproductos de la industria quesera, ricos en nutrientes y con bajo coste de comercialización. Los productos seleccionados fueron lactosuero crudo, lactosueros liofilizados y lactalbúmina.

1. Optimización de la producción en sustratos lácteos (lactosueros y lactalbúmina)

El lactosuero (LS) es un subproducto lácteo de origen industrial obtenido tras la coagulación de la leche y el desuerado de la cuajada cuya eliminación, debido al enorme volumen que se genera del mismo y su alto contenido en materia biodegradable, supone un problema serio de contaminación medioambiental. A partir del lactosuero crudo se obtienen diversos preparados por fraccionamiento y/o desecación del mismo que tienen aplicación especialmente en la industria alimentaria. Además, su alto contenido en nutrientes lo convierte en un medio de cultivo microbiológico excepcional. Uno de los derivados industriales del lactosuero es la lactalbúmina, que se obtiene mediante un proceso de separación del suero crudo, evaporación, separación de la lactosa, desmineralización, nueva evaporación y finalmente secado mediante atomización.

1.1. Producción de AS-48 en lactosuero crudo

Este tipo de LS fue suministrado por la Empresa DHUL y se trata de un LS dulce obtenido tras coagulación enzimática de la leche en el proceso de fabricación del queso fresco. Se ensayó inoculando un cultivo de una noche de la cepa productora *E. faecalis*

A-48-32 al 4% sobre LS e incubando a 28 °C en reposo. Esta cepa ha sido la utilizada en la generalidad de los experimentos de optimización de la producción de AS-48 a menos que se indique específicamente alguna otra. Se extrajeron muestras de los cultivos a las 12 y 24 h y se ensayó la actividad inhibidora de los sobrenadantes frente a *E. faecalis* S-47 mediante la técnica de los pocillos. Cuando se ensayó el LS diluido a la mitad con agua destilada, la producción disminuyó por lo que se optó por usarlo sin diluir.

Una vez comprobado que AS-48 era producido en LS crudo, se procedió a la estabilización del LS para alargar su vida media en el laboratorio y, sobre todo, para que la carga microbiana que contenía no interfiriese con el crecimiento de la cepa A-48-32 ni con la producción de la bacteriocina. Para ello se dispusieron alícuotas de 10 ml a las que se les aplicó una serie de tratamientos térmicos durante diferentes tiempos, comprobando a continuación la contaminación residual y la capacidad del medio para sostener la producción de AS-48. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tratamiento	mm halo tras		Contaminación (tras incubar 48 h a 37 °C)
	12 h	24 h	
100°- 5 min	10	10	Sí
100°- 10 min	10	10,5	Sí
110°- 10 min	10,5	10,5	No
115°- 10 min	10	11	No

Tabla 1.- Tratamientos térmicos de estabilización aplicados al LS (DHUL).

De acuerdo con estos resultados se decidió aplicar al LS un tratamiento térmico de 110 °C durante 10 min antes de su uso para producción de AS-48.

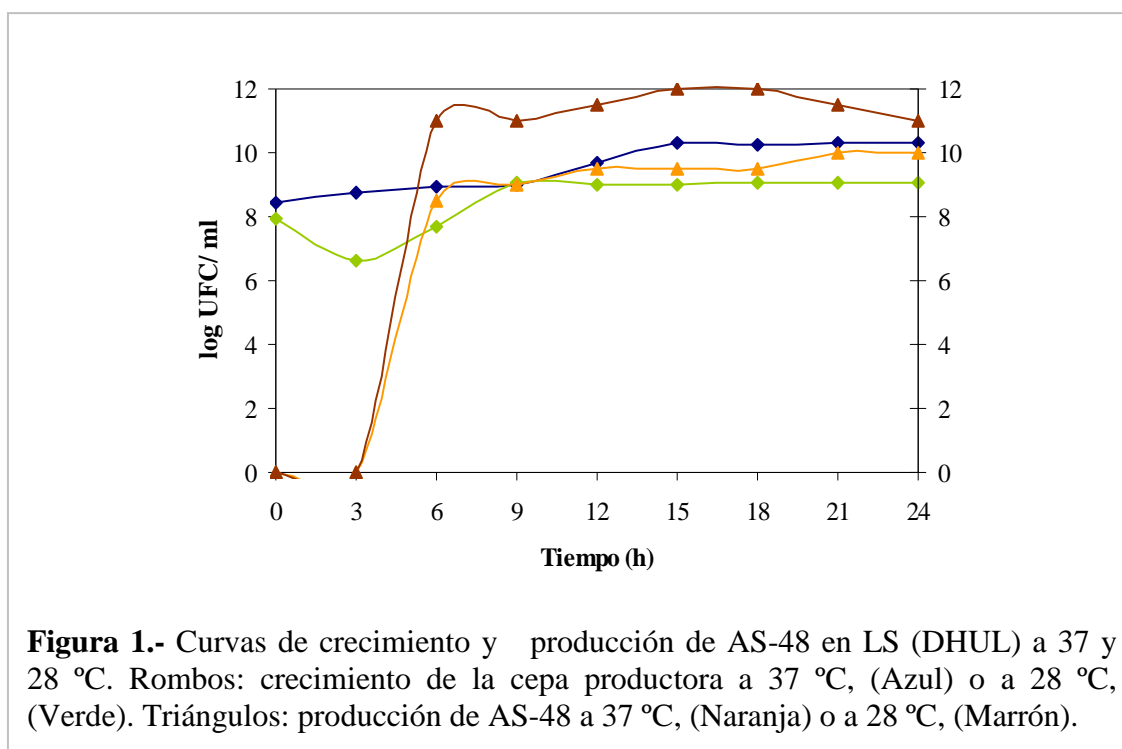
A continuación se procedió a optimizar la producción de la enterocina en este medio, estudiando el efecto de la adición de diversos complementos nutricionales (glucosa, 0 a 5 %, peptonas de carne y soja al 0,25 %), de la estabilización de pH del medio (adicionando NaOH 0,1 N o HCl 0,02 N para mantener el pH del medio en 5, 6 y 7) y finalmente el efecto de mantener el cultivo en agitación, oxigenación o reposo.

Hay que señalar que aunque en varios apartados de este capítulo, sobre todo en los de optimización de la recuperación, se ha expresado la actividad en UA/ml, en los de optimización de las condiciones de producción y en general en los que se obtenían

títulos más bajos de bacteriocina, sobre todo en las primeras horas del cultivo se ha optado por representar la actividad como mm del diámetro de halo de inhibición de los sobrenadantes sobre la cepa indicadora *E. faecalis* S-47. Esta decisión ha sido motivada por el hecho de que los sobrenadantes de cultivo con diámetros de inhibición comprendidos entre 9 y 12 al ser titulados en su contenido en UA/ml mediante el método de la dilución al límite de la muestra daban valores idénticos. En cambio cuando los diámetros del halo de inhibición aumentaban por encima de los 13 mm el incremento de las UA/ml eran mucho mayor. Se ha expresado por tanto la actividad en mm del halo de inhibición pero a la hora de comparar los máximos títulos se refieren las UA/ml alcanzadas por entender que dan una idea mas real de la mejora obtenida.

1.1.1. Efecto de la temperatura

Se ensayó también el efecto de la temperatura de incubación sobre la producción de la enterocina, incubando sendos cultivos en LS a 15, 28 y 37 °C. Los resultados pusieron de manifiesto que la temperatura óptima de crecimiento de la cepa (37 °C) no se correspondía con la mayor producción de AS-48. A 15 °C no se detectó producción alguna.



1.1.2. Efecto de la adición de glucosa

Se prepararon diferentes alícuotas de LS que fueron suplementadas con cantidades crecientes de glucosa desde 1 % al 5%, inoculadas con la cepa *E. faecalis* A-48-32 e incubadas a 28 °C en reposo. A las 0, 12 y 24 h, se tomaron muestras para determinar la actividad inhibidora de los sobrenadantes de cultivo. Los resultados obtenidos se recogen en la Fig. 2.

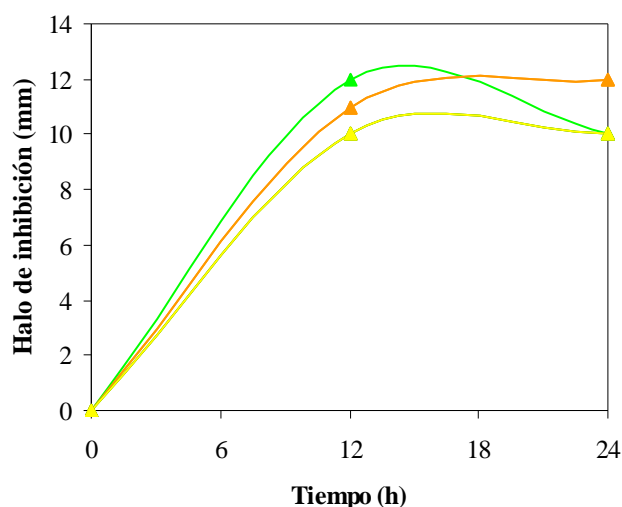


Figura 2.- Producción de AS-48 en LS (DHUL) enriquecido con distintas concentraciones de glucosa. Naranja: 0 y 1 % de glucosa. Verde: 3 % de glucosa. Amarillo: 2, 4 y 5 % de glucosa.

Hay que señalar, que aun cuando en muchos casos, como se presenta en la Fig. 2, la adición de glucosa al 1 o al 3% no tenía ningún efecto sobre la producción de AS-48 en comparación con los cultivos no suplementados, o si lo tenía era mínimo, sin embargo en sucesivos experimentos realizados con distintos lotes de LS crudo se vio que se obtenían resultados más homogéneos y reproducibles cuando se añadía el azúcar. Por ello se decidió suplementar siempre con 1% de glucosa para intentar salvar la dificultad que representaba la composición tan heterogénea de los distintos lotes del LS. La falta de reproducibilidad en los resultados de producción de AS-48 también se observaba dentro de un mismo lote cuando este se almacenaba durante algunas semanas, aunque fuese congelado.

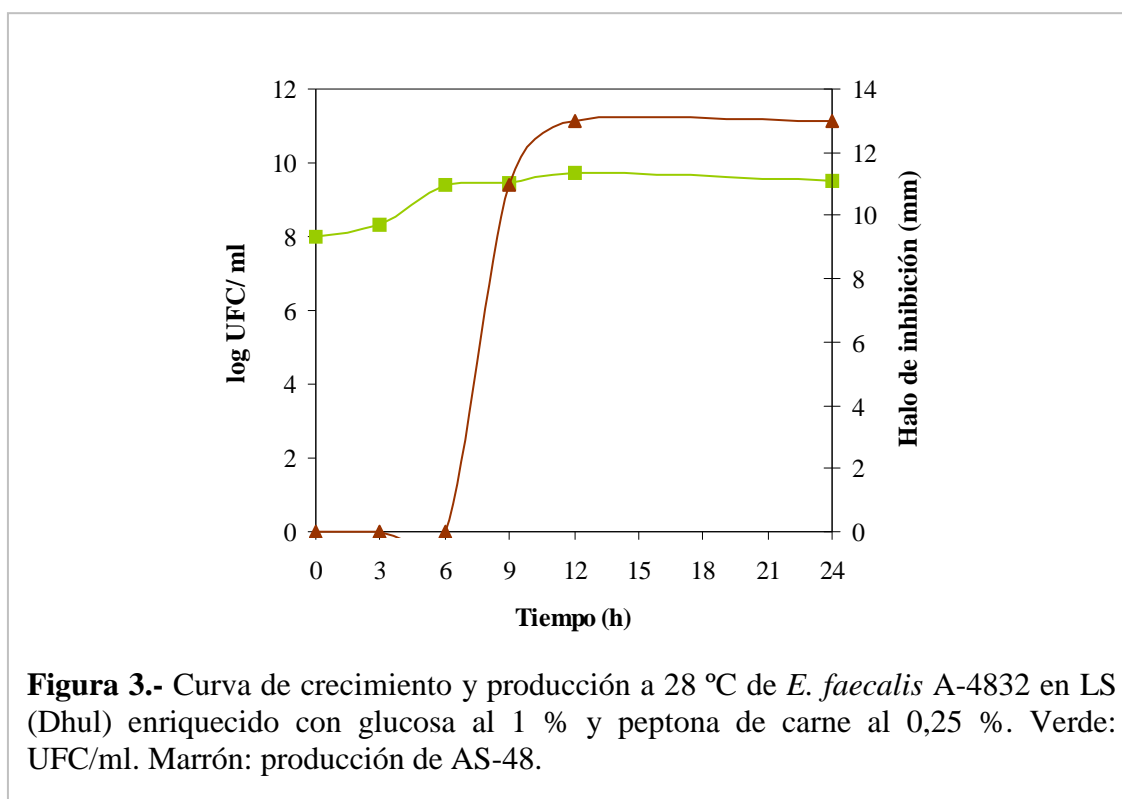
1.1.3. Efecto de la adición de peptonas

A continuación se procedió a enriquecer el medio con peptona de soja y de carne (Scharlab) o ambas al 0,25 %. A intervalos regulares de tiempo, se recogieron muestras de los distintos cultivos para determinar actividad y pH. Los resultados se recogen en la Tabla 2. En ella se observa el anteriormente comentado efecto de la heterogeneidad de los distintos lotes de LS crudo en la producción de AS-48, ya que en este caso no se obtuvo producción en los cultivos en LS sin suplemento nitrogenado.

Tiempo (h)	Control	P. Soja	P. Carne	Mezcla
0 h	-	-	-	-
3 h	-	-	-	-
9 h	-	11	11	11
12 h	-	13	13	13
24 h	Hilo	13	13	13

Tabla 2.- Efecto de la adición de peptona de soja y peptona de carne sobre la producción de AS-48 en LS DHUL.

Una vez determinada la mejora en la producción debida a la combinación de glucosa al 1 % y algún tipo de peptona al 0,25 %, se procedió a realizar una curva de crecimiento y de producción de la cepa A-48-32 en LS enriquecido con ambos nutrientes inoculado al 4 % y e incubado a 28 °C en reposo.



1.1.4. Efecto del pH

Para tratar de determinar el efecto del pH sobre la producción de AS-48 en LS enriquecido con 1% de glucosa, se hicieron tres alícuotas del mismo que se inocularon al 4 % con la cepa productora. Cada alícuota se trató de mantener a pH constante de 5, 6 o 7 respectivamente mediante la adición periódica y manual de NaOH 1 N según fuese necesario. El experimento se mantuvo durante 12 horas en reposo resultando al fin del mismo, que el mantenimiento del medio a un pH próximo a 7 favorecía la producción de la enterocina (10 mm de halo frente a los 8,5 mm de halo a pH 5 o 6). De nuevo hay que señalar la falta de homogeneidad de los resultados obtenidos en este y anteriores experimentos.

1.1.5. Efecto de la oxigenación

Para medir el efecto de la oxigenación sobre la producción de AS-48 se repitió el experimento anterior pero incubándolo ahora en condiciones de reposo o agitación (200 rpm) respectivamente. Tras 12, 24 y 48 h de cultivo se extrajeron muestras para determinar la actividad inhibitoria en los sobrenadantes. Los resultados mostraron que la

producción de la bacteriocina no se afectaba por las condiciones de reposo o agitación del cultivo.

1.2. Producción en distintos tipos de subproductos del lactosuero

El LS crudo es un producto muy inestable desde el punto de vista microbiológico que había que almacenar congelado o bien recoger con asiduidad de fábrica para evitar su alteración. Por otro lado su composición era muy heterogénea dependiendo de la estación y de la proporción de los tipos de leche empleados en la fabricación del requesón, lo que influía sobre la producción de AS-48 que, como se ha podido observar era muy variable en función del lote de lactosuero usado. Con objeto de superar estos inconvenientes y de estandarizar las condiciones de producción se decidió ensayar diversos lactosueros comerciales liofilizados: Lacprodán, Lysolac 30/NF y Bellac así como lactalbúmina Esprión 300 también liofilizada. Los preparados liofilizados fueron inicialmente reconstituidos al 6 % en agua destilada, agitando con un agitador magnético para favorecer la disolución del sustrato, y los caldos resultantes fueron inoculados al 4% con un cultivo de una noche de la cepa productora e incubados en reposo a 28 °C, tomando muestras a distintos tiempos de incubación para valorar la actividad inhibidora de los sobrenadantes de cultivo.

Los valores máximos de bacteriocina obtenidos en los diferentes sustratos ensayados se presentan en la Tabla 3, en la que se han obviado los lactosueros Lacprodán y Lysolac 30/NF por no haberse detectado actividad en ellos. El medio que mejores resultados dio, en términos de actividad por ml de cultivo (UA/ml), fue lactalbúmina (LA), en la que se produce el doble de la obtenida en lactosuero crudo o liofilizado Bellac. Los recuentos celulares en los tres tipos de sueros lácteos resultaron ser muy similares, obteniéndose números máximos de células viables en torno a 10⁹ UFC/ml.

Medio de cultivo	UA/ml
LS Dhul	10
LS Bellac	10
LA	20

Tabla 3.- Producción de AS-48 en distintos sustratos lácteos.

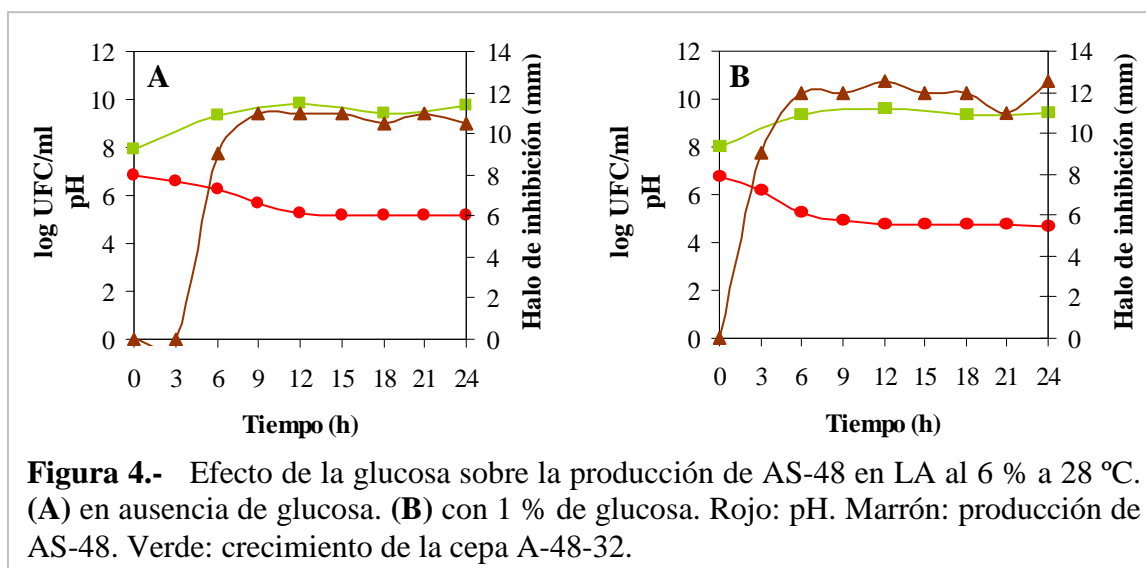
1.3. Optimización de la producción en lactalbúmina (LA)

Una vez seleccionada la LA como sustrato para el crecimiento de la cepa bacteriocinogénica y la producción de la bacteriocina, se estudió la influencia sobre la producción de AS-48 de diferentes factores (nutricionales y de otro tipo).

1.3.1. Efecto de la glucosa y del inóculo

Por los experimentos realizados en LS crudo se conocía el efecto favorecedor de la adición de glucosa a determinadas concentraciones. Por ello se comprobó el efecto de la adición de 1% de glucosa al medio LA sobre la producción de AS-48.

Como puede verse en la Fig. 4, en los cultivos adicionados de glucosa se incrementó la producción de la bacteriocina a una producción máxima en torno a 12,5 mm en los diámetros de inhibición de los sobrenadantes de cultivo frente a los valores máximos de 11 mm determinados en los cultivos sin glucosa. Además se adelantó la producción de AS-48 en el tiempo, detectándose por primera vez en los cultivos a las 3 h frente a las 6 h en las que aparecía en los cultivos sin glucosa.

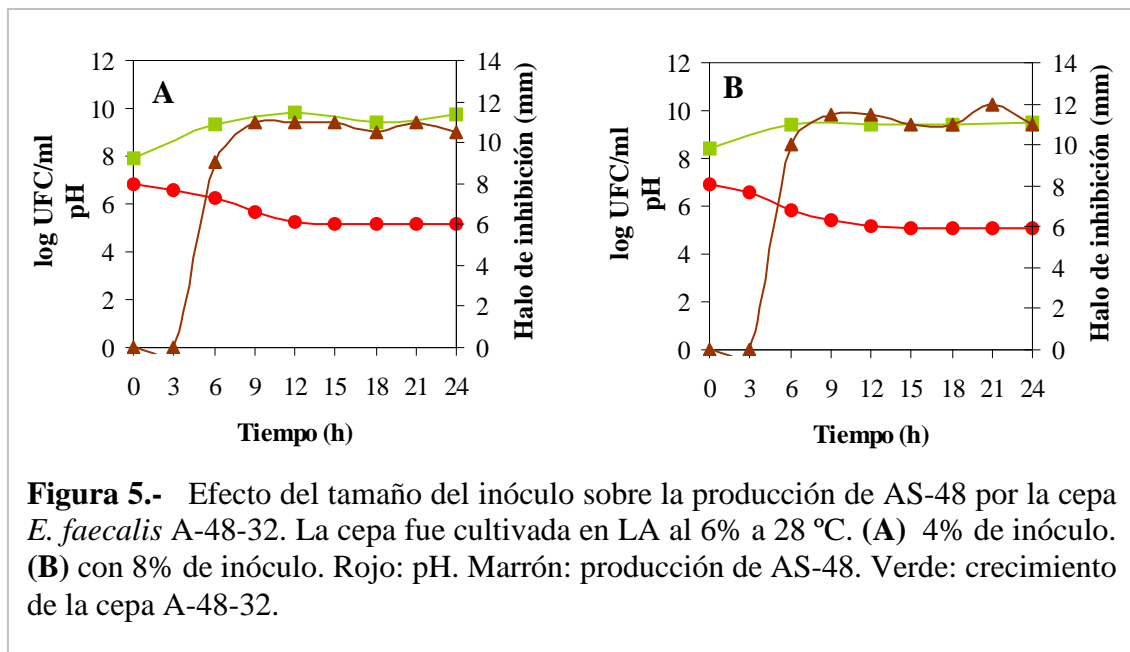


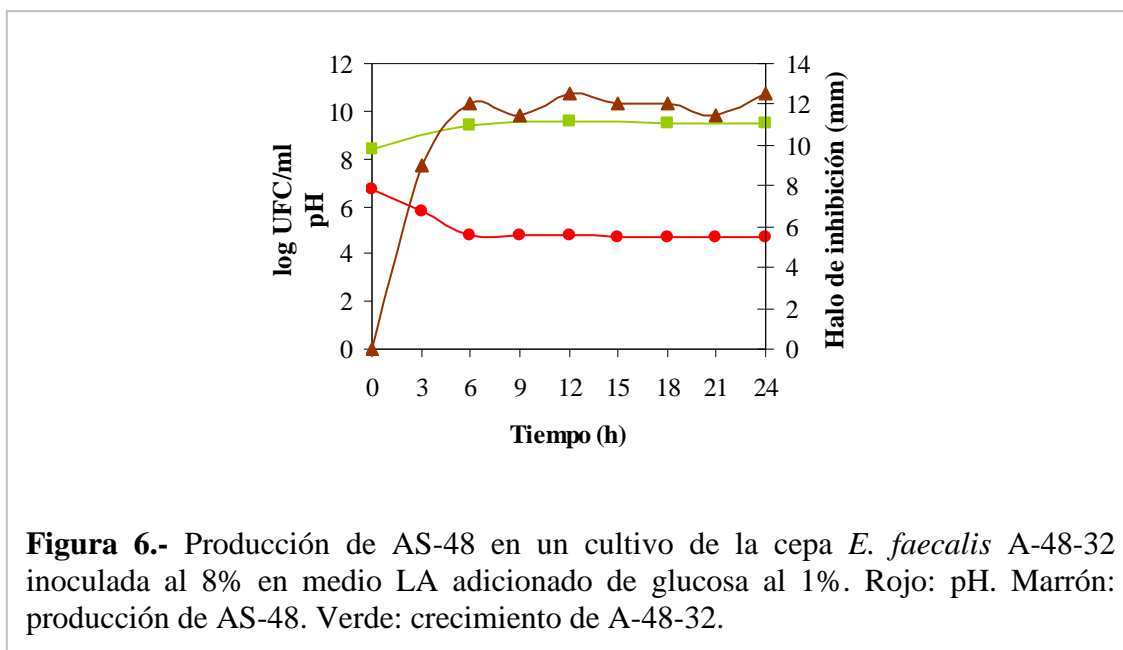
También se consideró conveniente investigar la influencia del tamaño del inóculo empleado en la producción de AS-48, que, habitualmente, era del 4%. De hecho, parecía aconsejable utilizar inóculos más altos (8%) para acelerar la implantación de la bacteria productora y minimizar el efecto de las posibles contaminaciones, ya que a este sustrato de crecimiento (LA) había que aplicarle tratamientos térmicos por debajo de los

estándares de esterilización o incluso no aplicarlos, para evitar de un lado la formación de grumos que interfirieran con la recuperación de la bacteriocina y de otro que menguara la capacidad del medio para sostener la producción de la misma.

En la Fig. 5, se muestra la producción de AS-48 en cultivos de LA con o sin glucosa e inoculados con la cepa productora A-48-32 al 8%. Los resultados demuestran una producción ligeramente mayor de AS-48 en los cultivos establecidos con inóculos más altos (8%). Por tanto, por las razones arriba mencionadas, a partir de entonces se empleó este inóculo inicial de células productoras.

En la Fig. 6, se representa la curva de crecimiento y de producción de AS-48 así como las variaciones del pH del cultivo en LA adicionado de glucosa al 1% e inoculado al 8% con la cepa A-48-32. Si se comparan estos resultados con los de la Fig. 5, se observa un incremento en cuanto a la producción total así como adelanto en el tiempo, atribuible a la presencia de la glucosa.

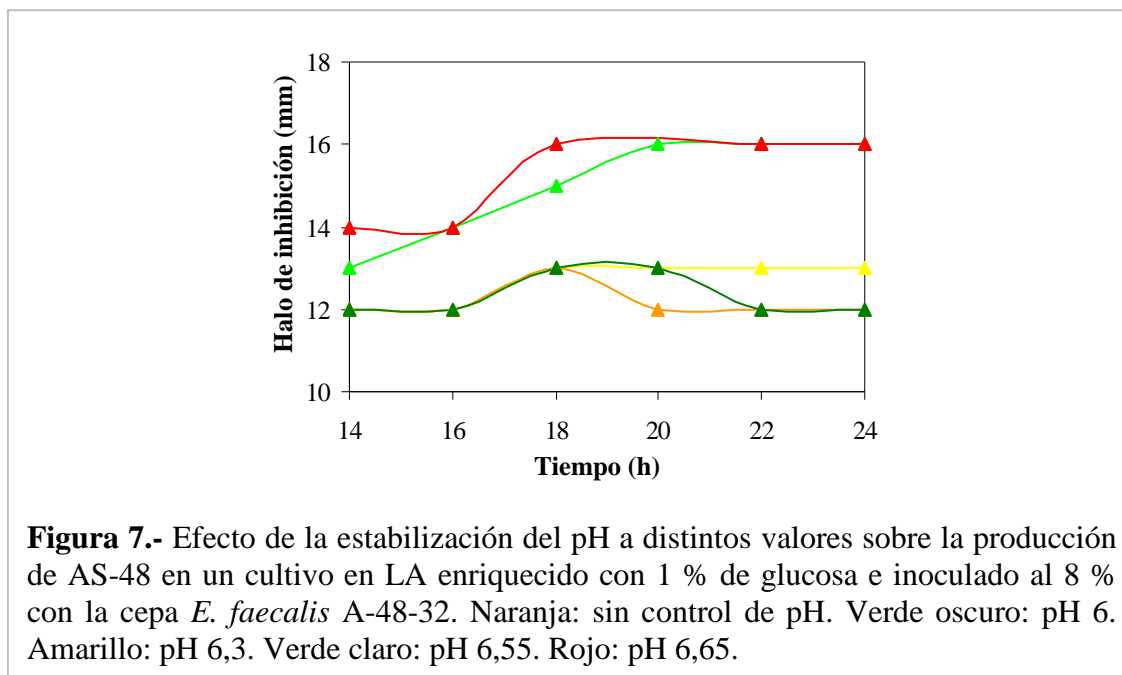




1.3.2. Efecto del pH

Como se ha podido comprobar en los resultados expuestos, en los cultivos realizados en LA se producía una bajada de aprox. 2 unidades de pH (desde 6,68 hasta 4,68) durante las primeras 9 h de incubación, que coincidía con la estabilización de los niveles de bacteriocina en los cultivos al entrar en fase estacionaria. Por ello se procedió a estabilizar el pH de los mismos mediante el empleo del sistema Titrino 719 S (Metrohm, Herisau, Suiza) para medida y control de pH. Para ello, se llevaron a cabo cuatro cultivos en LA adicionada de glucosa al 1% e inoculados al 8 % con la cepa A-48-32, manteniendo el pH a 6, 6,3 6,55 y 6,65, respectivamente y extrayendo muestras a partir de las 14 h para valorar su actividad antimicrobiana.

En la Fig. 7, se pone de manifiesto el efecto favorecedor de la amortiguación del pH en valores entre 6,55-6,65 sobre la producción de AS-48, la cual se incrementó y se mantuvo estable en el tiempo alcanzándose diámetros de inhibición de hasta 16 mm, lo que en términos de UA/ml, representaba un incremento considerable, de 40 a 160 UA/ml.



Hay que señalar que en los cultivos con el pH controlado se estableció una agitación suave mediante un agitador magnético (Agimatic HL, JP Selecta, Barcelona) que fue para los cultivos de 10 L de 114 rpm y para los de 5 L de 85 rpm.

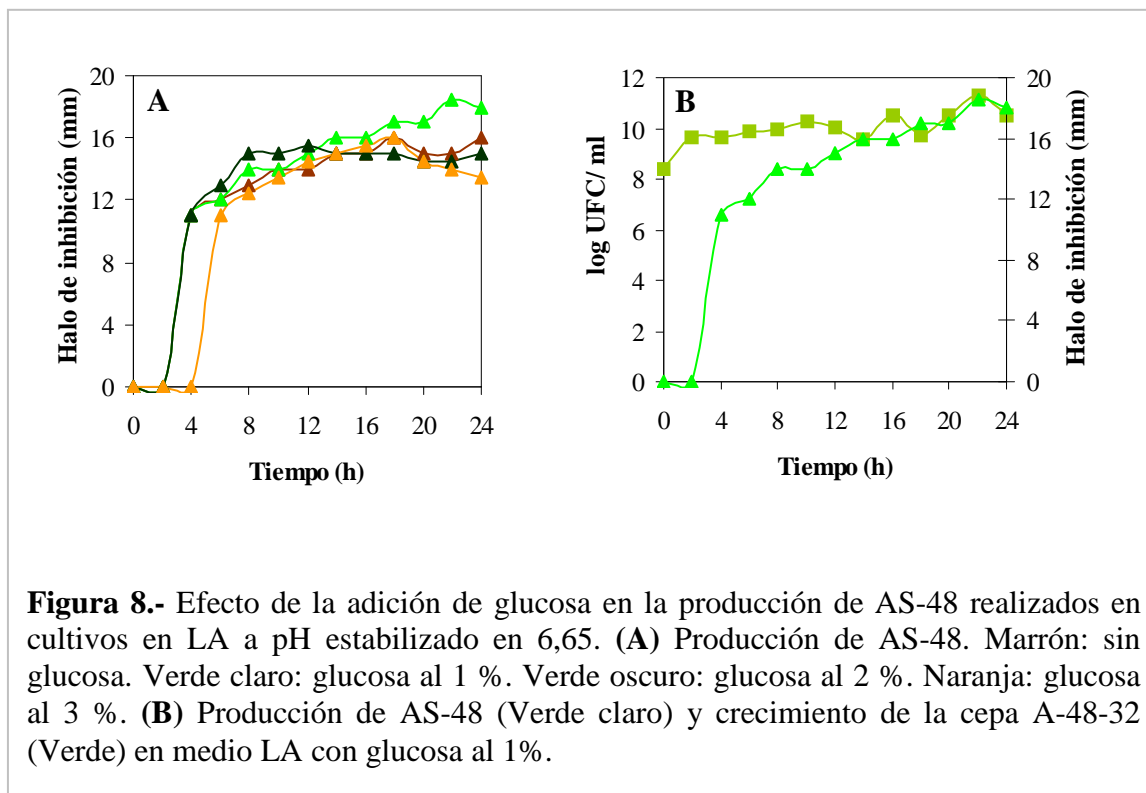
1.3.3. Efecto de la concentración de glucosa sobre cultivos en LA con pH estabilizado

Una vez conocido el efecto positivo de la estabilización del pH en torno a 6,55-6,65, se investigó si el incremento de glucosa en el medio por encima del 1%, en condiciones en que la acumulación de ácidos producidos durante la fermentación no bajara el pH, favorecía la producción de la bacteriocina. Para ello se ensayaron diferentes cultivos en LA con el pH mantenido en 6,65 y adicionados de 0, 1, 2, y 3 % de glucosa, respectivamente.

Los resultados mostrados en la Fig. 8, indican que la concentración de glucosa más favorable para la producción de AS-48 en LA, era la del 1% y que cuando se adicionaban porcentajes superiores al medio, no sólo no se incrementaban los niveles máximos de bacteriocina, sino que incluso disminuían ligeramente.

Hay que señalar que, aunque siendo mucho más homogéneos estos resultados que los obtenidos con LS crudo, la producción de AS-48 no siempre era idéntica aunque se hiciera en las mismas condiciones, oscilando, en condiciones óptimas, los diámetros de inhibición de 16 a 18,5 mm. Esto probablemente sea debido a que al ser suministrado el

sustrato (LA) en sacos de 25 Kg, es de esperar que se establezca a lo largo del envase un cierto gradiente en la concentración de los nutrientes.



1.3.4. Efecto de la adición de peptona

Puesto que en los experimentos realizados con LS crudo, la adición de peptonas, soja y/o carne, mostraron un efecto favorecedor sobre la producción de bacteriocina, se decidió ensayar este complemento nitrogenado en LA para comprobar si también en este caso mejoraba la producción.

Los resultados (Fig. 9) ponen de manifiesto que la peptona, al contrario de lo esperado, tenía un cierto efecto negativo sobre la producción de AS-48, manifestado tanto en el retraso de la producción (de 2 a 4 h) como en los niveles máximos alcanzados. Efectivamente, la máxima producción de AS-48 en los cultivos adicionados de peptona, en presencia o no de glucosa, fueron de 17 mm (diámetro del halo de inhibición) a las 16-18 h de cultivo. A partir de este momento los niveles de AS-48 comenzaron a declinar y a las 24 h ya estaban en torno a 13-14 mm. Por el contrario, en los cultivos no suplementados con peptona la producción de AS-48 siguió aumentando hasta alcanzar un diámetro del halo de inhibición de 18 mm.

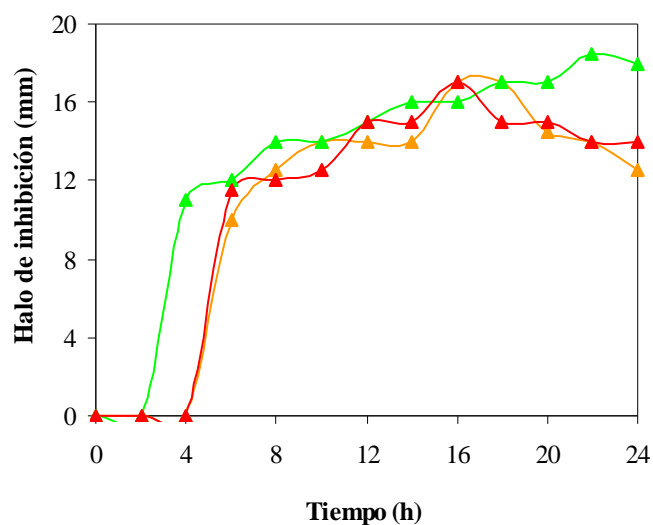


Figura 9.- Producción de AS-48 en medio LA a pH constante de 6,65. Verde claro: con glucosa al 1 %. Naranja: con peptona de carne al 0,25 %. Rojo: con glucosa 1 % + peptona de carne 0,25 %.

1.3.5. Efecto de la concentración de LA

Por último, se investigó la concentración mínima de LA necesaria para conseguir la máxima producción de bacteriocina, realizando cultivos de la cepa productora en LA disuelta al 3, 4, 5 y 6%, respectivamente. En todos los casos los medios fueron adicionados de glucosa al 1% manteniendo el pH estabilizado a 6,65.

En la Fig. 10 se muestran los rendimientos en actividad inhibidora obtenidos tras diferentes periodos de incubación, con cada una de las concentraciones de LA empleadas.

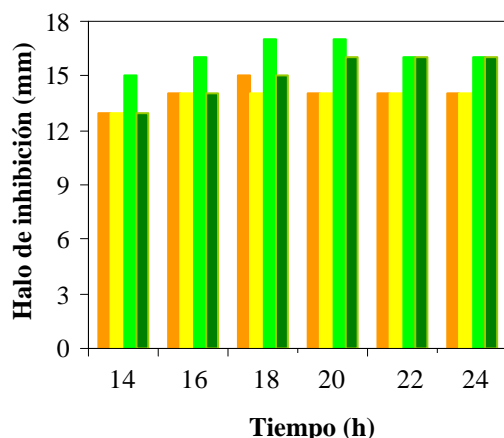


Figura 10.- Efecto de la concentración de LA sobre la producción de AS-48 por *E. faecalis* A-48-32. Naranja: LA 3%. Amarillo: LA 4%. Verde claro: LA 5%. Verde oscuro: LA 6%.

De estos resultados se pudo establecer que la concentración óptima de LA para producir la bacteriocina era del 5% ya que si bien los niveles obtenidos con 5 y 6% fueron muy semejantes, cuanto mas baja sea la concentración de sustrato requerida, menor será la interferencia del medio en la posterior recuperación del producto y el coste. El máximo rendimiento en biomasa microbiana en LA 5% fue del orden de 10^{10} UFC/ml.

En al Fig. 11, se muestra la mejora global obtenida tras el proceso de optimización de la producción de AS-48 (expresada en UA/ml) conseguida en LA aplicando las condiciones que rinden las mayores concentraciones de bacteriocina, 8% de inóculo, con 1% de glucosa y pH estabilizado en 6,55 en comparación con los rendimientos obtenidos en las condiciones iniciales, sin optimizar.

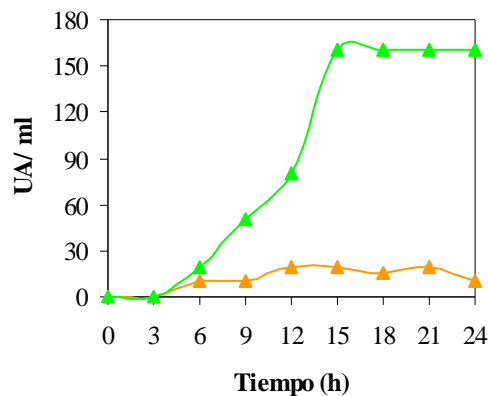


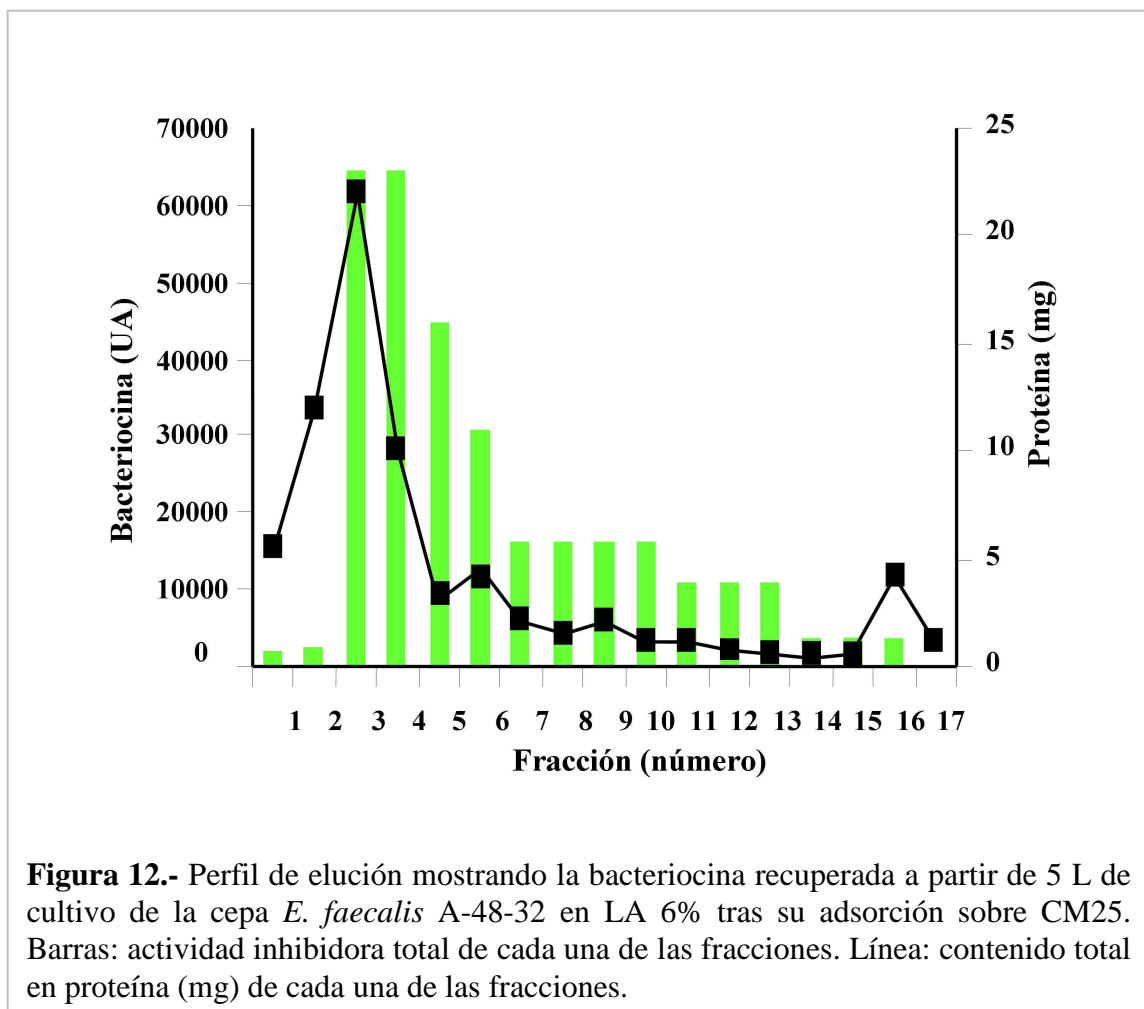
Figura 11.- Producción de AS-48 por *E. faecalis* A-48-32 en LA a 28 °C expresado en UA/ml. Naranja: 4% de inóculo, sin glucosa y sin control de pH. Verde: 8% de inóculo, con 1% de glucosa y pH estabilizado en 6,55.

2. Optimización de la recuperación de AS-48 a partir de los cultivos en Lactalbúmina

2.1. Recuperación de AS-48 mediante intercambio catiónico sobre CM25

La actividad de AS-48 producida en los cultivos en LA adicionada de glucosa 1% (5 L) se recuperó mediante cromatografía de intercambio catiónico siguiendo el protocolo descrito en Métodos, descrito por Abriouel *et al.*, (2003). La bacteriocina producida fue adsorbida mediante mezcla directa de los cultivos de 18 h con la resina CM25 y posteriormente eluída aplicando una solución de NaCl 1,5 M. En el desarrollo del proceso se observó que, cuando, para eliminar los posibles microorganismos contaminantes, el medio se sometía a tratamiento térmico, aún cuando éste fuese bajo (110 °C, 10 min) se producían precipitados (coágulos) de proteína que interferían enormemente en el curso de la recuperación pues obturaban los poros de la resina e impedían la elución de la bacteriocina. El problema era tanto mas grave cuando mayor era el volumen de los cultivos (hasta 20 L). Por ello se optó por no aplicar tratamiento térmico al medio antes de ser inoculado con la cepa productora y extremar las condiciones de higiene de los envases donde se realizaron los cultivos y de todo el resto del material empleado. En general tras la optimización del proceso los episodios de contaminación de los cultivos han sido muy escasos.

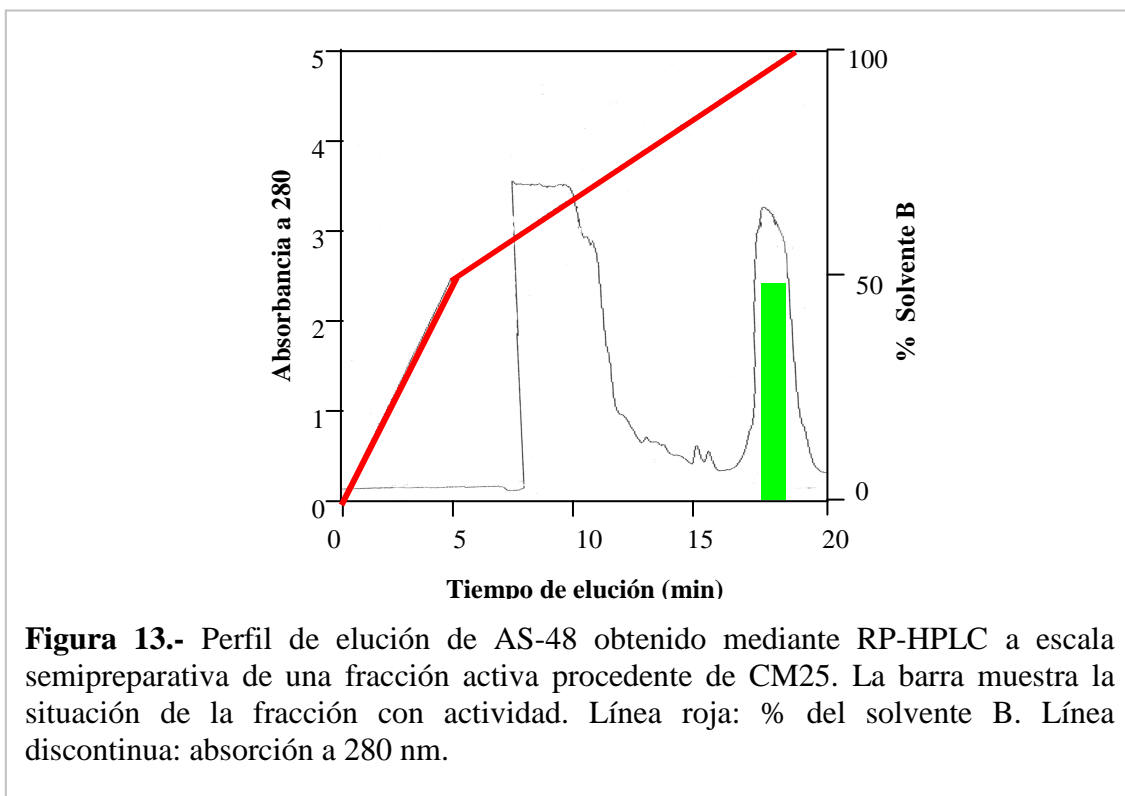
En la Fig. 12 se muestra el perfil de elución de la bacteriocina, expresado como UA totales en cada una de las fracciones recogidas y su relación con el contenido de proteína de las mismas.



Esta preparación de bacteriocina ha sido la empleada en los experimentos de bioconservación de alimentos, tras eliminar el contenido en NaCl mediante diálisis frente a agua destilada a través de membrana de corte 2000 Da.

2.1.1 Cromatografía líquida de alta resolución

Al objeto de comprobar si los cultivos en el medio LA podían ser útiles en la obtención de cantidades grandes de bacteriocina para ser empleada en estudios estructurales, de actividad biológica o de cualquier tipo que requiera la molécula pura, se aplicó la cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC) a la fracción eluida de CM25 que presentaba la máxima actividad, utilizando una columna semipreparativa rellena con C18. El cromatograma obtenido mostraba un pico predominante de absorción bien definido, que se correspondía con las fracciones activas (Fig.13).



En la Tabla 4, se resume el proceso de purificación de la bacteriocina AS-48 obtenida a partir de 5 L de cultivo en medio LA.

Etapa	Actividad total (UA)	Proteínas totales (mg)	Actividad específica (UA/ml)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Caldo de cultivo	400000	24250	16,5	100	1
Intercambio catiónico	374500	62,2	6220,9	93,6	377
Intercambio catiónico*	64000	10	6400	100	387,9
Fase reversa (semipreparativa)**	24820	2,63	9437,3	46,2	572

Tabla 4.- Resumen del proceso de purificación de la enterocina AS-48 obtenida a partir de 5 L de cultivo en medio LA.* Resultados correspondientes a la fracción de mayor actividad. ** Resultados de la repurificación mediante RP-HPLC de la fracción de mayor actividad obtenida de CM25.

Uno de los requisitos para el uso de preparaciones de AS-48 como bioconservante es la eliminación de las células. Tras la cromatografía de intercambio, se habían eliminado un alto porcentaje de las células presentes (99 %), ya que de las aprox. 10^{10}

UFC/ml del cultivo quedaban en el eluido aprox. 10^8 UFC/ml. A pesar de la importante reducción obtenida, las preparaciones no eran adecuadas para ser aplicadas en alimentos.

Para solucionar este problema, las preparaciones obtenidas se filtraron a través de diferentes filtros de membrana (ésteres de celulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF) y poliétersulfona) con un tamaño de poro de $0,22 \mu\text{m}$, mediante aplicación de un flujo perpendicular. En los filtrados se comprobó la eficacia de cada tipo de filtro para retener las células residuales y si la bacteriocina quedaba retenida a ellos (Tabla 5). De estos resultados se pudo concluir que si, bien todos eran igualmente eficaces para eliminar las células, los filtros de PVDF y los de ésteres de celulosa, retenían un porcentaje significativo de actividad (50%).

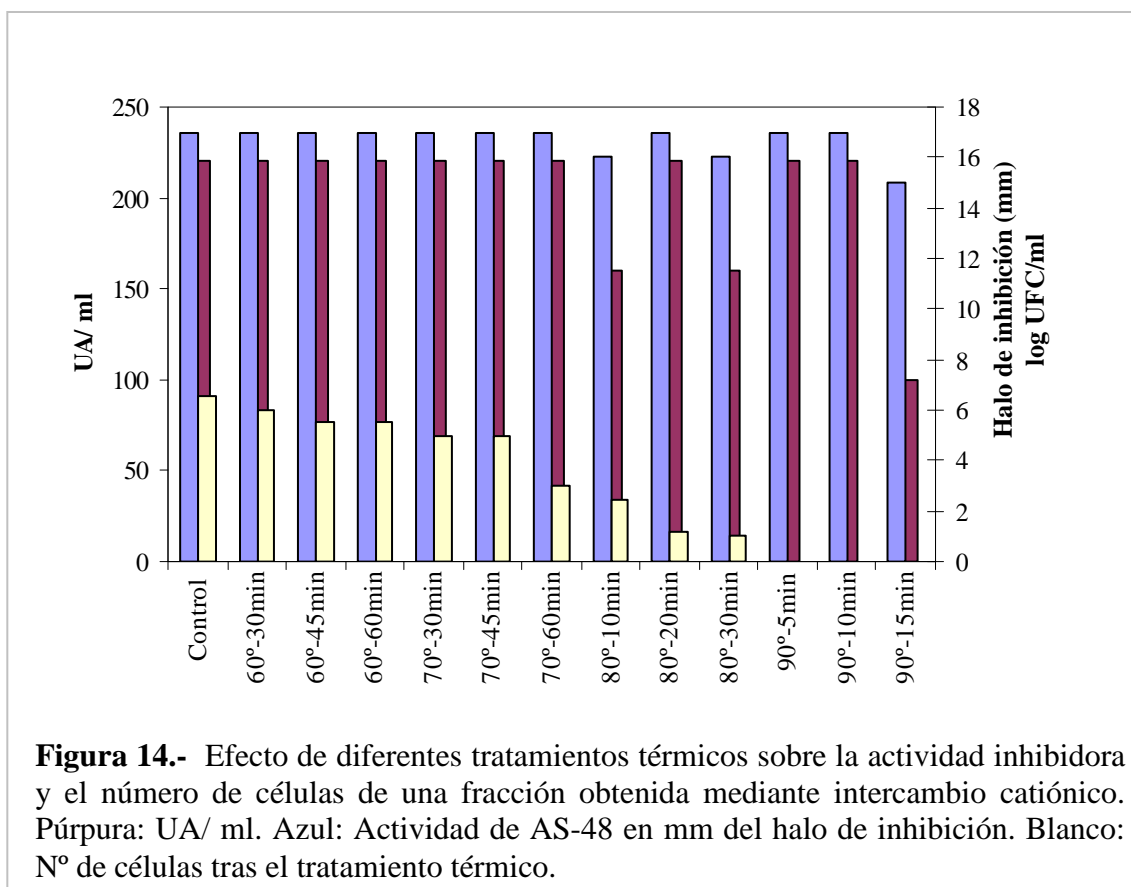
	UA/ml	UFC/ml
Fración sin filtrar	640	$5,85 \times 10^8$
Filtros de acetato de celulosa	320	$2,0 \times 10$
Filtros de PVDF	320	$3,0 \times 10$
Filtros de poliétersulfona	640	$1,0 \times 10$

Tabla 5.- Retención de la actividad inhibidora y de las células presentes en preparaciones de AS-48 sobre diferentes filtros de membrana ($0,22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro).

Dado que la filtración convencional (flujo perpendicular) no se puede aplicar a medios densos (por su alta concentración en componentes o por su alto contenido celular), debido a la rápida saturación de las membranas, y que siempre quedan células en los filtrados que pueden ocasionar problemas, sobre todo en los ensayos con tiempos prolongados, se decidió ensayar un método alternativo al de la filtración para eliminarlas, aprovechando la gran estabilidad al calor de la bacteriocina. Así, las fracciones activas fueron sometidas a diferentes tratamientos térmicos para establecer cual era el más adecuado para la eliminación de *E. faecalis* A-48-32 sin afectar a la actividad de las muestras (Fig.14), sabiendo la alta resistencia que presentan al calor los enterococos ($62,8 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min).

Por este motivo a preparaciones de AS-48 procedentes de intercambio catiónico, se les aplicaron los tratamientos térmicos durante tiempos variables, de acuerdo con los

resultados expuestos en la Fig. 14. En ellos se estableció que el tratamiento más adecuado era 90 °C durante 5 minutos, por ser el que producía la eliminación de las células al tiempo que conservaba la actividad de las muestras.



Cuando se combinaron ambos tratamientos de forma que las preparaciones filtradas a través de membranas de PES fueron sometidas a tratamiento térmico, se consiguió eliminar por completo las células productoras con una dosis de calor mucho más moderada aplicada durante un tiempo corto (Tabla 6).

Tratamiento térmico	UA/ml	UFC/ml
Ninguno	640	1,0 x 10
70 °C; 5 min	640	< 10
80 °C; 5 min	640	< 10

Tabla 6.- Efecto del tratamiento térmico sobre la actividad de AS-48 y la viabilidad de los enterococos de preparaciones de la bacteriocina obtenidas mediante CM25 y filtradas a través de membranas de PES.

Es interesante resaltar además que las preparaciones de AS-48 obtenidas mediante intercambio por CM25 se pueden almacenar congeladas por tiempo indefinido a -20 °C sin que pierdan actividad alguna.

2.1.2. Recuperación de AS-48 mediante filtración tangencial

El proceso consiste en aplicar a las fracciones activas un proceso de microfiltración a través de una membrana de 0,45 µm o 0,22 µm de tamaño medio de poro, que nos permite obtener un permeado (filtrado) con la bacteriocina y con menor cantidad de células, seguido de un paso de concentración del permeado a través de una membrana de 5 kDa (tamaño medio de poro) que, al reducirlo de volumen, 1/40 del inicial, permite obtener la enterocina concentrada en el retenido. Los experimentos preliminares de microfiltración se realizaron en el Dpto de Ingeniería Química de la Universidad de Granada con un equipo Pellicon XL (Millipore) provisto de membranas de 0,45 µm de tamaño de poro y de 50 cm² de superficie y hechas de PES. En ellos se obtuvo una recuperación de la actividad en torno al 90%.

La microfiltración a través de membrana de 0,45 µm de tamaño medio de poro dio idénticos resultados de recuperación de la bacteriocina con respecto al uso de membrana de 0,22 µm (tamaño medio de poro), si bien las células remanentes en el permeado tras el proceso de filtración resultaron ser del orden de 2 unidades log superiores en el caso de la membrana de 0,45 µm con respecto a la membrana de 0,22 µm, por lo que los experimentos se continuaron utilizando esta última.

A continuación se ensayaron diferentes condiciones de trabajo con el equipo de filtración tangencial Pellicon 2 para disminuir el tiempo de duración del proceso y a la vez evitar en lo posible el entrapamiento de las membranas que pudiera ocasionar la aplicación de una presión de entrada alta. Se establecieron como óptimas las condiciones de trabajo que se recogen en la Tabla 7. En ella se muestran las presiones transmembrana (PTM) iniciales, calculadas según la siguiente fórmula:

$$PTM = (\text{Presión de entrada o del permeado} + \text{Presión de salida o del retenido})/2$$

Hay que señalar que en este caso la composición de las membranas de microfiltración era de PVDF debido a que la casa comercial no las fabrica en PES para este equipo.

Condiciones	Membrana 0,22 μ (PVDF)	Membrana 5 kDa (PES)
Posición válvula	6	4
Flujo inicial (ml/min)	400	150
Flujo final (ml/min)	90	110
PTM inicial (psi)	4	10
PTM final (psi)	9,5	13

Tabla 7.- Condiciones de trabajo en el proceso de filtración tangencial. Se indican asimismo la composición química de los dos tipos de membranas utilizados.

En la Fig. 15 se muestra como evolucionó el flujo a lo largo de los experimentos de micro y ultra filtración.

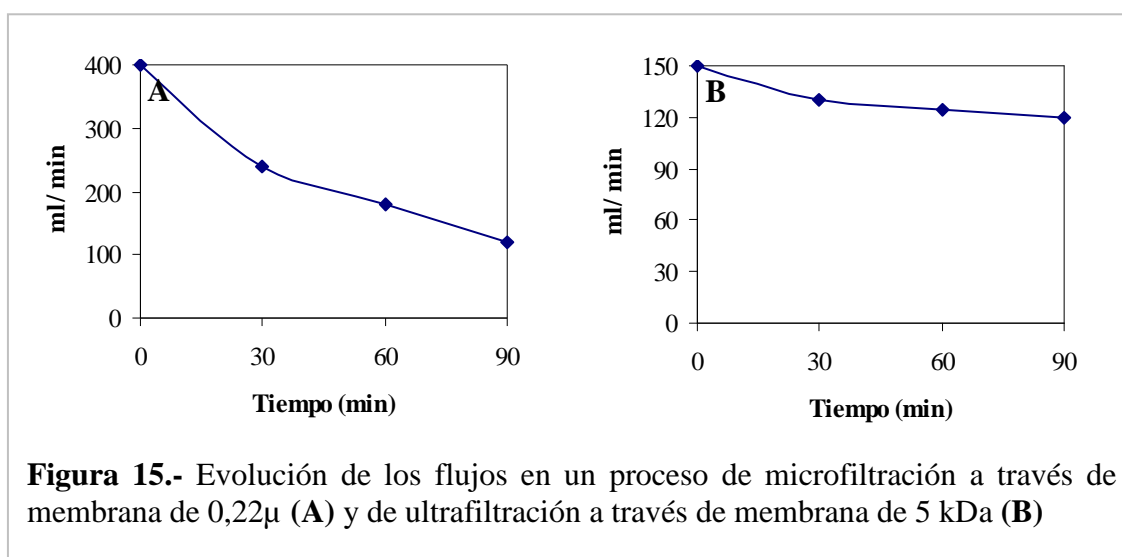


Figura 15.- Evolución de los flujos en un proceso de microfiltración a través de membrana de 0,22 μ (A) y de ultrafiltración a través de membrana de 5 kDa (B)

Se puede ver como en la etapa de microfiltración tuvo lugar una importante bajada en el flujo, aún en las condiciones establecidas como óptimas, debido posiblemente a la colmatación de las membranas por las células o por los precipitados proteicos presentes en la LA, no completamente redisueltos. Los ensayos previos en los que se aplicaron presiones de entrada más altas resultaron en una caída aún más rápida en la velocidad de flujo y en una obturación completa de las membranas tras el paso de aprox. 10 L de cultivo. En la subsiguiente etapa de ultrafiltración, una vez clarificadas las muestras, la bajada en el flujo fue mucho más lenta (Fig. 15).

Los resultados de ambas etapas, aplicados a un cultivo de la cepa *E. faecalis* A-48-32 en lactalbúmina reconstituida al 6 % e incubado a 28 °C durante 18 h, se muestran en la Tabla 8. Los resultados son la media de tres experimentos independientes. Tanto en el primero como en el segundo paso se detectaron pérdidas notables de actividad en relación a la actividad presente en el cultivo: en torno al 50 % en el paso a través de la membrana de 0,22 μ y del 76 % durante la etapa de concentración.

Proceso	Proteínas totales/L (mg)	Actividad total (UA)/L	Actividad específica (UA/mg)	Rendimiento (%)	Nº células (UFC/ml)
Caldo cultivo	3667,75	209200	57,04	100	6,4 x 10 ¹⁰
Permeado 0,22 μ m	3773,70	103600	27,45	49,52	3,4 x 10 ⁶
Retenido 0,22 μ m	1997	42000	21,03	20,08	
Retenido 5 kDa	654,6	24800	37,89	23,94*	7,0 x 10 ⁶
Permeado 5 kDa	26,82	0	0	0	0

Tabla 8.- Rendimiento del proceso de filtración tangencial a partir de un cultivo de la cepa *E. faecalis* A-48-32 en lactalbúmina reconstituida al 6 %, incubado a 28 °C durante 18 h. En la etapa de ultrafiltración el permeado obtenido en la de microfiltración se concentró 40 veces. * Cálculo efectuado considerando como 100 % la actividad recuperada en el filtrado a través de la membrana de 0,22 μ m.

La pérdida de bacteriocina que tiene lugar en la etapa de ultrafiltración parece debida a cambios en la actividad de la misma más que a pérdida real de la molécula. Efectivamente de un lado no se detectó actividad alguna en el filtrado y de otra, cuando el retenido procedente de experimentos de concentración por membranas de 5 kDa se sometió a intercambio sobre CM25, se obtuvieron recuperaciones por encima del 150% en todos los casos, siendo con frecuencia superiores al 200 %. La aparente caída de actividad detectada se podría explicar por un cambio en la conformación y/o estado agregacional de la enterocina al incrementarse su concentración en el medio.

Para determinar si los problemas de obturación de las membranas y la pérdida de actividad en el permeado detectada en la etapa de microfiltración se debía a aspectos relacionados con la naturaleza del medio, en el que se detectaban precipitados de proteína, se realizó un experimento partiendo de cultivos en medio BHI adicionado de glucosa 1% e incubado a 28 °C a pH controlado. Los resultados permitieron aclarar que

la obturación de las membranas se debía a las características peculiares del medio LA, ya que tanto en la etapa de microfiltración como en la ultrafiltración se mantuvo constante el flujo durante el experimento (1900 ml/ min y 200 ml/ min, respectivamente), a pesar de que los cultivos contenían aprox. $10^9 - 10^{10}$ UFC/ml. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 9, las pérdidas de actividad de bacteriocina del permeado en la etapa de microfiltración fueron similares a las obtenidas cuando se empleó como medio de cultivo LA. La recuperación en la etapa de ultrafiltración en cambio fue mucho más alta.

Proceso	Actividad total (UA)/L	Rendimiento (%)
Cultivo BHI	30000	100
Perneado (0, 22 μ m)	9333	31,1
Retenido (0,22 μ m)	1333	4,4
Retenido (5 kDa)	5867	62,8*
Permeado (5 kDa)	0	

Tabla 9.- Rendimiento del proceso de filtración tangencial a partir de un cultivo de la cepa *E. faecalis* A-48-32 en BHI + 1% glucosa, incubado a 28 °C durante 18 h.
* Cálculo efectuado considerando como 100 % la actividad recuperada en el filtrado a través de la membrana de 0,22 μ m.

2.2. Secado por atomización bajo vacío

Uno de los principales requisitos a la hora de desarrollar tecnológicamente un aditivo para su uso en alimentos, es la obtención de un preparado activo, libre de células microbianas, y estable en el tiempo. Hasta la fecha se utilizaban preparaciones de AS-48 provenientes de intercambio sobre CM25 que almacenadas congeladas a -28 °C mantienen su actividad por tiempo indefinido.

2.2.1. Obtención del preparado activo: secado mediante electrospray

Uno de los objetivos de esta Tesis era la obtención de preparaciones desecadas estables de AS-48, para lo cual las preparaciones de bacteriocina fueron sometidas a un sistema de desecado a vacío de muestras pulverizadas (eslectrospray), comprobándose a continuación si mantenían la actividad inhibidora. Este trabajo fue hecho en el Dairy Products Research Centre (Teagasc, Fermoy, Cork) en colaboración con los Dres. Paul

Ross y Colin Hill que aplican esta técnica para obtener preparaciones desecadas de lacticina 3147 (Morgan *et al.*, 1999).

En primer lugar se procedió a determinar las condiciones óptimas de fabricación del preparado activo, cultivando la cepa productora de AS-48 *E. faecalis* EFS2 en leche desnatada reconstituida al 10 o al 20 % y en lactosuero desmineralizado reconstituido al 10 %, con y sin control de pH. Esta es una cepa de origen alimentario (queso) que produce idénticos niveles de AS-48 que la cepa A-48-32. La fermentación se mantuvo a 30 °C durante 18 h, por ser éstas las condiciones para la máxima producción de AS-48 en sustratos lácteos. Hay que aclarar que estos experimentos se realizaron con anterioridad a los descritos en el apartado 1.3.4 de este capítulo sobre la optimización de la concentración de LA y por ello, se emplearon las condiciones habitualmente utilizadas en el Dairy Research Centre (Moorepark, Teagasc, Fermoy, Cork).

Tras el proceso de secado se determinó el porcentaje óptimo de reconstitución del preparado para su posterior uso. Los mejores resultados de producción de AS-48 y de reconstitución del polvo activo (Tabla 10, Fig. 16) se obtuvieron con cultivos en lactosuero desmineralizado al 10 % bajo control de pH (6,5), siendo imposible dispersar los polvos obtenidos con leche desnatada para su posterior ensayo.

De cada lote de 400 ml de cultivo desecado se obtuvieron aprox. 40 g de polvo (o lo que es igual 1 g provienen de 10 ml de cultivo). La actividad del polvo reconstituido al 5 y al 10% se determinó mediante la técnica de los pocillos descrita por Parente y Hill (1992), empleando *L. lactis* subsp. *lactis* HP como cepa indicadora. Como control para los ensayos de actividad en medio líquido de la preparación obtenida se obtuvo de forma paralela polvo desecado a partir de lactosuero desmineralizado al 10% sin inocular con la cepa productora.

Medio	UA/ml
Lactalbúmina 10 % sin control de pH (previo al secado)	40960
Liofilizado activo reconstituido al 5 %	640
Liofilizado activo reconstituido al 10 %	1280
Lactalbúmina 10% pH controlado (previo al secado)	40960
Liofilizado activo reconstituido al 5 %	1280
Liofilizado activo reconstituido al 10 %	1280
Leche desnatada al 10 % (previo al secado)	40960
No se pudo reconstituir, polvo demasiado compacto, irrecuperable	
Leche desnatada al 20% (previo al secado)	40960
Demasiadas partículas en suspensión, no se pudo usar en el secado	

Tabla 10.- Actividad de los diferentes preparados obtenidos mediante secado por electrospray.

El mejor resultado se obtuvo con lactosuero desmineralizado al 10%, que tras el desecado y reconstitución del polvo al 5% en agua presentaba una actividad frente a la cepa indicadora de 1280 UA/ml lo que implicaba un contenido de 25600 UA/g del polvo (1024000 UA totales).

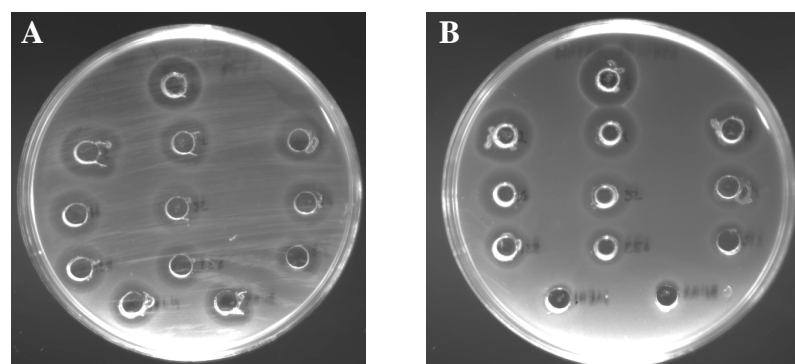


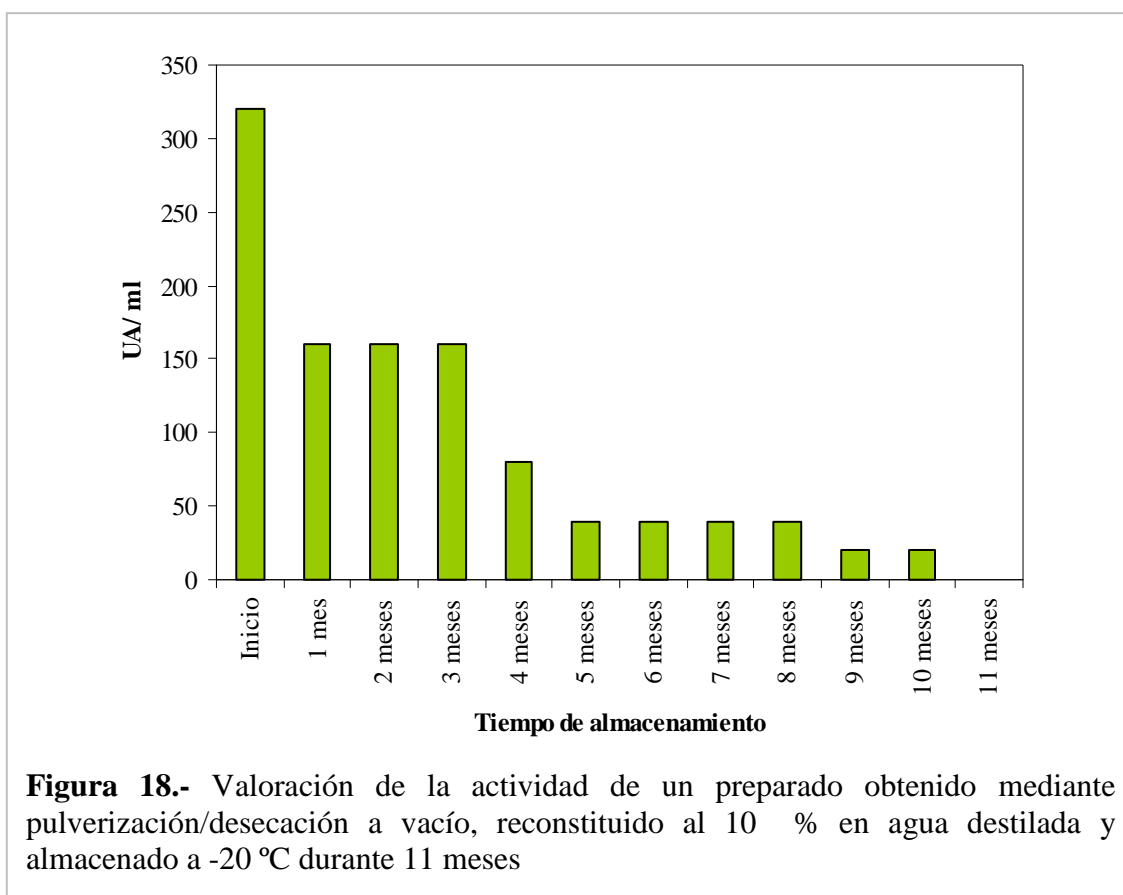
Figura 17.- Actividad inhibitoria frente a *L. lactis* subsp. *lactis* HP de los preparados obtenidos mediante pulverización/desecación a vacío de los cultivos de la cepa *E. faecalis* EFS 2 en lactosuero desmineralizado al 10 % a pH controlado (6,5). (A) Actividad del sobrenadante del cultivo (16 h). (B) Actividad tras el proceso de secado por electrospray y posterior reconstitución al 10 %.

Tras comprobar que el preparado obtenido presentaba actividad inhibitoria frente a la cepa indicadora empleada, se procedió a determinar si era igualmente activo sobre otras cepas sensibles a la bacteriocina: *E. faecalis* S-47 y cepas patógenas transmitidas por alimentos como *L. monocytogenes* CECT 4032 y *B. cereus* LWL-1. Por el método de los pocillos de Parente y Hill la actividad frente a estas cepas resultó ser de 640, 10240 y 160 UA/ml respectivamente.

Aunque durante el proceso de secado se eliminan el 99,99 % de las células, fue necesario aplicar un tratamiento térmico a las preparaciones reconstituidas en agua o en medio BHI para reducir la población residual ($7,4 \times 10^4$ UFC/ml en la preparación reconstituida al 10%). Debido a la mayor complejidad del medio en estas preparaciones, respecto de los concentrados obtenidos por intercambio sobre CM 25, fueron necesarios dos tratamientos térmicos de 90 °C durante 10 minutos, separados en el tiempo por 15 min. a 4 °C, para lograr la reducción de la carga microbiana hasta menos de 10 UFC/ml. En este caso no fue posible eliminar las células residuales por filtración convencional debido a la rápida obturación de los filtros por los componentes del medio que no quedaban redissueltos por completo.

2.2.2. Estabilidad del preparado activo durante su conservación en frío.

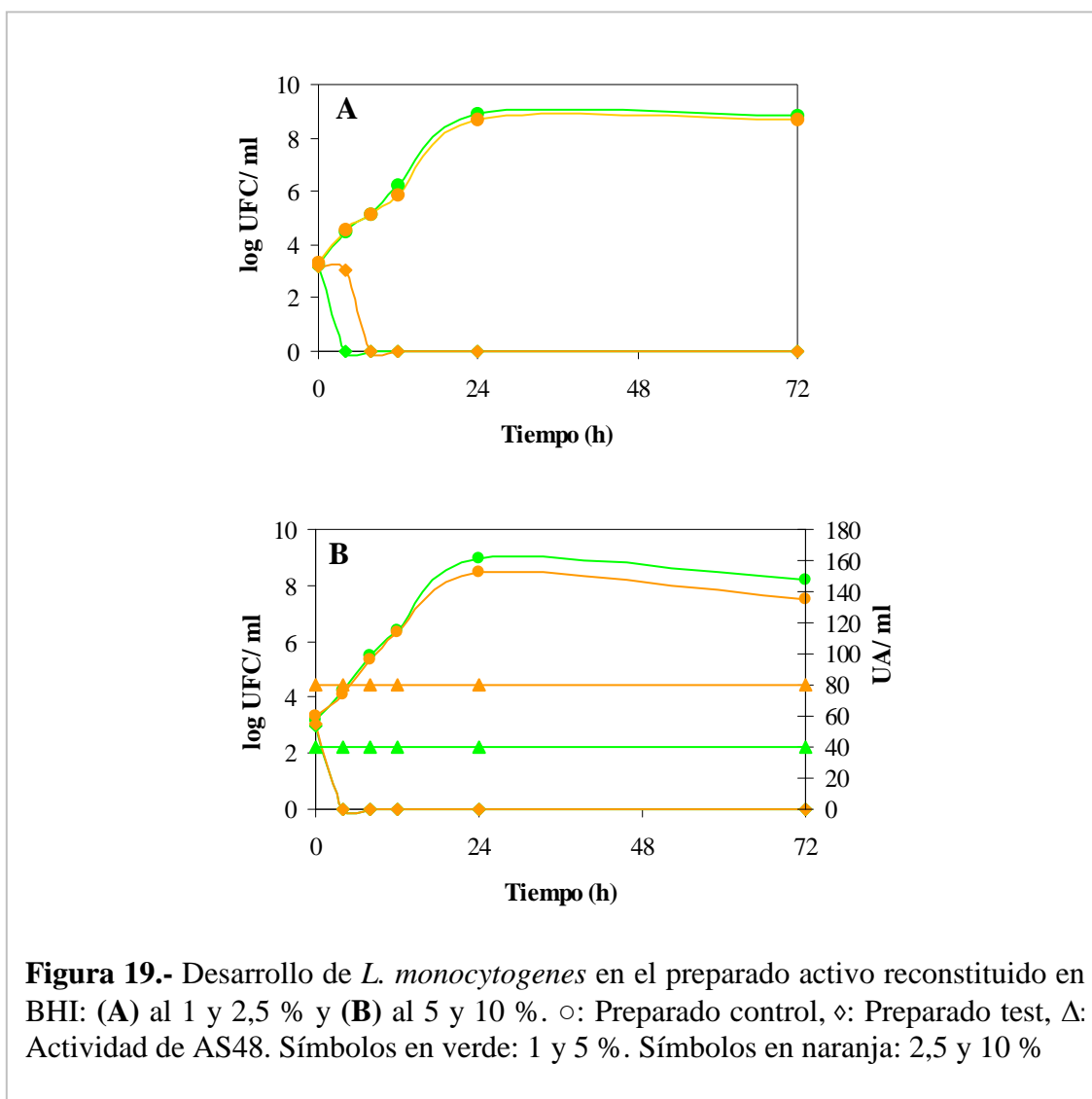
Tras la desecación y ensayo inicial el preparado fue almacenado a 4 °C durante 30 días. Ello produjo una pérdida de actividad del 75 % (de 1280 UA/ml a 320 UA/ml). Al objeto de comprobar si se podía aumentar la vida media del producto conservándolo a -20 °C, se prepararon alícuotas del polvo reconstituidas al 10 % en agua destilada, tanto del preparado activo como del control, que fueron congeladas a -20 °C y descongeladas y valoradas periódicamente en su actividad. Tras una pérdida del 50 % durante el primer mes el preparado mantuvo su actividad inalterada los tres primeros meses (Fig. 18), tras los cuales fue perdiéndose paulatinamente la actividad que se hizo indetectable a los 11 meses.



2.2.3. Efecto del preparado activo sobre cultivos de *L. monocytogenes* en BHI

Para ensayar el efecto del polvo desecado sobre *Listeria* se prepararon dos lotes, uno del polvo control (obtenido a partir de lactosuero desmineralizado sin inocular) y otro del activo, reconstituidos en BHI al 1, 2,5, 5 y 10 % a los que se les aplicaron dos tratamientos a 90 °C durante 10 minutos, separados en el tiempo por 15 min a 4 °C para eliminar la mayor parte de las células productoras. Todos los lotes fueron inoculados con *L. monocytogenes* CECT 4032 (aprox. 10^3 UFC/ml) e incubados a 37 °C. Tras 0, 4, 8, 12, 24 y 72 h de incubación se extrajeron muestras de cada cultivo para determinar el número de listerias viables y la actividad inhibidora (Fig. 19). Asimismo, se siguió la evolución de los enterococos productores de enterocina que pudiesen permanecer en el preparado activo, haciendo recuentos en medio KF a diferentes tiempos de incubación. Los recuentos de enterococos alcanzaron en el liofilizado reconstituido al 5% valores de $<1,0 \times 10$ UFC/ml, $5,0 \times 10$ UFC/ml, $2,0 \times 10^2$ UFC/ml, $1,1 \times 10^6$ y $2,5 \times 10^8$ UFC/ml a las 0, 4, 8, 24 y 72 h, respectivamente.

En la Fig. 19 se muestra la eficiente eliminación de *Listeria* ocurrida tras las primeras 4 h y mantenida hasta las 72 h de incubación en todos los cultivos incluso en los adicionados de 1% de preparado activo. Esta rápida y eficaz inhibición debe ser atribuida a la bacteriocina presente en el polvo ya que los niveles poblacionales de enterococos al menos en la primeras 8 h de cultivo eran $\leq 10^2$ UFC/ml y, por tanto, claramente insuficientes para una eficiente producción de la enterocina. Aunque la no recuperación de las listerias tras 24 y 72 h de incubación pudiera deberse a la población residual de enterococos, es importante señalar que se detectó actividad inhibidora en los sobrenadantes de los cultivos adicionados de 5 y 10 % de polvo activo desde el principio y que ésta se mantuvo a niveles invariables a lo largo del experimento, no estando incrementada por el incremento de la población de enterococos. Todo ello apoya la hipótesis de que la inhibición de *L. monocytogenes* a lo largo del experimento se debe a la bacteriocina adicionada (producida *ex situ*).



Al reproducir este experimento en leche, la mayor complejidad de ésta hizo inviable eliminar los enterococos productores mediante choque térmico sin producir la inactivación paralela de la enterocina, y tampoco fue posible eliminarlos por filtración. Por ello, en los ensayos realizados de inhibición de *L. monocytogenes* en este medio, el crecimiento de la cepa productora se disparó rápidamente y no fue posible por tanto conocer si la inhibición de *Listeria* fue debida a la enterocina adicionada o a la producida *in situ* (resultados no mostrados).

3. Mutagénesis

De forma paralela a la optimización de la producción de AS-48 a partir de lactalbúmina, se realizaron experimentos de obtención de mutantes hiperproductores que pudiesen ser utilizados para obtener un mayor rendimiento de la producción en dicho medio. Los métodos empleados fueron la búsqueda de mutantes hiperproductores espontáneos y el tratamiento con agentes físicos (irradiación con luz ultravioleta y altas temperaturas) y químicos (bromuro de etidio y naranja de acridina). Una vez realizados los tratamientos siguiendo los diferentes protocolos descritos en Métodos, las células se diseminaron en placas de BHA-T y se procedió de la forma indicada para detectar la presencia de clones hiperproductores. El número de colonias hiperproductoras junto con los diámetros de los respectivos halos de inhibición se recogen en la Tabla 11. En la Fig. 20, se muestra el aspecto de los halos de inhibición de *L. innocua* producidos por estos clones hiperproductores.

Agente mutagénico	Halo de inhibición (mm)
Cepa salvaje	15
Curación espontánea	-
Luz U.V. (8 min)	35, 37
Alta temperatura (52 °C)	23 (2), 25 (2), 30 (3), 33 (2), 35 (2), 36, 37, 40 (2)
Bromuro de etidio	21, 22 (2), 25, 27, 40, 42
Naranja de acridina	21 (4), 22 (3), 39 (2), 40

Tabla 11.- Diámetros de los halos de inhibición producidos frente a *L. innocua* por clones hiperproductores obtenidos mediante tratamiento de la cepa *E. faecalis* A-48-32 con los distintos agentes mutagénicos. Entre paréntesis se muestra el número de clones que dieron lugar a un determinado halo de inhibición.

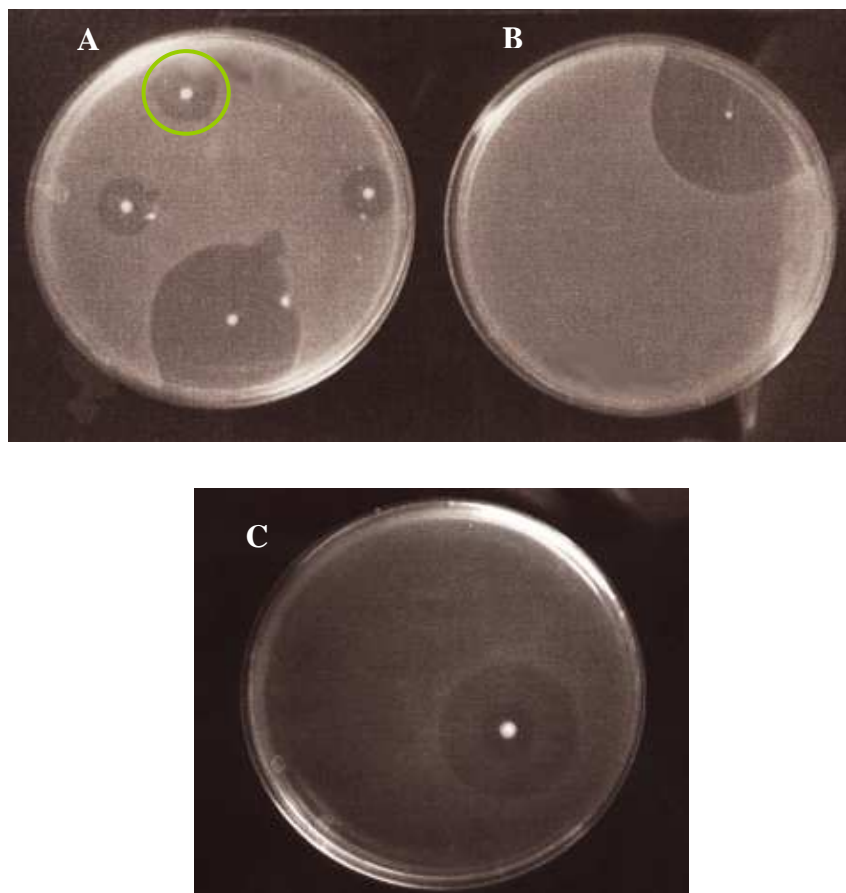


Figura 20.- Halos de inhibición de *L. innocua* producidos por los clones hiperproductores obtenidos mediante tratamiento de la cepa *E. faecalis* A-48-32 con (A) Naranja de acridina (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (B) Alta temperatura (52 $^{\circ}\text{C}$). (C) Luz ultravioleta (6 min. de exposición). En verde se señala un halo normal de producción.

Para estudiar la estabilidad de las colonias hiperproductoras, éstas se inocularon en BHI tamponado y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$, tomando muestras a las 6, 8 y 24 h para determinar su actividad frente a *L. innocua*. Fue sorprendente comprobar que en ningún caso se obtuvo actividad en los sobrenadantes a pesar de repetir el ensayo varias veces. Es más, pudimos determinar que en medio sólido el carácter hiperproductor había dado paso a uno hipoprodutor, pues los diámetros de los halos de inhibición obtenidos en esta segunda ocasión estaban comprendidos entre 8 y 12 mm.

Para intentar estabilizar el carácter hiperproductor desarrollado en el primer aislamiento, se escogieron los clones con mayor halo de inhibición y se les volvió a aplicar a cada uno el tratamiento original. Como puede observarse en la Tabla 12 la

aplicación de este segundo tratamiento condujo a la pérdida de la capacidad hiperproductora detectada inicialmente.

Colonia número	Halo original (mm)	2° Tratamiento	Nuevos halos (mm)
29	40	Alta temperatura	No crecimiento
50	37	Luz UV (8 min.)	18
52	40	Bromuro etidio (2,5 µg/ml)	18
39	40	Naranja acridina (7 µg/ml)	15

Tabla 12.- Resultado de la aplicación de un segundo tratamiento de mutagénesis sobre los mutantes más hiperproductores obtenidos en el primer tratamiento.

Todo el proceso fue repetido una segunda vez para determinar si era reproducible, obteniéndose resultados equiparables en todos los pasos. Llegamos, por tanto, a la conclusión de que este carácter sólo se consigue mientras las células están sometidas a estrés pero desaparece cuando éste ha concluido.

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

Como se ha referido en el Capítulo de Introducción de esta Memoria, la *bioconservación y/o fermentación de los alimentos* es una línea dentro de la Microbiología aplicada que está experimentando una gran expansión en la actualidad. Son varias las razones para este hecho, una de ellas es la extraordinaria prevalencia de las enfermedades de transmisión alimentaria en los países industrializados donde, si bien son raros los casos mortales, los numerosos brotes y casos aislados determinan un alto coste económico (Luchansky, 1999; Anónimo, 2001b; Anónimo, 2003; Buzby *et al.*, 1996). Otra razón es que muchos de los conservantes químicos utilizados en la actualidad están siendo cuestionados por los consumidores en cuanto a sus efectos sobre la salud y además se ha generado una demanda entre el público de alimentos denominados “light”, bajos en sal, azúcar y grasas, más propensos aún a soportar el crecimiento microbiano. Esto está llevando a los consumidores a confiar cada vez más en la refrigeración como forma de asegurar la sanidad de los alimentos mínimamente procesados. Sin embargo hay dos circunstancias que desaconsejan confiar excesivamente en esta técnica. Una de ellas es que el 20% de los refrigeradores industriales y domésticos mantienen temperaturas >10 °C (Van Garde y Woodburn, 1987). Otra es que patógenos como *L. monocytogenes*, *B. cereus* y otros son capaces de crecer a temperaturas próximas a la de congelación. Por todo ello se aconseja el empleo de barreras adicionales para impedir el crecimiento microbiano en los alimentos refrigerados.

La búsqueda de formas más naturales de conservación, y por ello mejor aceptadas por los consumidores, ha enfocado el interés sobre los llamados conservantes naturales, sustancias antimicrobianas de origen vegetal o animal, y los conservantes biológicos, ciertos microorganismos y/o sus compuestos antimicrobianos. Tanto unos como otros no despiertan recelos ya que muchos de ellos tienen una larga trayectoria de empleo seguro en alimentos. Entre los conservantes biológicos, los que presentan un uso más antiguo y extendido son, sin duda, las bacterias del ácido láctico, cuyo empleo, si bien no intencionado ni comprendido científicamente, en la producción de queso, comenzó hace 8000 años. Es por ello y por la ausencia de casos de enfermedad relacionados con su consumo, por lo que se consideran organismos GRAS. A ello se une su frecuentemente referida actividad prebiótica.

Una de las características que cualifican a las BAL como bioconservantes es su capacidad para producir bacteriocinas, péptidos antimicrobianos con un espectro de acción más o menos extenso. El uso intencionado de las bacteriocinas en la

conservación de alimentos se puede practicar básicamente de dos formas, adición de preparaciones de la bacteriocina ya producida mediante crecimiento de la cepa productora en los medios adecuados o, alternativamente, por inoculación de la propia cepa productora en el alimento, para que al crecer en el mismo produzca la bacteriocina *in situ* actuando como cultivo protector. Un método u otro tienen sus aplicaciones preferentes según el tipo de alimento y sus ventajas e inconvenientes que se comentarán más adelante.

En cuanto a la adición de preparaciones de bacteriocina, es claro que por cuestiones económicas no es factible que la bacteriocina se encuentre en estado puro, ya que el proceso de purificación, por muy simple que sea, encarecería enormemente el producto final. Por ello, dado que parece obvio que los componentes del medio de cultivo han de estar, en mayor o menor grado, presentes en el preparado de la bacteriocina es necesario establecer como sustrato de crecimiento uno que, además de ser de bajo coste, sea de grado alimentario, de forma que la presencia de sus componentes en el alimento al que se aplique no despierte recelos.

Optimización de la producción de bacteriocina en subproductos lácteos

La bacteriocina AS-48 se produce como metabolito primario en varios medios de cultivo de laboratorio. La primera vez que se investigó su producción se encontró que los máximos rendimientos se obtenían en medio BHI al 1,8% adicionado de glucosa al 1% y el medio complejo (CM) adicionado de glucosa al 1-2% (Gálvez *et al.*, 1986). Los títulos máximos de bacteriocina se alcanzaban a las 8 h tras las cuales se producía una importante caída. Recientemente se han mejorado las condiciones de producción en el medio CM modificado (MCM) utilizando un inóculo de alta densidad y manteniendo el pH en torno a 6 mediante adición manual de NaOH 10 N. En estas circunstancias se consiguió incrementar la producción desde 21 hasta 52 UA/ml y, además, que se mantuvieran estables los niveles de bacteriocina en la subsiguiente incubación (Abriouel *et al.*, 2003). Sin embargo ni BHI ni CM reúnen las condiciones de ser medios baratos ni de grado alimentario.

Por ello se optó por probar la producción de la enterocina AS-48 en subproductos lácteos, lactosuero (LS) y derivados, por cumplir ambos requisitos, coste económico y grado alimentario. El LS es el principal subproducto de la fabricación del queso y de la caseína, que representa el 80-90% del volumen de la leche transformada. A finales de la

década de los 90 se estimó su producción en 130 billones de toneladas métricas al año, de las cuales un 20% correspondían a Europa Occidental (Korhonen *et al.*, 1998). Aunque se han desarrollado numerosos procesos para aprovecharlo en su totalidad o fraccionado, aproximadamente el 40-50% del LS se deshecha como residuo orgánico o se utiliza como abono en agricultura lo que genera importantes problemas medioambientales debido a su alta DBO. El resto es empleado fundamentalmente en alimentación humana y animal. (Li *et al.*, 2005). Los primeros intentos de producción de AS-48 en LS se hicieron con el sustrato crudo suministrado por la empresa DHUL, que lo genera como subproducto de la fabricación del queso fresco, y mostraron que la bacteriocina se producía en este sustrato. Sin embargo la gran heterogeneidad de los sucesivos lotes empleados y su baja estabilidad microbiológica, hicieron que se planteara la necesidad de buscar otros derivados. Por tanto se ensayaron diversos derivados comerciales del LS, cuya estabilización, conseguida mediante concentración y desecado final del producto, hacía mucho más cómodo su manejo y más repetitivos los resultados. La mejor producción se obtuvo con Lactabúmina (LA) Esprión, un derivado del LS enriquecido en proteína, que rindió inicialmente niveles máximos de 20 UA/ml y cuyo coste es sensiblemente menor que el del BHI (1,53 €/Kg la LA *versus* 90-100 €/Kg el BHI). La mejora en el rendimiento en AS-48 en este sustrato mediante el ensayo del efecto de diversos inóculos, suplementos nutricionales y pHs permitió establecer las siguientes condiciones óptimas para la producción de la bacteriocina por la cepa productora, *E. faecalis* A-48-32:

- Medio de cultivo conteniendo 5% de LA y 1% de glucosa
- pH estabilizado entre 6,55-6,65 mediante adición controlada de NaOH
- 8% de inóculo de la cepa productora
- Incubación a 28 °C

En estas condiciones la bacteriocina alcanza un máximo de producción de 160-320 UA/ml a las 18-24 h y, además, los niveles máximos permanecen prácticamente estables con ligeras variaciones al menos hasta las 24 h, lo que es una ventaja adicional pues da un margen de recogida y procesado de la actividad mucho más amplio. Esta no es la situación habitual para la mayoría de las bacteriocinas, que tras producirse a lo largo de la fase logarítmica de crecimiento, experimentan una disminución en su actividad, más o menos acusada, al entrar en fase estacionaria el cultivo, debido posiblemente a su adsorción a las células productoras o a su degradación proteolítica (Parente y Ricciardi, 1999). Los valores máximos de UA/ml conseguidos pueden corresponderse con aprox.

50-100 mg/L *versus* los 5-10 mg/L que se obtenían en los cultivos en LA sin optimizar, si bien hay que tomar con una cierta reserva estos datos, deducidos de la curva patrón establecida con la bacteriocina purificada a homogeneidad (apdo. 4 de Material y Métodos). Efectivamente, es posible que la actividad inhibidora detectada cuando la bacteriocina se encuentra en un medio complejo, como es LA, sea mucho menor que cuando está purificada ya que la interacción con componentes del medio y, desde luego su adsorción a las células productoras, puede enmascarar parte de la actividad de estas sustancias antagonistas. Hay que señalar además, que, en las condiciones óptimas de producción, los cultivos alcanzaron niveles poblacionales máximos de aprox. 10^{10} - 10^{11} UFC/ml, lo que representa una evidente mejora respecto de la última optimización conseguida por nosotros en MCM, donde se alcanzaron niveles máximos de 52 UA/ml, acompañados con niveles de biomasa del orden de 10^{13} UFC/ml (Abriouel *et al.*, 2003). Este dato indica que la producción por célula en MCM fue mucho menor, no solo en términos absolutos sino también en la tasa de producción por célula. Por otro lado, dado que uno de los requerimientos que han de cumplir las preparaciones de las bacteriocinas para que puedan ser usadas en alimentos es estar exentas de células productoras, el conseguir altos niveles con menos cosecha celular es una indudable mejora.

Esta necesidad de producir las bacteriocinas en sustratos de grado alimentario y de bajo coste ha llevado a otros investigadores a ensayar la producción de algunas de ellas en derivados del lactosuero. Así, se ha estudiado la producción en este sustrato de mesenterocina 5 (Daba *et al.*, 1993), bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* PO2 (Liao *et al.*, 1993), lacticina 3147 (Morgan *et al.*, 1999), nisina (Amiali *et al.*, 1998; Goulhen *et al.*, 1999; Guerra *et al.*, 2001) o pediocina (Goulhen *et al.*, 1999; Guerra *et al.*, 2001). Debido a la gran heterogeneidad de los métodos de cuantificación de la actividad de las preparaciones (variadas técnicas de los pocillos, técnica de la gota, valoración en placas de microtitulación, etc.), las distintas cepas indicadoras empleadas en los mismos y la baja precisión de los ensayos, es muy difícil comparar los rendimientos obtenidos para las distintas bacteriocinas así como su eficacia. Este inconveniente ha sido señalado también por otros autores (Montville *et al.*, 2001). En el caso de la nisina se han referido resultados muy dispares acerca del rendimiento en sustratos lácteos. Huggenholtz y De Veer (1991) obtuvieron rendimientos de 13 mg/L en leche y de 8 mg/L de nisina en lactosuero, mientras que Amiali *et al.*, (1998) refieren un rendimiento máximo de 20.000 UI/ml (500 mg/L) en cultivos en lactosuero sometidos a aireación y con el pH controlado a 6. En este último caso se determinó también la actividad unida a células,

que representaba aproximadamente un 10% del total. En cambio Guerra *et al.*, (2001) refieren una baja producción de nisina y pediocina en LS, inferior en todo caso a la alcanzada en medio MRS; esta producción incluso disminuyó cuando se suplementó con nitrógeno orgánico (glicocola) el medio y, en menor extensión, con lactosa. Respecto a la producción de lacticina 3147 en LS a pH constante de 6,5 se ha referido un rendimiento de 10.240 UA/ml. En este caso la titulación de la actividad se realizó mediante la técnica de Parente y Hill empleando como cepa indicadora *L. lactis* subsp. *lactis* HP. Cuando, con motivo de la estancia en el Dairy Research Centre, Teagasc (Fermoy, Cork, Irlanda) para la realización de los experimentos de desecado mediante electrospray de las preparaciones activas de nuestra bacteriocina, se emplearon la misma técnica y cepa indicadora para titular la actividad de AS-48 en los cultivos, se obtuvieron valores de 40.960 UA/ml, cuatro veces superiores a los obtenidos para la lacticina 3147. Valga este ejemplo para ilustrar la dificultad de comparar los rendimientos conseguidos con las diferentes bacteriocinas. La forma más segura de poder estandarizar los rendimientos sería establecer una relación entre los $\mu\text{g/ml}$ de las muestras y los correspondientes halos de inhibición o las UA/ml, lo que no siempre es posible ni seguro ya que se ha comprobado en numerosas ocasiones que tanto uno como otro pueden variar según el grado de purificación de las bacteriocinas y el medio en que se encuentren, entre otros factores.

El efecto de los diferentes factores nutricionales y de otros aspectos relacionados con el establecimiento y desarrollo de los cultivos sobre la producción de las bacteriocinas es una cuestión bastante compleja que depende del medio base, de la cepa y de la bacteriocina en cuestión. Por otra parte, al ser interactivos los diferentes aspectos susceptibles de ser modificados, es bastante complejo decidir cuales son los factores que influyen en la producción de una bacteriocina y en qué sentido. Lo que sí es un hecho comprobado, es que la maximización del crecimiento de la cepa productora no resulta necesariamente en un aumento proporcional de la producción de bacteriocina. Incluso se ha referido la situación contraria para el caso de plantaricina C (Bárcena *et al.*, 1998), nisina (Kim *et al.*, 1997; Meghroun *et al.*, 1992) y la bacteriocina producida por *E. faecium* RZS C5 (Leroy *et al.*, 2003), entre otras. Es más, De Vuyst *et al.* (1996) dicen que las condiciones desfavorables para el crecimiento de las cepas productoras: baja temperatura, limitación de nutrientes, estrés osmótico, etc., pueden estimular la producción de las bacteriocinas. Esto no sería extraño ya que en los ambientes naturales en los que la producción de estos antagonistas puede tener un fuerte significado

ecológico son frecuentes las situaciones de privación de nutrientes. Nosotros mismos hemos comprobado, como se expone más arriba, que en cultivos en MCM que dieron lugar a poblaciones de células productoras del orden de 10^{13} UFC/ml, se obtenían títulos al menos 3 veces inferiores que en los cultivos optimizados en LA, con niveles poblacionales de aprox. 10^{11} UFC/ml.

La duplicación del tamaño del inóculo, del 4 al 8%, tuvo un efecto ligeramente favorecedor de la producción de AS-48, que además comenzó a detectarse a las 3 h en lugar de a las 6 h, por lo que se adoptó este porcentaje, que disminuía las posibilidades de contaminación de los cultivos, ya que éstos se realizaron generalmente con el medio no sometido a ningún tipo de tratamiento térmico. Uno de los microorganismos que más frecuentemente se detectó como causante de problemas de contaminación fue *Bacillus*, por tanto el iniciar el cultivo con una población densa de células productoras de bacteriocina puede ser una eficaz arma para inhibir el desarrollo de esta bacteria, en general bastante sensible a AS-48. El efecto positivo de aumentar la concentración del inóculo en embutidos tipo salami ha sido descrito también para cultivos iniciadores productores de lacticina 3147 (Scannell *et al.*, 2001). En este caso el tamaño del inóculo era interactivo con la glucosa y con la concentración de Mn y Mg, ya que estos suplementos sólo tenían efecto positivo cuando el inóculo era elevado (10^9 UFC/g). Se ha referido con anterioridad que la población de células que se necesita para que se produzcan cantidades detectables de AS-48 está en torno a 10^7 UFC/ml en cultivos en BHI (Gálvez *et al.*, 1986; Mendoza *et al.*, 1999). En este caso se necesitaron del orden de 10^9 UFC/ml para que se alcanzaran niveles detectables de bacteriocina. Esto puede ser atribuido a una producción más baja de la bacteriocina en este medio, a la existencia de algunos componentes que inhiban su producción y que deben ser agotados o a la adsorción de la molécula a los componentes del medio. Aunque no se puede descartar ninguna hipótesis, lo cierto es que los niveles de AS-48 conseguidos tras optimizar las condiciones del cultivo en LA, exceden en mucho los alcanzados previamente en los medios definidos.

El control del pH afecta positivamente el crecimiento de las BAL y por ello se puede esperar que en muchos casos mejore la producción de las bacteriocinas. Sin embargo, es frecuente que el pH óptimo para la producción de bacteriocinas en estas bacterias esté comprendido entre 5,5-6,5 (Meghroun *et al.*, 1992; Kaiser y Montville, 1993; Parente y Ricciardi, 1994; Parente *et al.*, 1994; Matsusaki *et al.*, 1996; Chinachoti *et al.*, 1997; Amiali *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1999; Aasen *et al.*, 2000), siendo más bajo que el pH

óptimo de crecimiento. Hay unas pocas bacteriocinas que son producidas sólo a pH bajo (5,0 o más bajo). Tales son los casos de pediocina AcH (Biswas *et al.*, 1991) lactocina S (Mortved-Albigaard *et al.*, 1995) o plantaricina C (Bárcena *et al.*, 1998). En nuestro caso AS-48 se produjo óptimamente a pH 6,55-6,65 valor próximo, aunque algo más bajo, al óptimo de crecimiento de la cepa (7,2). En cualquier caso, la estabilización del pH a valores próximos a la neutralidad supuso un aumento de aprox. 1 unidad log en el rendimiento del cultivo en UFC/ml, que se produjo entre las 6 y las 24 h, después de que el cultivo entró en fase estacionaria. Fue justamente en este intervalo de tiempo cuando se produjo el principal aumento en la producción de bacteriocina, que pasó de 20 a 160 UA/ml, desde las 6 a las 15 h. Incluso en algunos experimentos, en las sucesivas horas de incubación, la actividad incrementó hasta 320 UA/ml.

La concentración de glucosa influyó en la producción de AS-48 en cultivos en LA con pH controlado a 6,55, siendo máximos los niveles de actividad a una concentración de glucosa de 1% (320 frente a 160 UA/ml en los cultivos sin glucosa a las 24 h). La presencia de 2 o 3% de glucosa tuvo un efecto neutro en las primeras 16 h y ligeramente negativo a partir de este momento (100 UA/ml y 60 UA/ml con 2 y 3% de glucosa, respectivamente frente a 160 UA/ml sin glucosa 24 h). Este resultado coincide en parte con el descrito por nosotros anteriormente para la producción de AS-48 en CM (Gálvez *et al.*, 1986), en el que se obtenían niveles máximos de bacteriocina con 1 y 2% de glucosa y menores con 4% del azúcar. El efecto estimulador de diferentes azúcares sobre la producción de bacteriocinas se ha referido con anterioridad, siendo muy variable la respuesta según la bacteriocina, la cepa productora y el tipo y concentración de azúcar empleado. Todorov y Dicks (2005) han descrito el efecto favorecedor de la glucosa (2 y 3%) y también de sacarosa, maltosa y manosa (2%), adicionadas al medio MRS, sobre la producción de las bacteriocinas ST28MS y ST26MS producidas por *Lb. plantarum*. En cambio los mismos autores (Todorov y Dicks, 2006) encontraron que en *Lb. plantarum* ST341LD la adición de glucosa (1 y 4%) al medio MRS rendía niveles 50% inferiores de bacteriocina respecto de la máxima actividad obtenida en el mismo medio adicionado de 2 o 3% del azúcar. Es más, la adición de 0,1 y 0,5% de glucosa al medio MRS redujo los niveles máximos de bacteriocina hasta el 3%. La glucosa a concentración superior al 4% redujo también la producción de sakacina P (Aasen *et al.*, 2000). La de enterocina 1146 fue óptima al 2% de glucosa pero cuando se incrementó a 2,5 y 3% no se produjo un incremento proporcional en los niveles máximos de la bacteriocina (Parente *et al.*, 1997). La sacarosa por encima del 4% tiene un efecto

inhibidor de nisina (de Vuyst y Vandamme, 1992). Por el contrario los niveles altos de glucosa favorecieron la producción de plantaricina UG1 (Enan *et al.*, 1996), plantaricina 149 (Kato *et al.*, 1994) y plantaricina ST31 (Todorov *et al.*, 1999). Como se observa el efecto de la glucosa, y de los azúcares en general, sobre la producción de las bacteriocinas es un problema complejo, que quizás esté relacionado y regulado por la disponibilidad no solo de energía sino también de otros nutrientes tales como aminoácidos esenciales que pueden hacerse limitantes cuando la concentración de fuente de carbono aumenta.

El efecto de adición de fuentes nitrogenadas, extracto de levadura o diversos digeridos proteicos, sobre la producción de las bacteriocinas es otro aspecto que tiene un efecto muy diferente según el caso. En el nuestro, su influencia en la producción de AS-48 dependió del medio base al que fueron adicionados. Efectivamente, cuando se suplementó con peptonas de soja y de carne el LS crudo, se obtuvo un efecto beneficioso sobre la producción, pero en cambio cuando el suplemento se aplicó a medio LA no solo no incrementó la producción de AS-48, sino que tras alcanzar el máximo a las 16-18 h, se produjo un ligero descenso en los niveles de bacteriocina. Posiblemente la diferencia radique en que la concentración de proteína del LS crudo es del 0,9% mientras que el medio con 5% de LA contiene un 1,5%. Este mayor contenido en proteína permitió que los cultivos incrementaran 1 unidad log UFC/ml (hasta alcanzar más de 11 log UFC/ml) sólo cuando se estabilizó el pH de los cultivos en LA. Además, cuando se ajustó la concentración de LA al objeto de obtener máxima producción con una menor concentración de sustrato, se obtuvieron mejores resultados con un 5% de LA que con 6%, a pesar de que la cosecha celular bajó de nuevo a 10 log UFC/ml. Estos resultados confirman el hecho observado de que una mejora en el rendimiento en biomasa de los cultivos no se corresponde con un aumento proporcional en la producción de AS-48 y que, incluso en algunos casos, la situación es la contraria, como muestran los datos preliminares obtenidos con cultivos en LS crudo incubados a 28 y 37 °C, en los que la mayor producción tuvo lugar a 28 °C, siendo la concentración de células productoras 1 log UFC/ml menor que a 37 °C. Comparando la composición entre los dos derivados de lactosuero utilizados, LA y el LS Bellac, se observa que las principales diferencias en composición estriban en los contenidos en proteínas (30 frente a 12-14%) y lactosa (52 frente a 70-74%), por lo que podría ser alguno de estos factores, o posiblemente los dos, los responsables de la diferente producción.

El efecto de la adición de complementos nitrogenados complejos se ha estudiado en otras bacteriocinas. Así, Aasen *et al.*, (2000) encuentran una producción óptima de 20,5 mg/L de sakacina P en medio MRS suplementado con extracto de levadura, triptona y glucosa, y concluyen que la producción de altos niveles de esta bacteriocina requiere exceso de nutrientes y de energía. Esto está en desacuerdo con lo propuesto por De Vuyst *et al.*, (1996) y también con el postulado papel ecológico de las bacteriocinas. Sin embargo, Todorov y Dick (2006) también encuentran decisiva la suplementación del medio MRS con triptona para una óptima producción de la bacteriocina producida por *Lb. plantarum* ST341LD. Parente y Hill (1992), con el propósito de diseñar un medio simple en el que obtener una máxima producción de enterocina 1146 y lactococina D, que no interfiriera con la purificación de las mismas, añadieron diferentes concentraciones de triptona, extracto de levadura y tween 80 a un medio mineral con glucosa. Para la producción de enterocina 1146 la triptona no fue importante pero sí el extracto de levadura. En cambio para la producción de lactococina D fueron positivas ambas fuentes nitrogenadas.

De cualquier forma está claro que, además de la heterogeneidad de comportamientos de las distintas cepas productoras de bacteriocinas, es importante la composición de los medios base a la hora de definir las necesidades de suplementar con nutrientes.

Recuperación de AS-48 a partir de los cultivos

La recuperación de las bacteriocinas a partir de los cultivos se ha llevado a cabo de muchas formas diferentes, siendo el método más frecuentemente usado para el aislamiento, concentración y purificación, la precipitación fraccionada con sales seguida de diversas combinaciones de filtración en gel -cromatografía de intercambio iónico, de interacción hidrofóbica, de inmunoafinidad y de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (Gálvez *et al.*, 1989a; Muriana y Luchansky, 1993; Carolissen-Mackay *et al.*, 1997; Abriouel *et al.*, 2003). Aunque estos procedimientos pueden proporcionar excelentes resultados en términos de rendimiento y de purificación (Cintas *et al.*, 1998), la mayoría son inadecuados para la recuperación a gran escala, la cual ha sido desarrollada siguiendo diversos protocolos basados en la adsorción/desadsorción o en la partición en fases. En cualquier caso hay que tener en cuenta los objetivos que se persiguen y el destino final que se va a dar a la bacteriocina. Desde luego, si ha de ser aplicada en alimentos, una consideración importante es que, en

el curso del proceso o tras el mismo, se produzca la eliminación de las células productoras.

La bacteriocina AS-48 ha sido recuperada con una eficacia del 93,6% a partir de los cultivos en LA adicionada de 1% de glucosa, mediante adsorción directa de los mismos sobre la resina de intercambio catiónico CM25 y posterior elución con NaCl 1,5 M. Este rendimiento ha sido similar al obtenido cuando la cepa productora A-48-32 se cultivó en MCM (Abriouel *et al.*, 2003). El único inconveniente que representó el uso del medio basado en LA, fue que éste no pudo ser tratado térmicamente para evitar la contaminación, ya que la formación de precipitados de proteína interfería con la elución de la bacteriocina. Este problema ha sido referido también por Guerra *et al.*, (2001) en la adecuación del lactosuero crudo al objeto de obtener a partir de él nisina y pediocina. Estos autores, tras calentar a 121 °C durante 15 min, centrifugan a 12000 x g durante 15 min. para retirar las proteínas precipitadas y someten a un nuevo ciclo de esterilización el sobrenadante. Puesto que aplicar este procedimiento, además de encarecer la recuperación, era inviable para nosotros a la vista de los volúmenes de 10-20 L que se preparaban habitualmente del medio LA, se optó por no esterilizar el medio e incrementar el volumen del inóculo hasta un 8% para obtener rápidamente una concentración alta de células productoras. Además, en la recuperación de la bacteriocina se decidió no centrifugar los cultivos antes de ponerlos en contacto con la resina, ya que significaba un importante ahorro de tiempo y previamente se había comprobado que se conseguían resultados óptimos por adsorción directa sobre el gel, siempre que el pH estuviese comprendido en valores de 6-7. Por otro lado, ya que las bacterias no interaccionan con la matriz, era de esperar que fuesen eliminadas en gran parte al lavar con agua destilada.

Los resultados confirmaron la conveniencia del proceso desarrollado para cultivos en MCM, ya que se obtuvo muy buena recuperación y una importante reducción en el número de células, que pasó de ser del orden de 10^{10} UFC/ml hasta 10^8 UFC/ml (reducción del 99,9%). Es importante señalar que la matriz, tras ser lavada con NaCl 1,5 M se regeneró por completo, pudiendo ser usada indefinidamente sin pérdidas apreciables en sus propiedades. La purificación obtenida en esta etapa fue muy superior a la referida cuando se usó el mismo proceso para purificar la enterocina a partir de los cultivos en medio MCM, debido a que éste medio carece prácticamente de proteínas y de péptidos.

Sin embargo, por el alto contenido en células, las preparaciones no eran adecuadas para su uso posterior en los experimentos de bioconservación; por ello se han aplicado dos tratamientos alternativos para eliminarlas de las preparaciones: la filtración a través de membranas de tamaño de poro 0,22 μm y el tratamiento térmico.

El paso a través de membranas hechas con distintos materiales: ésteres de celulosa (con ligera carga negativa a pH 3-7), fluoruro de polivinilideno (PVDF) (baja retención proteica) y poliétersulfona (PES) (muy baja retención proteica) eliminó la práctica totalidad de las células, pero se observó una retención de la enterocina (50%) en las dos primeras, siendo la de PES la única que no produjo pérdida de actividad.

En la aplicación del tratamiento térmico hubo de tenerse en cuenta de un lado la alta estabilidad térmica de los enterococos (la mayoría resisten 62,8 °C durante 30 min) y la estabilidad de la enterocina al calor, al objeto de encontrar un tratamiento que eliminase las células y mantuviera intacta la actividad de AS-48. El que dio mejores resultados fue 90 °C durante 5 min., que mantuvo la actividad inalterada, eliminando las células por completo.

Es interesante destacar que las muestras obtenidas a partir del intercambio catiónico pudieron ser subsiguientemente purificadas mediante HPLC de fase reversa, aunque el grado de purificación que se logró fue menor comparativamente con la correspondiente etapa del proceso referido por Abriouel *et al.*, (2003). Esto posiblemente se deba a la interferencia de la gran cantidad de proteínas que contiene el medio de partida con las que posiblemente interaccione AS-48. No obstante, la enterocina eluyó en un solo pico de proteína, susceptible de ser repurificado en una siguiente etapa analítica.

La necesidad de eliminar el mayor número posible de células productoras de las preparaciones de AS-48 de un lado y de otro de concentrar al máximo las preparaciones de la bacteriocina de forma que se pudieran aplicar concentraciones más altas de la misma en alimentos, motivó el empleo de la técnica de filtración tagencial (flujo cruzado) para intentar lograr ambos propósitos. El empleo de un flujo cruzado en la filtración a través de membrana disminuye grandemente los problemas de obturación de las membranas que tienen lugar cuando se emplea un flujo perpendicular. En el caso de la microfiltración a través de membranas de 0,45 o de 0,22 μm de tamaño de poro resultó en una pérdida de actividad en torno a 50%. Aunque una parte de la actividad quedaba en el retenido, junto con las células, otra parte no fue detectada ni a un lado ni al otro de la membrana. Nuestros experimentos de filtración convencional a través de filtros de membrana, junto con los preliminares realizados con el sistema Pellicon XL

(Millipore) con membranas de PES, hacen pensar que la cantidad de bacteriocina perdida en el proceso de microfiltración en el equipo Pellicon 2 podría haber quedado retenida a su paso a través de la membrana, cuya naturaleza era inevitablemente de PVDF. Otra posibilidad a considerar es que la bacteriocina quedase retenida a los precipitados de proteína, que visiblemente se veían concentrados en el retenido. Sin embargo el hecho de que se obtuviera un porcentaje de pérdida similar en los experimentos realizados con cultivos en LA y en BHI parece indicar que las pérdidas de actividad no son atribuibles a la composición del medio sino a la naturaleza de la membrana y a la gran tendencia que tiene AS-48 de adsorberse a superficies y moléculas dada su doble naturaleza hidrofóbica e hidrofílica-catiónica.

El retenido contenía un porcentaje de actividad en torno al 30% y además un 99,9% de las células. Esta es una actividad recuperable por otros procedimientos tales como el intercambio por CM25 pero ello implicaría como poco diversificar la metodología aplicada, aún en el caso de que la alta concentración de precipitados de proteína no interfiriera en el proceso.

La interferencia de la presencia de partículas en la microfiltración de cultivos celulares ha sido referida por otros autores. Persson *et al.* (2001) describen la formación de una “torta” de partículas (cake) sobre la superficie de la membrana, que producía una rápida caída del flujo, cuando filtraban cultivos de bacterias lácticas crecidas en hidrolizado de harina de trigo particulada. Esta caída no tenía lugar cuando se cultivaban las bacterias sobre medios no particulados, medio enriquecido (glucosa, extracto levadura, sales) o hidrolizado de harina de trigo no particulado, a pesar de que la concentración de células en los tres tipos de medios era la misma. La formación de esta torta se podía evitar en parte llevando a cabo la filtración a un flujo más bajo.

La ultrafiltración de los cultivos una vez clarificados a través de una membrana de tamaño de poro de 5 kDa aparentemente resultó en la pérdida de más del 70% de la actividad de la bacteriocina en el retenido, sin que esta apareciera en el permeado. Sin embargo cuando los retenidos se aplicaron sobre CM25 y posteriormente se desadsorbió la bacteriocina con NaCl 1,5 M se obtuvieron recuperaciones que iban desde aprox. 150% hasta el 220%. Ello parece indicar que la pérdida aparente de bacteriocina sea más bien un enmascaramiento de su actividad debida a la formación de agregados o a la adsorción a componentes de medio. De hecho se ha referido que la concentración de la bacteriocina purificada es un factor que afecta a la formación de agregados, la cual está favorecida a concentraciones crecientes de la misma a pH ácido (3-5) (Abriouel *et al.*,

2001). Puesto que no se ha cuantificado la diferente actividad de los agregados respecto a la del monómero no podemos saber con exactitud como influye la concentración de las moléculas de AS-48, que tiene lugar en el retenido, sobre la actividad de la bacteriocina. La más alta recuperación (superior al 60%) observada cuando se concentran los permeados de los cultivos en BHI hace pensar que también influya la adsorción a partículas del medio (más abundantes en medio LA) sobre la pérdida de actividad detectada en esta etapa. Realmente, para cuantificar el porcentaje de actividad recuperada habría que recurrir a métodos que valoren la cantidad de péptido-bacteriocina y no a su actividad.

La recuperación de la bacteriocina se llevó a cabo también mediante atomización y desecado a vacío (electrospray). En realidad no se trata en sentido estricto de una recuperación ya que no se separa la enterocina del medio de cultivo, sino que se somete a desecación todo el conjunto (bacteriocina, células productoras y medio de cultivo) al objeto de obtener preparaciones activas e inactivar el mayor número posible de células. De cualquier forma hay que considerarlos como experimentos previos que no se han podido repetir por no disponer del sistema de electrospray.

La producción de AS-48 fue muy alta en todos los sustratos lácteos en las condiciones allí estandarizadas: lactosuero desmineralizado 10% y leche desnatada 10 y 20%. Los mejores resultados se obtuvieron en el medio lactosuero desmineralizado 10% en el que se produjeron concentraciones muy altas de AS-48 (40.960 UA/ml) y la posterior reconstitución del polvo fue mejor y dio más actividad. El rendimiento en AS-48 de los cultivos fue cuatro veces superior al obtenido para lacticina 3147 en LS desmineralizado, pero tras la reconstitución del polvo al 5 y al 10%, se detectó solo el 6,25% de la actividad original determinada en los cultivos, mientras que en el caso de la lacticina los mismos autores refieren que no hubo pérdida de actividad en el proceso (Morgan *et al.*, 1999). Hay que señalar, sin embargo, que se detectó la misma actividad cuando el polvo se reconstituyó al 5 o al 10%, indicando que en el ensayo no se estaba valorando la actividad real de la muestra. Sin embargo, el polvo de AS-48 adicionado al 1% fue muy activo en medio líquido BHI frente a *L. monocytogenes* CECT 4032, siendo capaz de matar a la totalidad de las 3,19 log UFC/ml inoculadas, en menos de 4 h a 28 °C. Puesto que las células no tratadas estaban en activo crecimiento, esto representó una diferencia con el control de 8,88 log UFC/ml a las 72 h. Es difícil comparar con los experimentos realizados en este mismo sentido con lacticina 3147 (Morgan *et al.*, 1999) ya que éstos se llevaron a cabo en tampón con una población de

L. monocytogenes comprendida entre 7-8 log UFC/ml. En estas condiciones un 10% del polvo activo conteniendo lacticina redujo la población de listerias en 3,8 log y no hubo crecimiento en los controles no tratados.

No se pudo ensayar el preparado obtenido en leche debido a la imposibilidad de eliminar del polvo reconstituido al 10% la cepa productora que se encuentra en concentraciones en $7,4 \times 10^4$ UFC/ml. Su eliminación del preparado disuelto en BHI, en cualquier caso aparente, se consiguió con dos choques térmicos de 90 °C durante 15 min. No obstante, como se puede ver en resultados, la pequeña fracción superviviente residual, recuperó la vitalidad en las siguientes horas y alcanzó niveles suficientes para producir cantidades detectables de AS-48 en torno a las 48 h. La mayor complejidad de la leche hizo inviable eliminar los enterococos productores mediante choque térmico sin producir la inactivación paralela de la enterocina, y tampoco fue posible eliminarlos por filtración. Por ello, en los ensayos realizados de inhibición de *L. monocytogenes* en este medio, el crecimiento de la cepa productora se disparó rápidamente y no fue posible por tanto conocer si la inhibición de *Listeria* fue debida a la enterocina adicionada o a la producida *in situ* (resultados no mostrados). Es sabido que la sensibilidad de los microorganismos al calor está influenciada profundamente por factores físico-químicos, tales como el pH, a_w , contenido en sal y la composición orgánica del medio en que están suspendidos (Condon y Sala, 1992; Splittstoesser *et al.*, 1986). Estos factores, además de influir en el estado fisiológico de las células, afectan a la penetración del calor y a su distribución homogénea en el medio (Casp y Abril, 1999). Habrá que esperar a realizar el experimento acoplado a la desecación, un procesado térmico previo de los cultivos (de pasterización o mejor un tratamiento UHT) para decidir si este sistema de desecación es útil en la obtención de preparaciones activas libres de células. El tratamiento térmico previo a la desecación, al producir una reducción inicial de la concentración de células, facilitaría su completa inactivación con las altas temperaturas alcanzadas en el interior de aparato de electrospray. No obstante habrá que verificar además si la pérdida de actividad que se detecta durante el proceso y la falta de estabilidad en el almacenamiento son reales, realizando ensayos adicionales en cultivos líquidos en los que se ha comprobado que la desadsorción está facilitada.

RESULTADOS CAPÍTULO II

II. EFECTO DE LA ADICIÓN DE AS-48 SOBRE EL CONTROL DE BACTERIAS PATÓGENAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS LÁCTEOS

En trabajos previos realizados por nuestro Grupo se ha comprobado que la enterocina AS-48 muestra una gran actividad en medios de cultivo convencionales sobre bacterias patógenas transmitidas por alimentos tales como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, bien por sí sola o combinada con otros agentes antimicrobianos, físicos o químicos (Abriouel *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 1999; Abriouel *et al.*, 2002; Ananou *et al.*, 2004). Puesto que es sabido que la actividad de las bacteriocinas depende en gran medida de la composición y de las características fisicoquímicas del medio, se procedió a evaluar su utilidad en sistemas alimentarios reales, implementándola en los mismos tanto mediante su producción *in situ* por cepas bacteriocinogénicas en el caso de alimentos fermentados, como mediante la adición de preparados semipurificados activos y exentos de células, obtenidos a partir de cultivos de la cepa productora (producida *ex situ*). En este sentido, y puesto que la composición de los distintos alimentos es muy heterogénea, se han abierto tres líneas principales de trabajo, dirigidas a demostrar la eficacia de AS-48 en alimentos cárnicos, lácteos y vegetales, que han rendido buenos resultados, al menos en los tipos concretos de productos ensayados.

1. Efecto de AS-48 producido *in situ* en leche y quesos

En este estudio se ha ensayado la capacidad de dos cepas de enterococos productoras de AS-48, *E. faecalis* A-48-32 y *E. faecium* UJA32-81, usadas como adjuntos de cultivos iniciadores, para controlar a las cepas patógenas *B. cereus* LWL-1, psicrotrófica y enterotoxigénica, *L. monocytogenes* CECT 4031, y *S. aureus* CECT 976, productora de enterotoxina A, elegidas por ser bacterias transmitidas por leche y derivados lácteos.

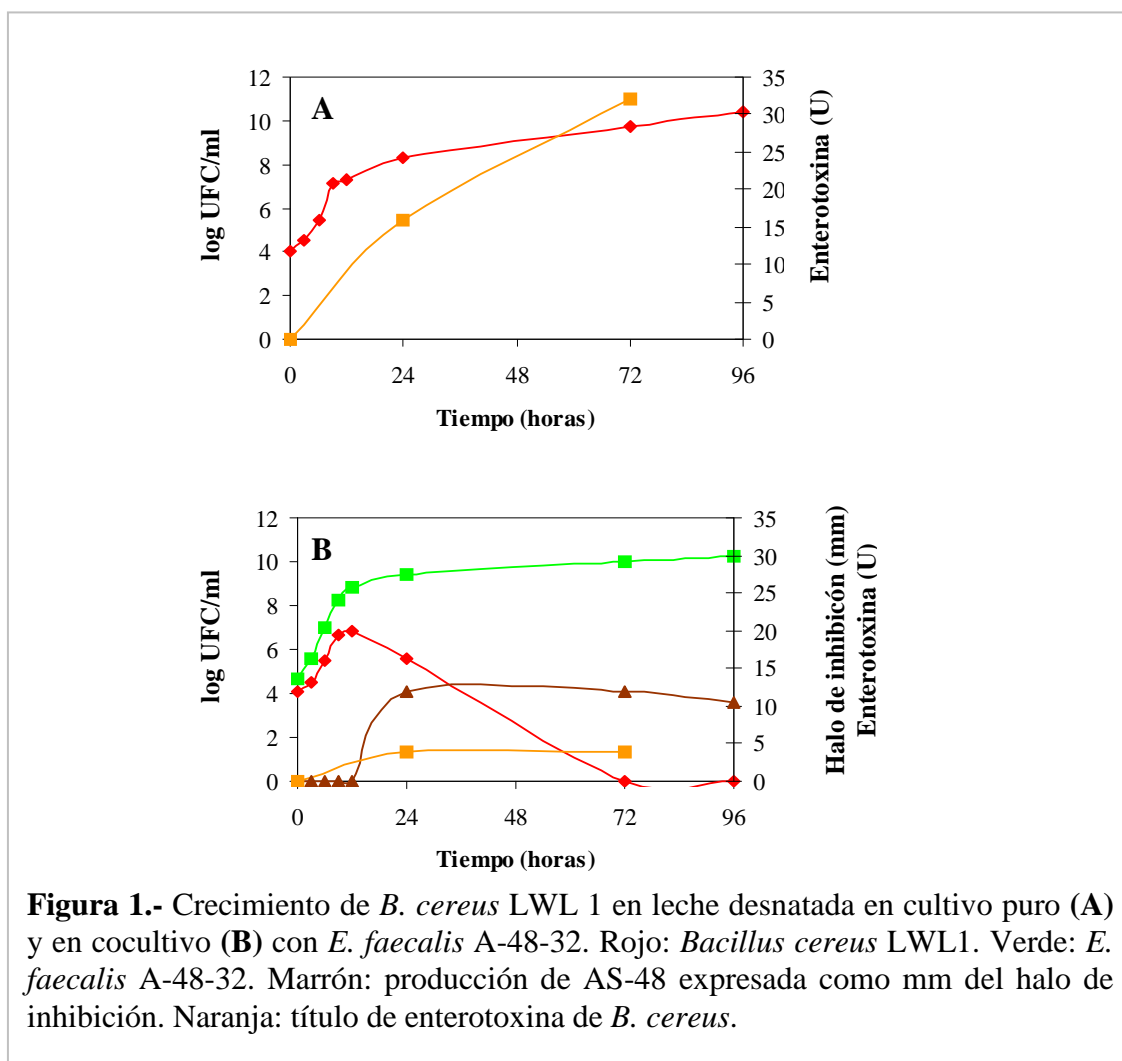
1.1. Efecto sobre *Bacillus cereus*

INHIBICIÓN DE *B. CEREBUS* EN LECHE DESNATADA

El experimento, planteado según se explica en Métodos, demostró que en los cultivos controles, *B. cereus* alcanzó concentraciones en torno a 10^{10} - 10^{11} UFC/ml (Fig.

1A). Sin embargo en los cocultivos realizados con la cepa AS-48⁺ *E. faecalis* A-48-32, a una concentración inicial relativa de, aproximadamente 10^5 enterococos/ 10^4 bacilos (10/1), aunque la concentración de los segundos incrementó inicialmente hasta 10^7 UFC/ml en las primeras 9-12 horas, a partir de este momento se produjo una drástica caída de la población hasta un nivel indetectable (menos de 10^1 UFC/ml) a las 72 horas de incubación (Fig. 1B). Esta disminución en el recuento de células viables de la cepa LWL1 estuvo seguramente relacionada con la producción de AS-48, si bien no fue posible su detección en las primeras 12 h. Aunque no se tomaron muestras entre las 12 y 24 horas es presumible que a partir de las 12 h se comenzaran a acumular niveles detectables de AS-48 ya que a las 24 se habían alcanzado los niveles máximos de la misma, que se mantuvieron estables a lo largo del experimento.

La enterotoxina de *B. cereus* se detectó tras 24 horas de incubación en el cultivo control, alcanzando un título de 32 U a las 48 horas (Fig. 1A). Los títulos de enterotoxina en el cocultivo fueron 4 veces menores (4 frente a 16 tras 24 horas de incubación) y no incrementaron en el subsiguiente periodo de incubación (Fig. 1B).



INHIBICIÓN DE *B. CEREUS* DURANTE LA MADURACIÓN DE UN QUESO TIPO MANCHEGO

En los quesos controles fabricados con un cultivo iniciador mesofílico comercial y contaminados con *B. cereus* (aproximadamente 10^4 UFC/ml de leche), el crecimiento de esta cepa alcanzó concentraciones de 10^8 UFC/g a los 15 días de maduración a pesar del descenso del pH hasta valores próximos a 5. Este nivel de contaminación no varió durante las dos semanas siguientes de maduración (Fig. 2A). En los quesos elaborados con la cepa productora de AS-48 como cultivo adjunto a los iniciadores a una relación inicial en la leche de 2 enterococos/1 bacilo, esta proporción cambió a 15 enterococos/1 bacilo como consecuencia de las manipulaciones realizadas durante la coagulación y el desuerado del producto. En estos quesos los recuentos de *B. cereus* en los primeros cinco días de maduración fueron menores que en los quesos control, si bien las diferencias no fueron significativas (5,31 log UFC/g en quesos experimentales y 6,27 log UFC/g en quesos control). A los 10 días de maduración se acentuaron las diferencias entre los quesos controles y los experimentales, siendo las concentraciones de *B. cereus* viables, notablemente inferiores en los quesos tratados (6,56 log UFC/g en los controles frente a 4,62 log UFC/g en los inoculados con la cepa bacteriocinogénica), y a los 15 y 30 días de maduración las diferencias entre el control y el cocultivo ya fueron significativas ($P < 0,01$), siendo los recuentos de 3,69 log UFC/g en los tratados frente a los 8 log UFC/g en los controles y de 2,5 log UFC/g en los tratados frente a los 8,12 log UFC/g en los controles, respectivamente. Hay que señalar que la pequeña fracción celular, del orden de 10^2 células/g, que permaneció viable al final del experimento probablemente consistía en esporas ya presentes quizás en el inóculo, ya que, cuando las diluciones de las muestras tomadas el día 30 se calentaron a 80 °C durante 10 minutos para inactivar las células vegetativas y después se sembraron en placas, los recuentos de viables de *B. cereus* fueron el 98,2% con respecto a las muestras no calentadas.

Desafortunadamente, no fue posible determinar la producción de enterotoxina en los extractos de queso debido a la reacción positiva observada en todas las muestras, incluyendo aquellas que contenían látex no sensibilizado (control negativo).

El descenso en la concentración de *B. cereus* coincidió con la detección de AS-48 en los extractos (día 5) (Fig. 2B). Tal y como se esperaba, la actividad inhibidora sólo se

detectó en los quesos inoculados con la cepa productora de AS-48. El crecimiento de los cultivos iniciadores no se vio afectado por la presencia de la cepa productora de bacteriocina y los recuentos sobrepasaron las 8 log UFC/g en ambos tipos de queso.

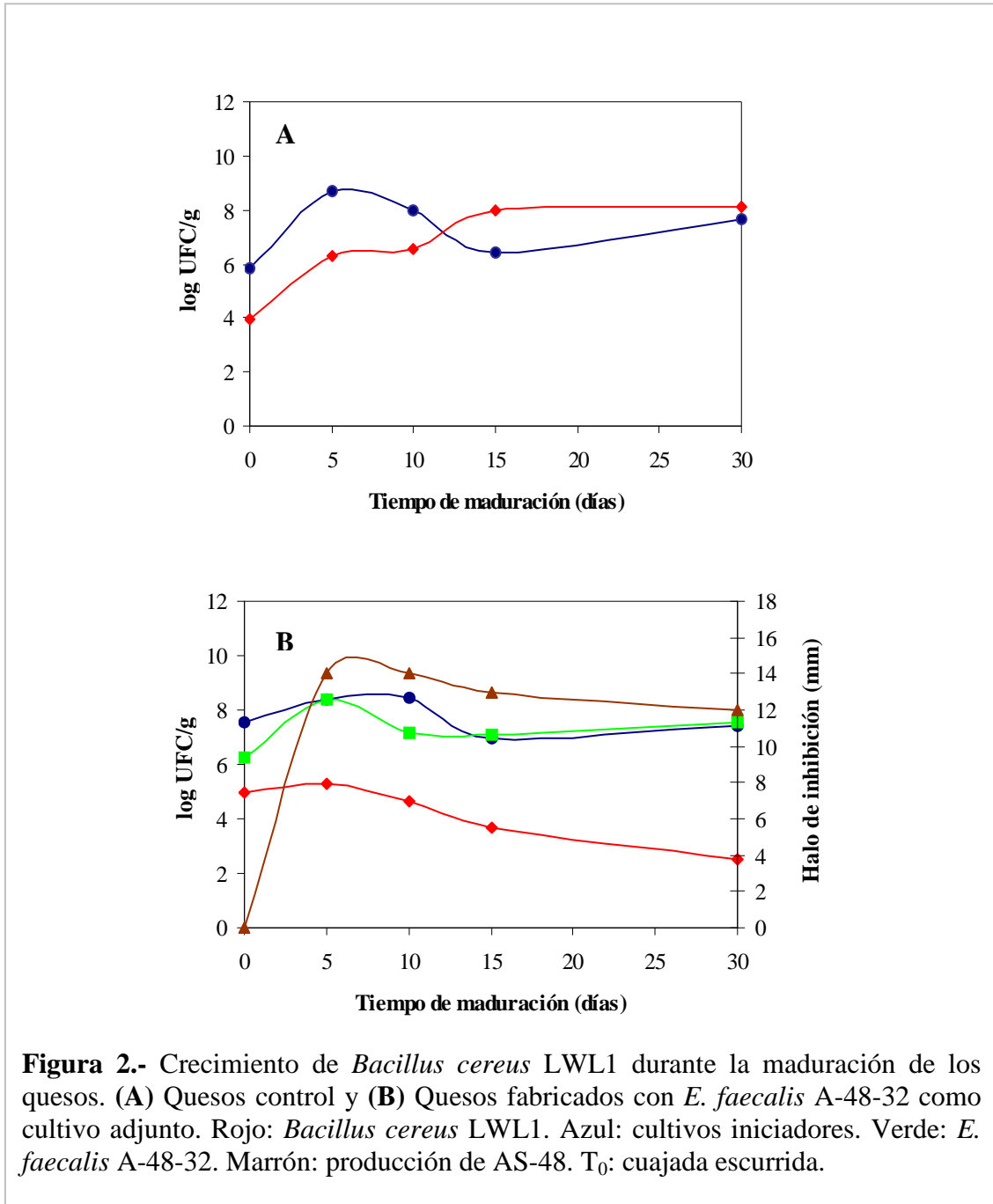
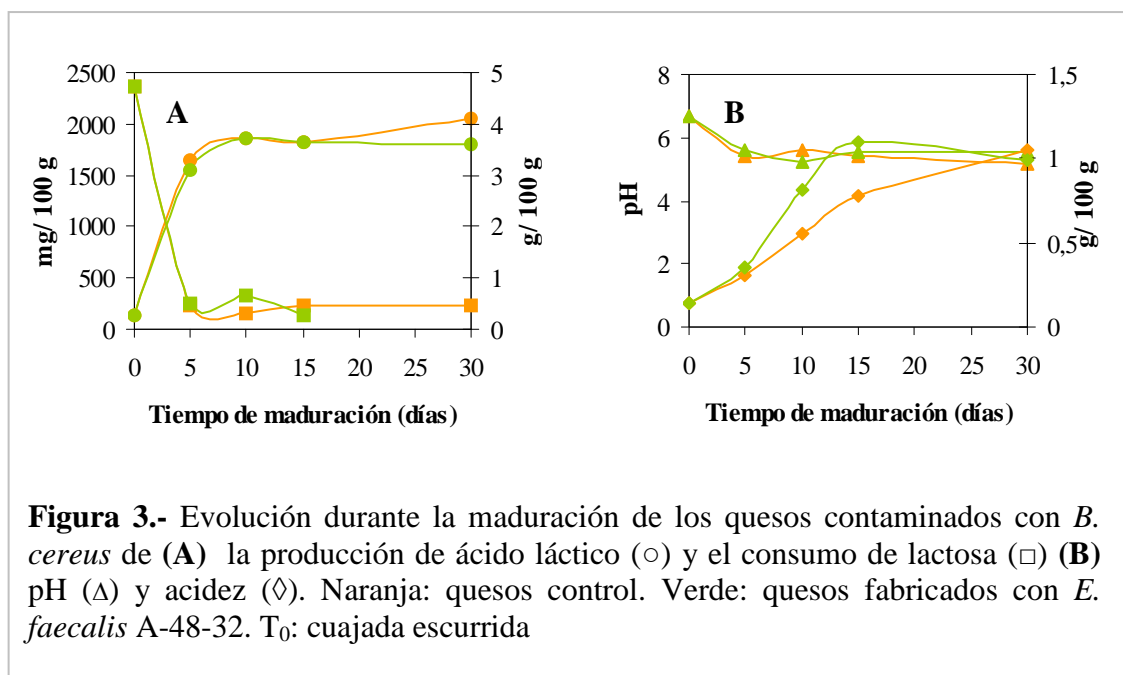


Figura 2.- Crecimiento de *Bacillus cereus* LWL1 durante la maduración de los quesos. (A) Quesos control y (B) Quesos fabricados con *E. faecalis* A-48-32 como cultivo adjunto. Rojo: *Bacillus cereus* LWL1. Azul: cultivos iniciadores. Verde: *E. faecalis* A-48-32. Marrón: producción de AS-48. T₀: cuajada escurrida.

También se investigó la influencia de la presencia de la cepa bacteriocinogénica sobre diversos parámetros fisicoquímicos de interés en el proceso de maduración y en las características organolépticas de los quesos.

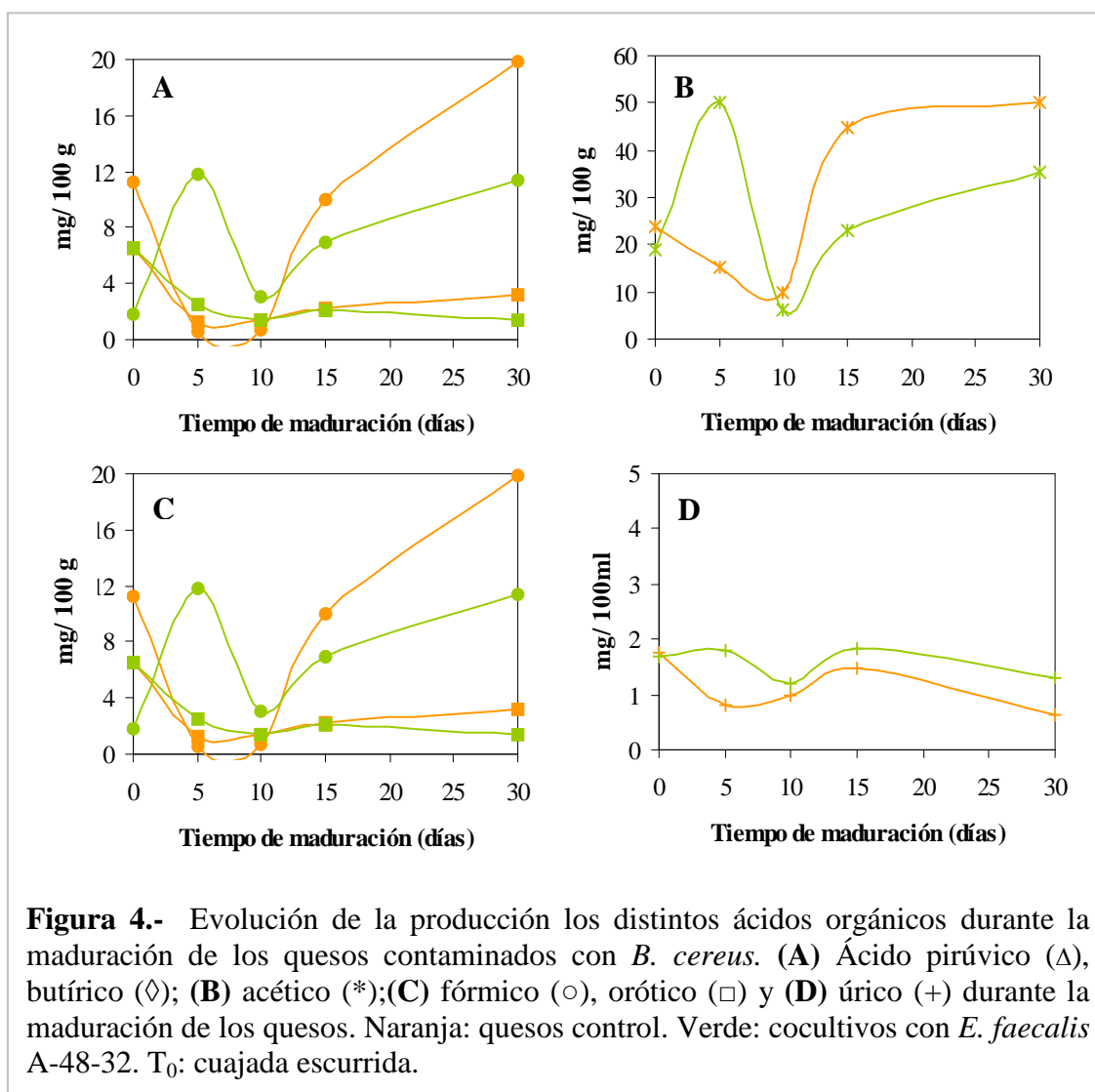
Dado que la presencia de la cepa productora no afectó a los cultivos iniciadores, tampoco se vio afectada la evolución de la producción de ácido láctico (el principal producto final en la fermentación) y el consumo de lactosa durante la maduración fue similar en los quesos control y en los experimentales (Fig. 3A). La evolución del pH fue similar en los quesos inoculados con la cepa productora de AS-48 respecto a los controles; sin embargo, la acidez fue mayor en los quesos experimentales entre los días 5 y 15 de maduración, igualándose a la de los controles en el día 30 (Fig. 3B). Probablemente, la presencia de compuestos neutralizantes en los quesos experimentales sea la responsable de este desacoplamiento entre el pH y la acidez.



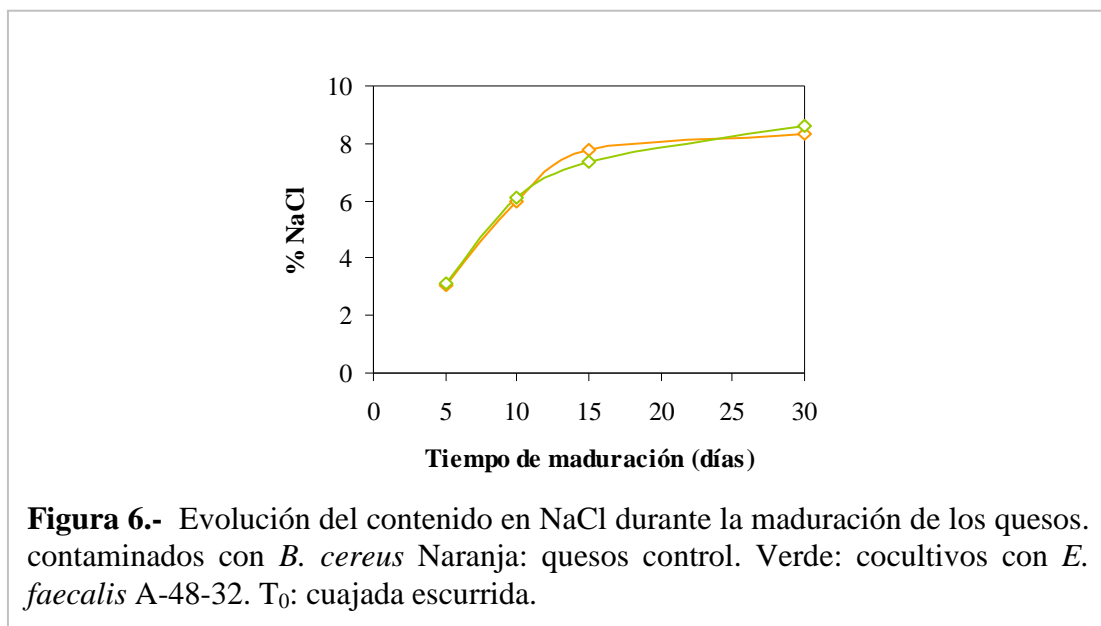
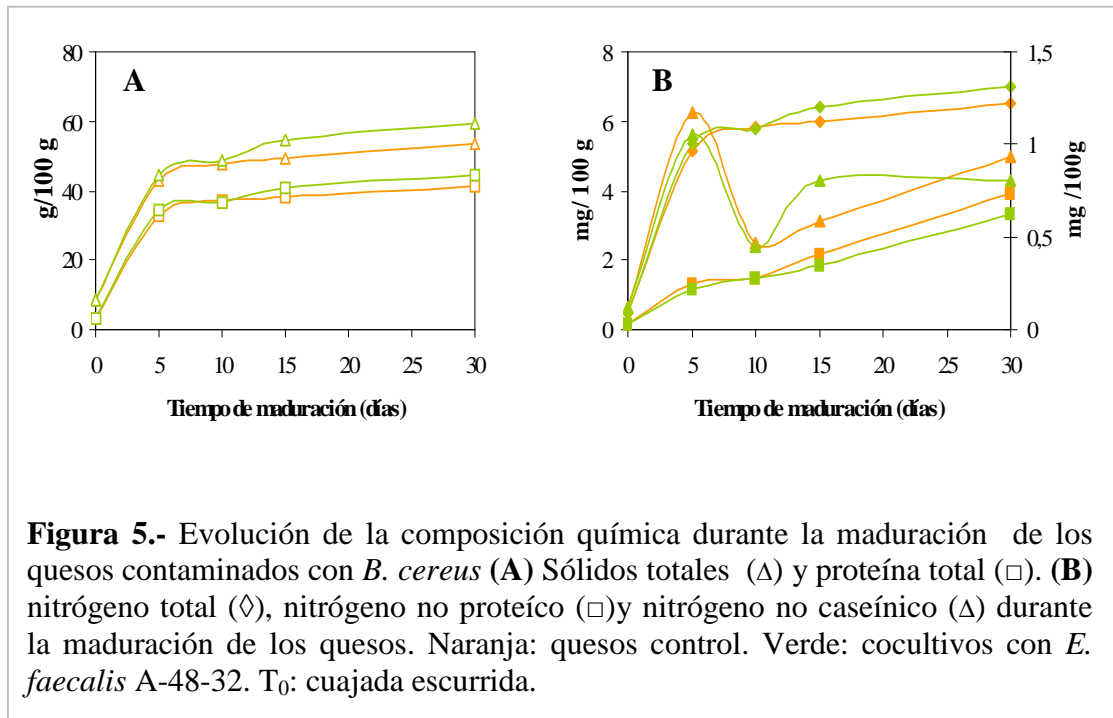
Respecto de la influencia sobre la producción de otros ácidos orgánicos, el patrón de ácido pirúvico (metabolito intermediario en la producción de ácido láctico), resultó ser similar en ambos tipos de quesos (Fig. 4A). Igualmente se detectaron niveles apreciables de ácido fórmico y acético (Fig. 4C y B) durante la maduración de ambos tipos de queso.

Se observaron algunas diferencias en el perfil del ácido butírico a los 10 días de maduración entre ambos tipos de queso, correspondiendo los niveles más altos a los quesos experimentales (Fig. 4A). El contenido en ácido orótico disminuyó durante los

primeros días de maduración (Fig. 4C), mientras que el contenido en ácido úrico permaneció estable durante todo el proceso en ambos tipos de queso (Fig. 4D). Los valores obtenidos para dichos ácidos se recogen en la Tabla 1.



Otros parámetros de interés tecnológico en los quesos, son el contenido en las diferentes fracciones nitrogenadas y materia seca. Los principales valores de estos parámetros en los quesos control y en los experimentales se muestran en las Fig. 5 y 6 y en la Tabla 2. En lo referente al contenido en sólidos totales y proteína total, se observó un incremento similar en los quesos elaborados con la cepa bacteriocinogénica con respecto a los controles. La evolución de dichos valores indicó un moderado grado de proteólisis.



Solo en este caso, de la determinación de los parámetros fisicoquímicos de los quesos, se presentan los datos por duplicado, en Tablas y gráficas, para facilitar la lectura y comprensión de los mismos. En el resto de la memoria se ha optado por uno u otro tipo de presentación, según los casos.

Maduración (días)	Fuente de variación	Ácidos orgánicos (mg/100 g)					
		Pirúvico	Fórmico	Úrico	Orótico	Acético	Butírico
1	C	6,70 ± 5,12	11,25 ± 1,58	1,76 ± 1,14	6,55 ± 0,53	23,88 ± 1,87	
	T	6,70 ± 5,12	1,87 ± 1,63*	1,68 ± 1,26	6,55 ± 0,53	18,88 ± 5,20	
5	C	5,14 ± 1,39	0,55 ± 0,57	0,80 ± 0,028	1,30 ± 0,21	15,33 ± 17,18	12,48 ^a
	T	5,54 ± 2,86	11,82 ± 1,78*	1,81 ± 0,84	2,47 ± 1,25	53,24 ± 3,48	9,94 ^a
10	C	6,48 ± 0,51	2,79 ± 2,05	0,99 ± 0,12	1,34 ± 0,14	12,68 ± 4,96	9,36 ^a
	T	5,14 ± 2,40	5,91 ± 2,79	1,19 ± 0,037	1,37 ± 0,11	50,37 ^a	16,20 ^a
15	C	7,09 ± 1,00	6,61 ± 3,34	1,49 ± 1,49	2,21 ± 1,56	45,00 ^a	8,72 ^a
	T	7,65 ± 0,32	7,20 ± 0,34	1,83 ± 0,46	2,04 ± 1,01	29,64 ± 6,6	9,65 ^a
30	C	10,56 ± 5,25	18,86 ± 1,03	0,64 ± 0,69	3,21 ± 2,20	47,76 ± 2,51	7,34 ^a
	T	10,23 ± 3,17	13,08 ± 1,68	1,29 ± 0,20	1,39 ± 0,11	28,90 ± 6,5	6,18 ^a

P < 0,05 *; ^a Determinación hecha para un solo experimento

Tabla 1.- Evolución de los ácidos orgánicos en los quesos control (C) y en los quesos inoculados con la cepa bacteriocinogénica (T). Los datos se expresan como media ± desviación estándar; n=2.

Maduración (días)	Fuente de variación	Sólidos totales (%)	Proteína Total (g/100 ml)	Nitrógeno Total (g/100 ml)	Nitrógeno No Caseínico (%TN)	Nitrógeno No Proteico (%TN)
1	C	8,44 ± 0,15	3,20 ± 0,11	0,50 ± 0,019	24 ± 0,02	ND
	T	8,44 ± 0,15	3,20 ± 0,11	0,50 ± 0,019	24 ± 0,02	
5	C	42,67 ± 2,55	32,67 ± 0,54	5,12 ± 0,08	15,2 ± 0,60	4,82 ± 1,36
	T	42,64 ± 4,54	34,23 ± 5,31	5,37 ± 0,83	19,5 ± 1,11	3,89 ± 1,86
10	C	47,59 ± 4,41	37,33 ± 2,21	5,85 ± 0,35	8,03 ± 0,02	4,71 ± 0,01
	T	48,78 ± 2,23	36,74 ± 1,35	5,76 ± 0,21	7,81 ± 0,04	4,78 ± 0,01
15	C	49,44 ± 1,10	38,24 ± 0,45	5,99 ± 0,07	9,68 ± 0,31	6,67 ± 1,33
	T	54,32 ± 5,71	40,85 ± 3,24	6,40 ± 0,51	12,6 ± 0,43	5,30 ± 0,93
30	C	53,25 ± 1,46	41,48 ± 1,48	6,50 ± 0,23	14,3 ± 0,05	11,23 ± 0,15
	T	59,14 ± 6,24	44,54 ± 1,48	6,97 ± 0,24	11,4 ± 0,33	9,03 ± 1,32

P < 0,05 *; ND: No determinada

Tabla 2.- Evolución de la composición química en los quesos control (C) y en los quesos inoculados con la cepa bacteriocinogénica (T). Los datos se expresan como media ± desviación estándar; n=2.

1.2. Efecto sobre *Listeria monocytogenes*

EN LECHE DESNATADA

Al iniciar estos experimentos se disponía de la cepa la UJA32-81 de *E. faecium*, productora de AS-48 (Fernández, 2004). Es sabido que las cepas de *E. faecium* son más seguras en cuanto a la menor presencia de determinantes de virulencia y de hecho su implicación en infecciones es mucho más baja. Algunas de ellas se han empleado como cultivos iniciadores en la fabricación de quesos (Sarantinopoulous *et al.*, 2002 a y b, Foulquié-Moreno *et al.*, 2003) y también como probióticos (Strompfová *et al.*, 2004; Franz *et al.*, 2003). Por ello los ensayos se realizaron con ella así como con la cepa productora habitual de *E. faecalis*, A-48-32, para comparar el comportamiento de las mismas en estos alimentos.

En los cultivos control realizados en leche desnatada, los recuentos de *L. monocytogenes* incrementaron de 4,6 log UFC/ml hasta 6,8 log UFC/ml (Fig. 7A) en las primeras 8 h de incubación, permaneciendo en estos niveles durante el transcurso del experimento (72 h).

En los cocultivos con la cepa productora, la proporción inicial (38:1) entre *E. faecalis* A-48-32 ($1,7 \times 10^6$ UFC/ml) y *L. monocytogenes* ($4,5 \times 10^4$ UFC/ml) cambió tras 72 h de incubación. Aunque en las primeras 8 h de incubación *L. monocytogenes* experimentó un crecimiento (1,8 unidades log/ml), los recuentos de viables cayeron drásticamente por debajo del límite de detección (<10 UFC/ml) a las 72 h de incubación. (Fig. 7B). Resultados similares se obtuvieron en los cocultivos de *E. faecium* UJA32-81 y *L. monocytogenes* (proporción inicial enterocos/listerias de 20:1) (Fig. 7C), si bien en este caso la caída en los recuentos de *Listeria* fue ligeramente menor. En cuanto a la producción de AS-48 (máxima entre las 8 y 24 h), se obtuvieron patrones similares con las dos cepas productoras, si bien las concentraciones de enterocina resultaron ser ligeramente mayores para la cepa A-48-32, comparada con la cepa UJA32-81 (con halos de inhibición de 11 y 10 mm de diámetro respectivamente). En ambos casos, el efecto inhibitor sobre *L. monocytogenes* estaba directamente correlacionada con la producción de AS-48, y los recuentos (1 y 0 log UFC/ml para cocultivos con A-48-32 y 1,65 y 0 log UFC/ml con UJA32-81) diferían significativamente ($P < 0,001$) de los controles tras 48 y 72 h (6,78 log UFC/ml).

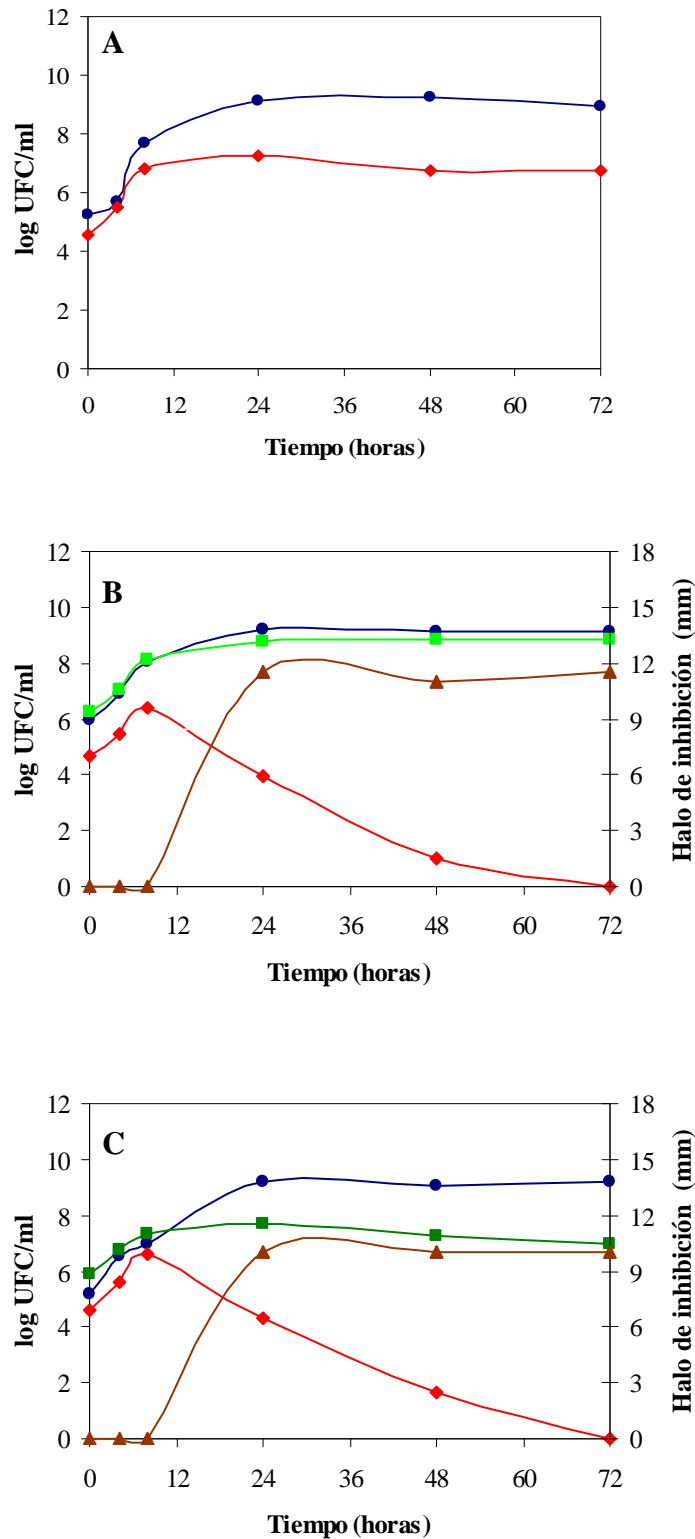


Figura 7.- Crecimiento de *L. monocytogenes* en leche desnatada inoculada con los iniciadores (A). En cocultivo con los iniciadores y las cepas productoras (B). *E. faecalis* A-48-32. (C) *E. faecium* UJA32-81. Rojo: *L. monocytogenes*. Azul: cultivos iniciadores. Verde claro: *E. faecalis* A-48-32. Verde oscuro: *E. faecium* UJA32-81. Marrón: producción de AS-48.

EN QUESO TIPO MANCHEGO

El desarrollo de las BAL fue muy similar tanto en los quesos control como en los fabricados con cualquiera de las dos cepas productoras de AS-48, alcanzando recuentos de aproximadamente 9 log UFC/g en el día 7 de maduración. En consecuencia, la evolución del pH fue también similar en todos los ensayos, bajando a 5,38, 5,48 y 5,48 en los quesos control y en aquellos elaborados con *E. faecalis* A-48-32 y *E. faecium* UJA32-81, respectivamente.

En contraste, el comportamiento de *L. monocytogenes* fue muy diferente en los quesos control con respecto a aquellos inoculados con cualquiera de las cepas productoras como cultivos adjuntos. En los controles, fabricados con un cultivo iniciador mesofílico comercial y contaminados con *L. monocytogenes* (3,7 log UFC/ml, inóculo inicial en la leche), los recuentos de la cepa patógena cayeron en la primera semana de maduración desde 5,29 log UFC/g (en la cuajada) hasta 4,55 log UFC/g si bien subieron hasta valores de 7,07 log UFC/g en el día 15 de maduración, que se mantuvieron durante las siguientes dos semanas de maduración (Fig. 8A).

En los quesos elaborados con *E. faecalis* A-48-32 como cultivo adjunto a los iniciadores, con una proporción inicial en leche enterococos/listerias de 60:1, los recuentos de *L. monocytogenes* sufrieron una caída continua durante la maduración, desde 4,84 log UFC/g (en la cuajada) a 2,98 log UFC/g en el día 7 de maduración. Estos recuentos permanecieron estables durante la siguiente semana para caer hasta 2,2 log UFC/g al final del proceso de maduración (día 30) (Fig 8B). Se observaron diferencias significativas en los recuentos de *Listeria* ($P < 0,01$) entre los quesos control y aquellos elaborados con las cepas productoras de AS-48 en los días 15 (7 frente 3,18 log UFC/g) y 30 de maduración (6,6 frente 2,2 log UFC/g). AS-48 fue detectado ya en la cuajada en altos niveles (15 mm de halo), que se mantuvieron constantes en la matriz de los quesos durante el período de maduración con un ligero descenso detectable en el día 30.

De un modo similar, en los quesos elaborados con *E. faecium* UJA32-81 como cultivo adjunto, en una proporción inicial en leche de enterococos/listerias de 54:1, se observó un descenso de 1,35 unidades log en los recuentos de *Listeria* durante la primera semana de maduración (Fig. 8C). En este caso, también se observaron diferencias significativas en los recuentos de *Listeria* ($P < 0,01$) entre los quesos control y los fabricados con la cepa productora de AS-48 en los días 15 y 30 de maduración (7,07 frente 3,74 log UFC/g y 6,6 frente 2,98 log UFC/g, respectivamente). La actividad inhibidora fue detectada también desde el principio del proceso de maduración, aunque

el patrón de producción de la enterocina fue ligeramente diferente del observado en los quesos elaborados con la cepa A-48-32, con algunas variaciones en las concentraciones de bacteriocina extraídas a lo largo de los ensayos. De cualquier forma, ambas cepas productoras mostraron una capacidad muy similar para controlar el desarrollo de *Listeria* en las condiciones ensayadas (Fig. 8B y C).

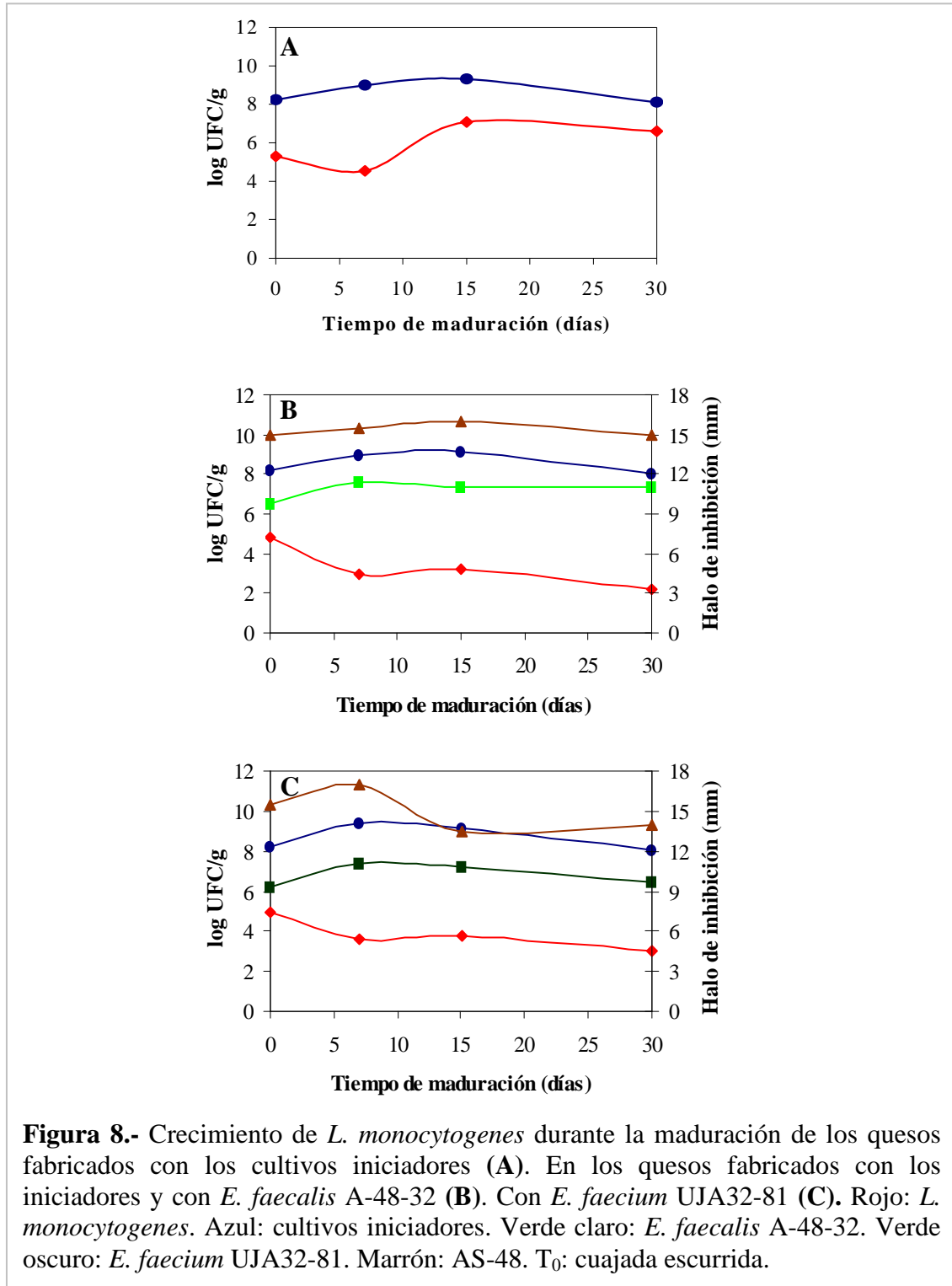
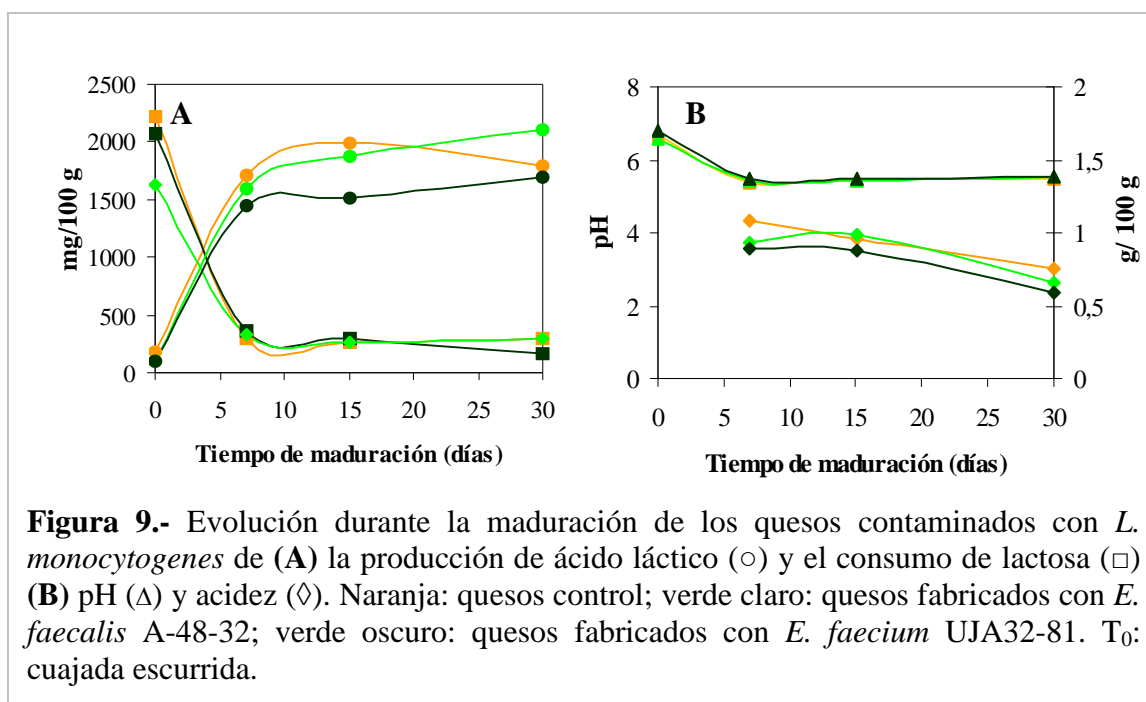
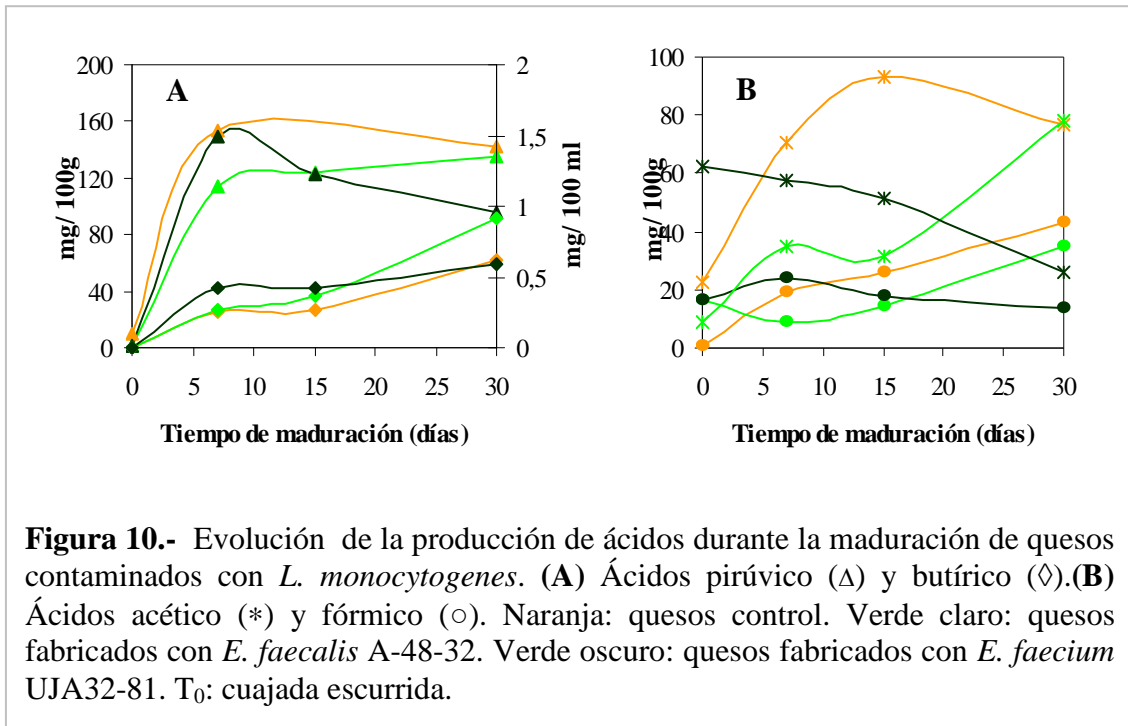


Figura 8.- Crecimiento de *L. monocytogenes* durante la maduración de los quesos fabricados con los cultivos iniciadores (A). En los quesos fabricados con los iniciadores y con *E. faecalis* A-48-32 (B). Con *E. faecium* UJA32-81 (C). Rojo: *L. monocytogenes*. Azul: cultivos iniciadores. Verde claro: *E. faecalis* A-48-32. Verde oscuro: *E. faecium* UJA32-81. Marrón: AS-48. T₀: cuajada escurrida.

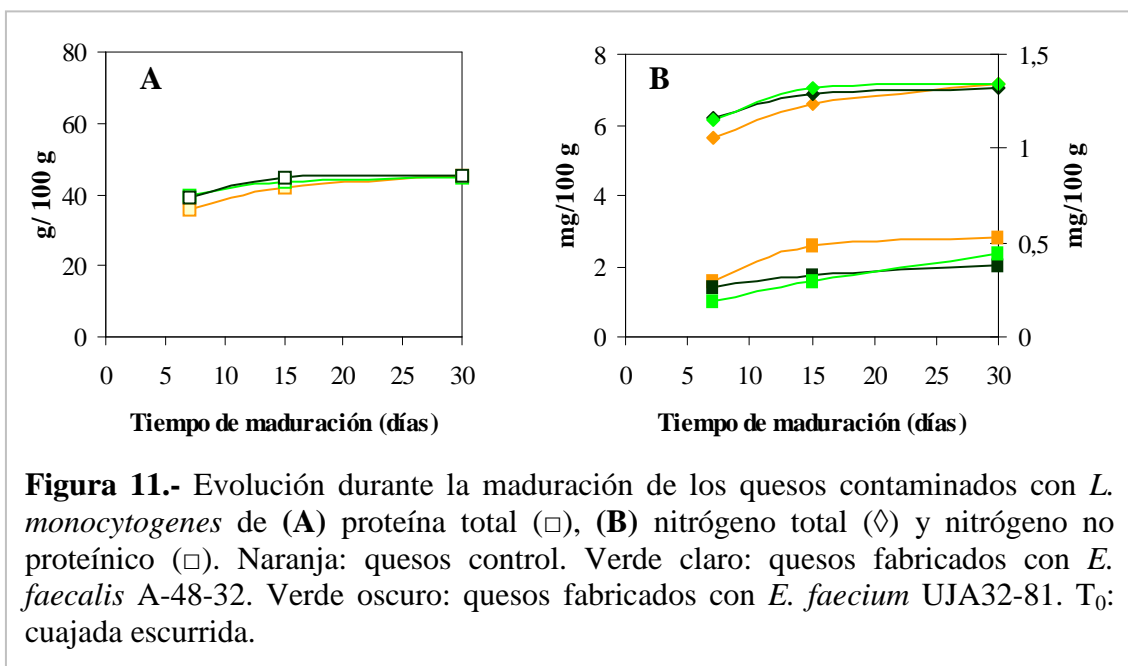
Puesto que el crecimiento de los cultivos iniciadores no se vio afectado por la presencia de las cepas productoras de AS-48, la evolución en la producción de ácido láctico y consumo de lactosa durante la maduración fue similar en todos los tipos de queso (Fig. 9A), si bien las concentraciones de ácido láctico detectadas el día 7 fueron significativamente menores ($P < 0,05$) en los quesos elaborados con *E. faecium* UJA32-81 ($1443,90 \pm 52,68$ mg/100g) comparados con los quesos control o los elaborados con *E. faecalis* A-48-32 ($1706,83 \pm 20,21$ y $1588,41 \pm 70,55$ mg/100g, respectivamente) (Tabla 3). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las siguientes semanas de maduración y los patrones de evolución del pH y acidez titulable (Fig. 9B y Tabla 3) no mostraron diferencias significativas, por lo que las referidas en el día 7 para el ácido láctico se debieron, probablemente, a un error experimental.



Durante la maduración también se determinó la evolución de otros ácidos orgánicos importantes en el proceso. No se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de ácidos pirúvico, butírico (Fig. 10A) o fórmico (Fig. 10B). Sin embargo los niveles de acético durante el proceso de maduración fueron generalmente menores en los quesos elaborados con alguna de las cepas productoras que en los quesos control, observándose diferencias significativas ($P < 0,05$) en los días 7 y 15 (Fig. 10B y Tabla 3).



Los principales valores acerca de la composición química de los quesos se muestran en la Tabla 4. Con respecto al contenido en proteínas (Fig. 11A), se observó un incremento similar en los quesos elaborados con cualquiera de las cepas productoras y en los controles. La evolución de los niveles de las diversas fracciones nitrogenadas (Fig. 11B) fue similar en los tres tipos de quesos.



Maduración (días)	Fuente de variación	Ácidos orgánicos (mg/100 g)				
		Láctico	Pirúvico	Fórmico	Acético	Butírico
0	C	181,63 ± 122,20	9,56 ± 10,73	0,59 ± 0,83	22,50 ± 8,24	0 ± 0
	T ₁	105,19 ± 30,29	1,72 ± 1,02	16,43 ± 23,23	8,88 ± 0,19	0 ± 0
	T ₂	93,94 ± 50,44	1,67 ± 0,71	16,23 ± 22,96	7,96 ± 5,83	0 ± 0
7	C	1706,83 ± 20,21	153,56 ± 2,75	19,23 ± 17,32	70,22 ± 12,69	0,26 ± 0,07
	T ₁	1588,41 ± 70,55	113,91 ± 29,96	8,87 ± 1,43	10,56 ± 7,47*	0,27 ± 0,02
	T ₂	1443,90 ± 52,68*	148,70 ± 17,11	24,09 ± 17,44	57,28 ± 2,85	0,42 ± 0,19
15	C	1993,86 ± 82,97	168,61 ± 11,13	25,89 ± 23,69	92,96 ± 9,65	0,27 ± 0,05
	T ₁	1870,24 ± 266,96	123,37 ± 1,67	14,10 ± 6,19	31,58 ± 6,07*	0,37 ± 0,31
	T ₂	1506,67 ± 69,23	122,17 ± 44,26	17,52 ± 12,75	51,29 ± 20,34*	0,42 ± 0,04
30	C	1794,97 ± 60,18	141,91 ± 33,21	43,20 ± 13,54	76,48 ± 33,75	0,62 ± 0,27
	T ₁	2108,08 ± 437,57	134,81 ± 29,00	34,75 ± 28,37	77,93 ± 50,36	0,92 ± 0,03
	T ₂	1700,70 ± 5,90	96,29 ± 30,67	13,78 ± 4,84	25,76 ± 1,56	0,59 ± 0,06

*** $P < 0,001$ ** $P < 0,01$ * $P < 0,05$

Tabla 3.- Evolución de los ácidos orgánicos durante la maduración de los quesos contaminados con *L. monocytogenes* elaborados con cultivos iniciadores (C) y con los cultivos iniciadores y *Enterococcus faecalis* A-48-32 (T₁) o *Enterococcus faecium* UJA32-81 (T₂). Los datos se expresan como media ± desviación estándar; n=2. Post hoc: Mean Square Difference, ($P < 0.05$): No hay diferencias significativas entre las dos cepas productoras de AS-48.

Maduración (días)	Fuente de variación	Acidez titulable (g/100 g)	NaCl (%)	Proteína total (g/100 g)	Nitrógeno total (g/100 g)
0	C	0,724 ± 0,31	ND	ND	ND
	T ₁	0,574 ± 0,093	ND	ND	ND
	T ₂	0,576 ± 0,034	ND	ND	ND
7	C	1,087 ± 0,051	2,04 ± 0,50	35,78 ± 1,63	5,61 ± 0,26
	T ₁	0,936 ± 0,127	2,20 ± 0,70	39,47 ± 4,80	6,19 ± 0,76
	T ₂	0,887 ± 0,185	2,15 ± 0,74	39,08 ± 8,72	6,16 ± 1,41
15	C	0,954 ^a	2,09 ^a	42,03 ± 0,12	6,59 ± 0,02
	T ₁	0,99 ^a	1,98 ^a	43,77 ± 1,80	6,86 ± 0,28
	T ₂	0,878 ^a	2,14 ^a	44,75 ± 4,90	7,02 ± 0,77
30	C	0,757 ± 0,177	2,18 ± 0,13	45,52 ± 0,04	7,14 ± 0,01
	T ₁	0,692 ± 0,107	2,26 ± 0,56	45,00 ± 1,29	7,06 ± 0,21
	T ₂	0,589 ± 0,173	2,03 ± 0,52	45,59 ± 5,11	7,15 ± 0,80

*** $P < 0,001$ ** $P < 0,01$ * $P < 0,05$

Tabla 4.- Evolución de la composición química durante la maduración de los quesos contaminados con *L. monocytogenes* elaborados con cultivos iniciadores (C) y con los cultivos iniciadores y *Enterococcus faecalis* A-48-32 (T₁) o *Enterococcus faecium* UJA32-81 (T₂). Los datos se expresan como media ± desviación estándar; n=2. Post hoc: Mean Square Difference, ($P < 0.05$): No hay diferencias significativas entre las dos cepas productoras de AS-48. ND: no determinada. (^a) Determinación hecha para un solo experimento.

1.3. Efecto sobre *Staphylococcus aureus*

EN LECHE DESNATADA

En los cultivos control, inoculados con *S. aureus* y los iniciadores, los recuentos de estafilococos incrementaron desde 4,8 log UFC/ml hasta 6,15 log UFC/ml (Fig. 12A) en las primeras 8 h de incubación, experimentando una ligera caída en el recuento de viables a las 24 h, inferior a 1 unidad log, para luego alcanzar valores en torno a 10^8 UFC/ml al final del experimento (72 h). En los cocultivos en este tipo de leche con los iniciadores y la cepa productora *E. faecalis* A-48-32 en una proporción inicial 2,45 enterococos: 1 estafilococo ($1,46 \times 10^5$ UFC/ml de enterococos por $5,96 \times 10^4$ UFC/ml de *S. aureus*) aunque en las primeras 8 h de incubación *S. aureus* experimentó un ligero crecimiento (0,7 unidades logarítmicas/ml), a las 72 h de incubación, los recuentos de viables habían caído hasta $1,23 \times 10^2$ UFC/ml (Fig. 12B). Resultados similares se obtuvieron en los cocultivos de *E. faecium* UJA32-81 y *S. aureus* (proporción inicial enterococos/estafilococos de 1:1) (Fig. 12C). En cuanto a la producción de AS-48, el comportamiento de las dos cepas productoras empleadas fue muy similar, alcanzándose la mayor concentración de enterocina entre las 24 y las 48 h. Las concentraciones de enterocina resultaron ser ligeramente mayores para la cepa UJA32-81, comparada con la cepa A-48-32 (con halos de inhibición de 14,5 y 13,5 mm de diámetro respectivamente). En ambos casos, el efecto inhibitorio de la cepa productora sobre *S. aureus* estuvo directamente relacionado con la presencia de AS-48, y los recuentos tras 48 y 72 h diferían significativamente ($P \leq 0,001$) tanto para los cocultivos con la cepa de *E. faecalis* (2,35 y 2,09 log UFC/ml versus 6,7 y 8,26 log UFC/ml en los cultivos control) como con los realizados con la cepa de *E. faecium* (2,18 y 2,15 log UFC/ml versus 6,7 y 8,26 log UFC/ml).

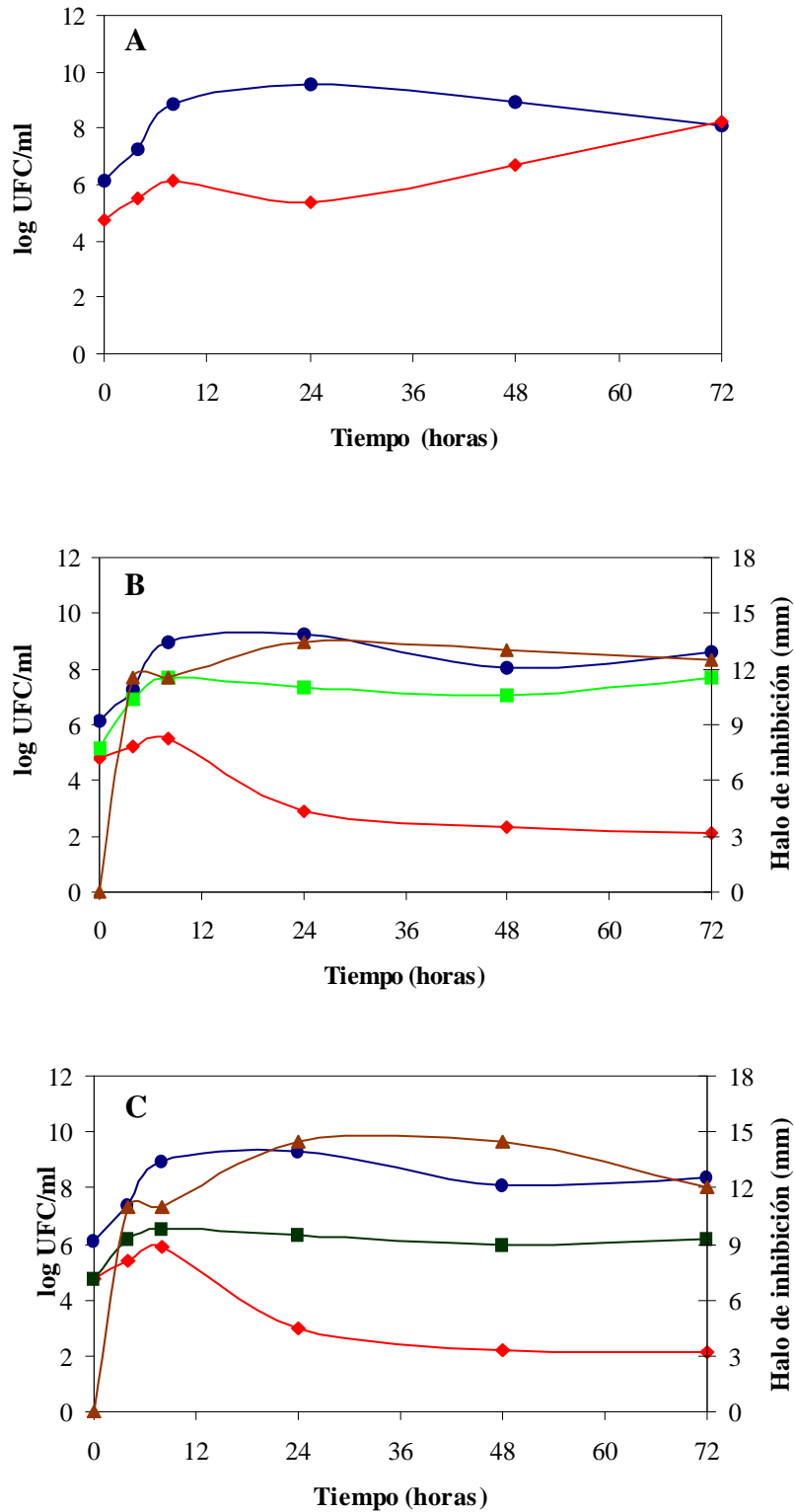


Figura 12.- Crecimiento de *S. aureus* en leche desnatada en cocultivo con los iniciadores (A). Con los iniciadores y las cepas productoras (B) *E. faecalis* A-48-32 o (C) *E. faecium* UJA32-81. Rojo: *S. aureus*. Azul: cultivos iniciadores. Verde claro: *E. faecalis* A-48-32. Verde oscuro: *E. faecium* UJA32-81. Marrón: AS-48.

EN QUESO FRESCO

En este alimento se observó un desarrollo muy similar de los cultivos iniciadores tanto en los quesos control como en los fabricados con cualquiera de las dos cepas productoras de AS-48. En los tres casos durante la fabricación se alcanzaron recuentos de aprox. 10 unidades log en las UFC/g y más tarde, en la primera semana de almacenamiento en frío, se produjo una caída en torno a 2 unidades log UFC/g, con recuentos de 7,5 log UFC/g en el día 30. En consecuencia el pH en los tres tipos de queso en la fase de cuajada fue muy similar (4,35, 4,26, y 4,23 para el control y para los quesos elaborados con las cepas A-48-32 o UJA32-81, respectivamente). En la Tabla 5 se presentan los valores medios de pH y acidez obtenidos para los quesos control y los tratados.

	pH	Acidez (g ac. láctico/ 100 ml o g)
LD	6,75	0,128 ± 0,004
SUERO		
C	4,525	0,465 ± 0,032
T ₁	4,505	0,464 ± 0,059
T ₂	4,555	0,491 ± 0,002
CUAJADA		
C	4,355	0,508 ± 0,082
T ₁	4,26	0,508 ± 0,074
T ₂	4,23	0,552 ± 0,105

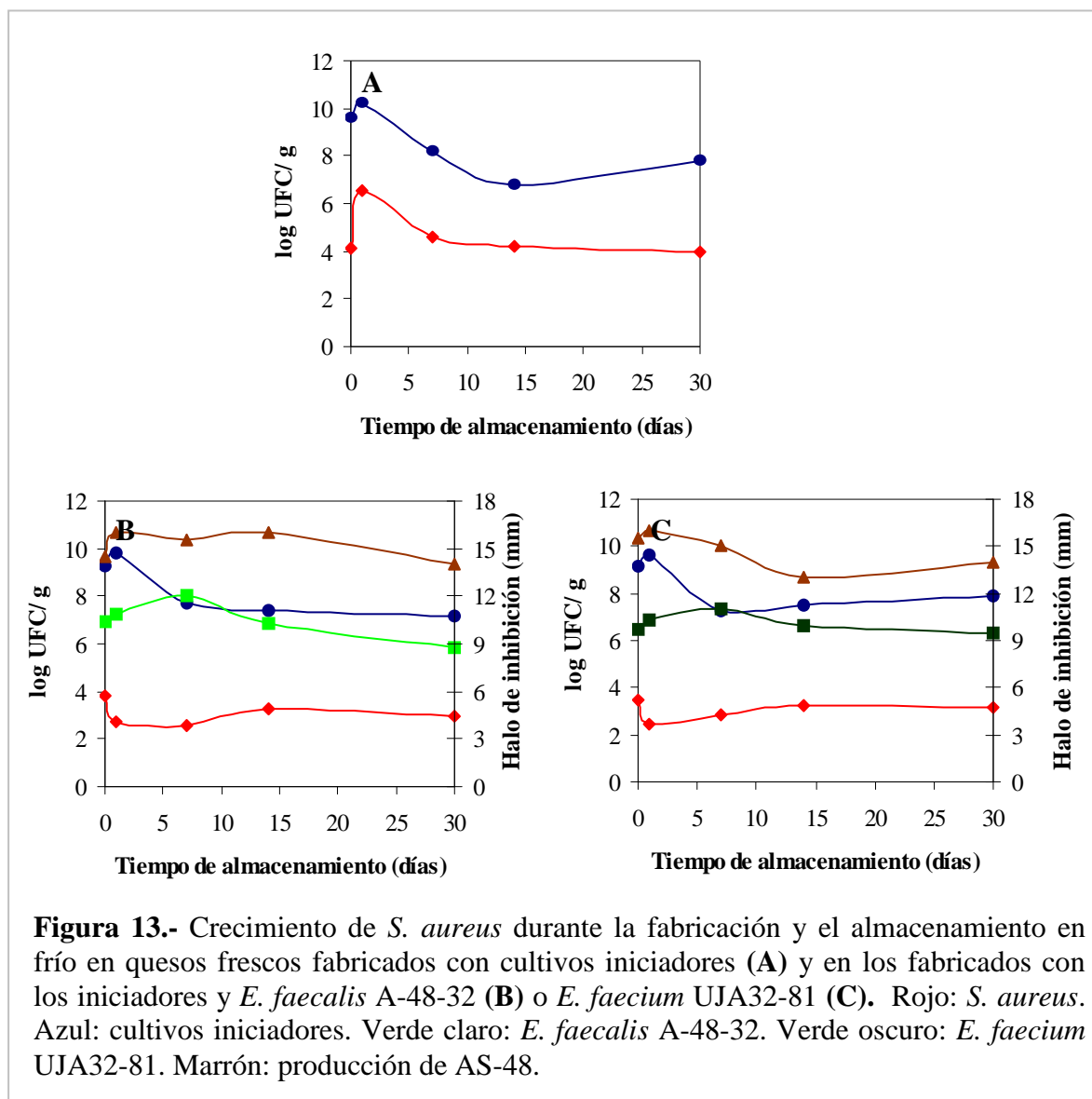
Tabla 5-. Valores del pH y de la acidez titulable de la leche desnatada (LD), del lactosuero y de la cuajada obtenida después de la coagulación ácida en la fabricación de los quesos frescos contaminados con *S. aureus*. (C) Elaborados con cultivos iniciadores; elaborados con las cepas productoras de AS-48 (T₁) *E. faecalis* A-48-32 o (T₂) *E. faecium* UJA32-81. Los datos expresados son la media de dos fabricaciones. Para la acidez se expresa también la desviación estándar.

El comportamiento de *S. aureus* en los quesos control respecto a los inoculados con cualquiera de las cepas productoras como cultivos adjuntos fue, sin embargo, diferente. En los primeros, fabricados con un cultivo iniciador mesofílico comercial y contaminados con *S. aureus* ($5,88 \times 10^3$ UFC/ml, inóculo inicial en la leche), los recuentos de la cepa patógena aumentaron 2,4 unidades log el primer día de almacenamiento (de $1,45 \times 10^4$ UFC/g en el momento de almacenamiento a $3,55 \times 10^6$ UFC/g a las 24 h), probablemente debido a que la temperatura de refrigeración no se alcanzó lo suficientemente rápido como para impedir el desarrollo de los microorganismos. A continuación experimentaron una

caída y se mantuvieron constantes durante todo el periodo de almacenamiento (10^4 UFC/g a los 30 días) (Fig. 13A).

En los quesos elaborados con *E. faecalis* A-48-32 como cultivo adjunto, los recuentos de *S. aureus* sufrieron una caída continuada durante la primera semana de refrigeración, bajando desde 3,47 log UFC/g (en la cuajada) hasta 2,43 log UFC/g en el primer día de refrigeración, lo que supuso una diferencia significativa ($P < 0,01$) con respecto a los quesos control de 4,10 unidades log. Los niveles de contaminación fueron experimentando un ligero aumento durante el almacenamiento hasta situarse en 3,18 log UFC/g en el día 30 (Fig 13B). Esto supuso una continuada, si bien no significativa, diferencia con respecto a los quesos control de aproximadamente una unidad log CFU/g. La actividad inhibidora se observó desde el principio en la cuajada (15,5 mm de halo) y los altos niveles de actividad se mantuvieron en la matriz del queso durante todo el tiempo de almacenamiento en frío, con un ligero descenso al final del experimento.

De un modo similar, en los quesos elaborados con *E. faecium* UJA32-81 como cultivo adjunto, también se observaron diferencias significativas ($P < 0,01$) el primer día de refrigeración con respecto a los controles (2,7 frente a 6,55 log UFC/ml) (Fig. 13C). Este nivel se mantuvo durante la primera semana de refrigeración, lo que supuso una diferencia de 2 unidades log con respecto a los quesos control. En las dos siguientes semanas los recuentos de estafilococos experimentaron un ligero aumento hasta alcanzar 2,98 log UFC/g al final del periodo de refrigeración, manteniéndose, también en este caso, una unidad log/g por debajo de los recuentos alcanzados en los quesos control. La actividad inhibidora fue detectada desde el principio del almacenamiento, con unos niveles ligeramente superiores en las dos últimas semanas a los obtenidos para los quesos elaborados con la cepa A-48-32, si bien, ambas cepas mostraron una capacidad muy similar para controlar a *S. aureus* en queso fresco (Fig. 13B y C).



Dado que tampoco en este caso el crecimiento y supervivencia de los cultivos iniciadores se vio afectado por la presencia de las cepas productoras de AS-48, la producción de ácido láctico fue similar tanto en los quesos control como en los elaborados con alguna de las cepas bacteriocinogénicas (Tabla 6 y Fig. 14A). También se determinaron las concentraciones de otros ácidos orgánicos durante el periodo de almacenamiento en frío, sin que se observasen diferencias significativas para el pirúvico, butírico o acético (Fig. 14B y C). Los niveles de ácido fórmico fueron generalmente inferiores al control en los quesos experimentales (Fig. 14C), con diferencias significativas ($P < 0,05$) en los días 15 y 30 (Tabla 6).

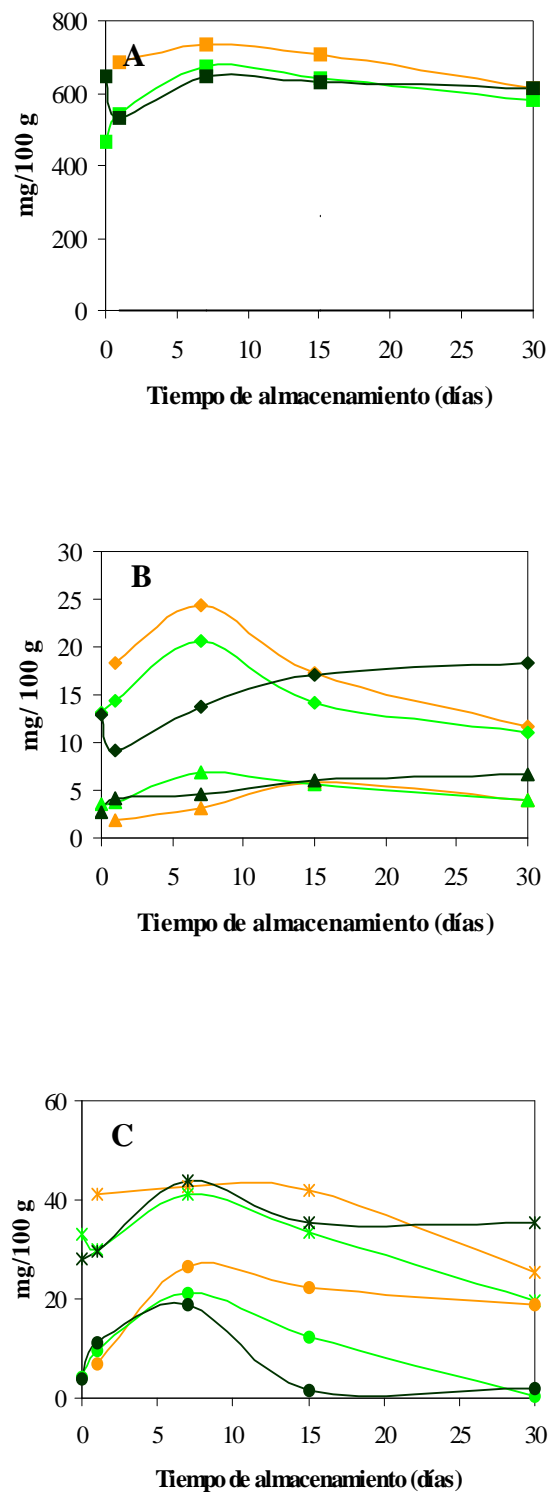


Figura 14.- Evolución durante el almacenamiento en frío de los quesos frescos contaminados con *S. aureus* de la producción de los ácidos (A) láctico (□), (B) pirúvico(Δ) y butírico (◇) (C) acético (*) y fórmico (○). Naranja: quesos control. Verde claro: quesos frescos fabricados con *E. faecalis* A-48-32. Verde oscuro: quesos fabricados con *E. faecium* UJA32-81.

Almacenamiento a 4°C (días)	Fuente de variación	Ácidos orgánicos (mg/100 g)				
		Láctico	Pirúvico	Fórmico	Acético	Butírico
0	C					
	T ₁	464,35± 20,37	3,60± 1,45	4,31± 2,37	33,14± 9,07	13,22± 1,05
	T ₂	648,33± 311,83	2,63± 3,71	3,89± 3,25	28,06± 39,69	12,91± 18,25
1	C	683,41± 269,77	1,90± 2,68	6,86± 1,15	41,17± 22,93	18,39± 9,55
	T ₁	544,73± 51,39	3,72± 0,32	9,67± 9,02	30,14± 2,64	14,39± 1,15
	T ₂	532,46± 208,62	4,10± 1,22	11,02± 13,10	29,50± 12,28	9,06± 12,82
7	C	733,41± 43,18	3,21± 4,53	26,55± 5,31	42,52± 19,83	24,34± 4,76
	T ₁	674,79± 141,50	6,96± 1,32	21,10± 2,05	41,14± 21,64	20,66± 5,67
	T ₂	645,73± 374,91	4,48± 1,49	9,88± 6,99	43,80± 34,37	13,77± 8,75
15	C	704,42± 58,35	5,88± 0,13	22,23± 2,52	41,81± 6,79	17,37± 2,49
	T ₁	643,51± 60,11	5,58± 0,23	12,46± 7,64*	33,61± 9,33	14,11± 3,84
	T ₂	631,64± 286,71	6,02± 2,44	1,71± 0,57*	35,27± 16,97	17,14± 10,02
30	C	628,15± 126,14	4,01± 3,48	18,66± 0,10	25,44± 25,80	11,76± 16,63
	T ₁	582,29± 32,88	3,83± 1,09	0,52± 0,09***	19,67± 6,49	11,01± 7,67
	T ₂	613,59± 150,25	6,62± 1,32	1,89± 0,74***	35,44± 9,05	18,41± 3,62

P < 0,001 ***; P < 0,01 **; P < 0,05 *

Tabla 6.- Evolución de ácidos orgánicos durante el almacenamiento en frío de los quesos contaminados con *S. aureus* y elaborados con cultivos iniciadores (C) y con los cultivos iniciadores y las cepas productoras de AS-48 *E. faecalis* A-48-32 (T₁) o *E. faecium* UJA32-81 (T₂). Datos expresados como media ± desviación estándar; n=2. Post hoc: Mean Square Difference, (P < 0,05): No hay diferencias significativas entre las cepas productoras A-48-32 y UJA32-81.

Con respecto al extracto seco (porcentaje de sólidos), en el primer día de almacenamiento se observó un incremento que fue muy similar en los quesos elaborados con cualquiera de las cepas productoras y en los controles, permaneciendo invariables los porcentajes durante el resto del almacenamiento. El contenido en proteínas resultó también muy similar y estable durante el periodo de refrigeración en los diferentes tipos de queso (Tabla 7).

Almacenamiento a 4 °C (días)	Fuente de variación	Extracto seco (%)	Proteína total (g/100 g)
0	C	15,42 ± 0,13	64,48 ± 4,56
	T ₁	14,14 ± 4,21	58,83 ± 12,36
	T ₂	14,00 ± 3,16	60,99 ± 4,66
1	C	22,83 ± 1,12	62,26 ± 1,28
	T ₁	23,59 ± 0,56	64,00 ± 3,76
	T ₂	23,41 ± 1,51	64,57 ± 0,73
7	C	23,26 ± 0,24	58,30 ± 0,13
	T ₁	23,90 ± 0,60	61,14 ± 6,51
	T ₂	24,09 ± 0,78	64,83 ± 5,87
15	C	22,66 ± 0,38	62,24 ± 2,37
	T ₁	23,21 ± 1,46	62,95 ± 3,97
	T ₂	24,02 ± 0,79	67,61 ± 3,92
30	C	23,43 ± 0,43	62,85 ± 5,50
	T ₁	23,82 ± 0,86	69,06 ± 3,85
	T ₂	23,84 ± 0,54	66,61 ± 4,58

P < 0,001 ***; P < 0,01 **; P < 0,05 *

Tabla 7.- Evolución de la composición durante el almacenamiento de los quesos contaminados con *S. aureus* elaborados con cultivos iniciadores (C) y elaborados con cultivos iniciadores y las cepas productoras de AS-48 *E. faecalis* A-48-32 (T₁) o *E. faecium* UJA32-81 (T₂). Datos expresados como media ± desviación estándar; n = 2. Post hoc: Mean Square Difference, (P < 0,05): No hay diferencias significativas entre las cepas productoras A-48-32 y UJA32-81.

2. Efecto de AS-48 en leche producido *ex situ*

En experimentos previos realizados en nuestro laboratorio pudimos comprobar que la concentración mínima inhibidora (CMI) de AS-48 para bacterias tales como *L. monocytogenes* o *S. aureus* en sistemas alimentarios, derivados lácteos o cárnicos, era muy superior a la establecida en los medios de cultivo de laboratorio. Por ello y con la finalidad de intentar rebajar la concentración efectiva de AS-48 en alimentos, se están llevando a cabo una serie de experimentos para estudiar la posible sinergia de la bacteriocina con otros conservantes de grado alimentario, para integrar así su uso en la tecnología de barreras; en este caso concreto se procedió a estudiar el efecto de concentraciones subletales de AS-48 con distintas concentraciones de ésteres de ácidos grasos (palmitato y estearato de sacarosa) por ser conservantes autorizados en derivados lácteos, siempre dentro de los límites permitidos por la legislación vigente.

Para ello se eligieron 3 cepas patógenas transmitidas por alimentos, representativas de tres sensibilidades diferentes ante AS-48: *L. monocytogenes*, altamente susceptible (CMB en BHI 0,15 µg/ml y en leche 10 µg/ml), *S. aureus*, con sensibilidad intermedia (CMI en BHI 15 µg/ml y en leche superior a 50 µg/ml) y *Salmonella choleraesuis*, que solo es sensible a AS-48 cuando ha sido previamente dañada por tratamientos que alteran la permeabilidad de la membrana externa (Abriouel *et al.*, 1998).

En todos los casos se llevaron a cabo distintos cultivos en paralelo, a 28 °C:

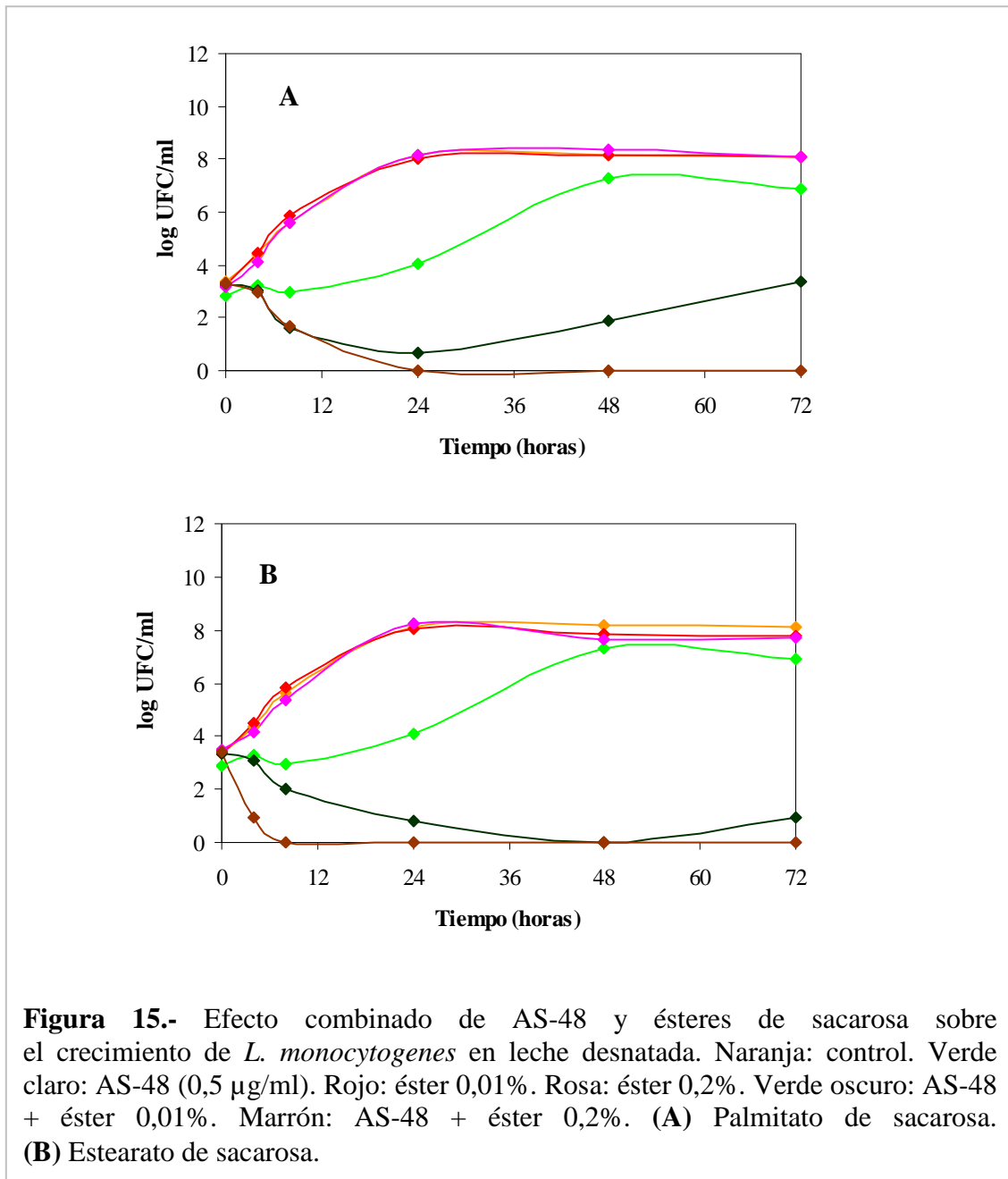
- Un cultivo control sin tratar
- Un cultivo adicionado de una preparación semipurificada de AS-48
- Sendos cultivos adicionados de cada uno de los ésteres al 0,01 % o al 0,2 %
- Cultivos adicionados de las distintas combinaciones de AS-48 y los ésteres.

La población inicial de los diferentes patógenos se fijó en aproximadamente 10³ UFC/ml y todos los ensayos se realizaron por duplicado.

2.1. Efecto sobre *Listeria monocytogenes*

Debido a la alta sensibilidad de esta bacteria a AS-48, se ensayó una concentración muy baja de enterocina (0,5 µg/ml). Como se puede observar en las Fig. 15 A y B ninguno de los dos ésteres, a cualquiera de las concentraciones ensayadas, ejerció efecto inhibitor sobre el crecimiento de *Listeria* en leche desnatada. La adición de la

bacteriocina, sin embargo tuvo un marcado efecto negativo, obteniéndose desde el principio diferencias con el control que fueron significativas a las 4 h ($P < 0,001$ para AS-48 combinado con estearato de sacarosa al 0,2 % y $P < 0,05$ para el resto de combinaciones de ésteres y AS-48), 8 y 24 h ($P < 0,001$). Sin embargo, los cultivos solo adicionados con AS-48 experimentaron una ligera recuperación entre 24 y 72 h.



Respecto a los cultivos tratados con las diferentes combinaciones de AS-48 y los ésteres de sacarosa se observó desde el principio un efecto sinérgico con ambos, a las dos concentraciones ensayadas. Los cultivos adicionados de palmitato de sacarosa (PS) experimentaron a las 4 h de incubación un descenso en el número de células viables de

aproximadamente 1 unidad log respecto de los controles sin tratar, si bien no hubo diferencia con los cultivos tratados sólo con AS-48. El sinergismo entre AS-48 y el PS comenzó a ser evidente a partir de las 8 h detectándose diferencias en los recuentos de viables con respecto a los cultivos no tratados o tratados sólo con los ésteres, de aprox. 4 unidades log y respecto al cultivo tratado con AS-48 de 1,3 unidades log. El mejor resultado se obtuvo con la combinación de AS-48 y 0,2% de PS en cuyos cultivos a las 24 h las listerias estuvieron por debajo del nivel de detección (10 UFC/ml) y así se mantuvieron hasta finalizar el experimento. Hay que destacar que con una concentración de PS tan baja como 0,01%, se obtuvieron muy buenos resultados ya que a las 24 h los recuentos de *L. monocytogenes* habían bajado hasta 0,64 unidades log y que, si bien se produjo una recuperación de los cultivos, esta fue lenta y a las 72 h la diferencia con el control era de 4,7 unidades log.

Estos resultados fueron mejorados por el estearato de sacarosa (ES) ya que para la combinación de AS-48 y ES al 0,2% las listerias fueron indetectables a partir de las 8 h. Las diferencias entre los cultivos tratados con las diferentes combinaciones de AS-48 y los ésteres de sacarosa (ES) respecto de los cultivos control no tratados o tratados sólo con los ésteres fueron significativas ($P < 0,01$) a partir de las 4 h. No hubo diferencias significativas entre los cultivos sometidos a los diferentes tratamientos combinados, a excepción del tratamiento con AS-48 y palmitato (PS) al 0,01 %.

2.2. Efecto sobre *Staphylococcus aureus*

En este caso se ensayaron dos concentraciones de AS-48: 30 y 50 µg/ml que previamente se había conocido que eran subletales para esta bacteria en este medio. En Fig. 16 se muestran los efectos de las diversas combinaciones de AS-48 a 30 µg/ml con ambos ésteres de sacarosa.

Se observa que los cultivos adicionados de los dos tipos de ésteres a las dos concentraciones evolucionaron de un modo similar al control, ya que si bien experimentaron en las primeras horas un ligero descenso, no significativo, en el número de viables mas tarde casi se igualaron con el control alcanzando a las 48 h recuentos en torno a 10^9 UFC/ml.

Para los ensayos adicionados de AS-48 sí se observó un acusado descenso en el número de viables en las primeras 8 horas de incubación, de 3,3 unidades log/ml para la concentración de 30 µg/ml y de 5,5 unidades log/ml para la concentración de 50 µg/ml,

sin embargo, en ambos casos los cultivos se recuperaron, alcanzando a las 48 h recuentos de 10^9 UFC/ml, al igual que el control (Fig. 16)

En los casos en los que se combinó el efecto de AS-48 con los dos ésteres, palmitato y estearato de sacarosa, se observó una caída en el recuento de viables en las primeras 8 h, de 2,6 unidades log en el caso de la combinación de 30 μ g/ml de AS-48 y palmitato de sacarosa, independientemente de la concentración de este último (Fig. 16A), y de 2,35 y 3,1 unidades log para la combinación de 30 μ g/ml de AS-48 y estearato de sacarosa al 0,01 % y 0,2 %, respectivamente (Fig. 16B). No obstante, los cultivos se recuperaron, alcanzando a las 48 h recuentos similares al control, excepto en el caso de la combinación de AS-48 y palmitato de sacarosa al 0,2 %, que se mantuvo en torno a 2,2 unidades log por debajo de los recuentos obtenidos para el cultivo control (6,92 (combinado con 30 μ g/ml de AS-48) y 6,94 log UFC/ml (combinado con 50 μ g/ml de AS-48) frente a 9,1 log UFC/ml) (Fig.16A y C). Para la combinación de AS-48 y estearato de sacarosa, fueron necesarias unas concentraciones de 50 μ g/ml de AS-48 y 0,2 % del éster para lograr mantener la población de estafilococos 4,37 unidades log por debajo del control (4.73 log UFC/ml frente a 9.1 log UFC/ml a las 48 h) (Fig. 16D).

Para el ensayo con una concentración de AS-48 de 30 μ g/ml no pudo realizarse el estudio estadístico al faltar valores en alguno de los casos. En el caso del ensayo con una concentración de 50 μ g/ml si pudieron observarse diferencias significativas entre el control y los ésteres al 0,2 % ($P < 0,05$) a las 8 h, si bien las mayores diferencias se alcanzaron frente a la combinación de ésteres y AS-48 ($P < 0,001$). En este caso además se pudo observar diferencias significativas en el uso del estearato frente al palmitato y de la mayor concentración frente a la menor ($P < 0,001$ para el caso de la combinación AS-48 y estearato 0,2 % frente a todos los demás tratamientos, excepto la combinación AS-48 y palmitato 0,2 % ($P < 0,01$) a las 48 h.).

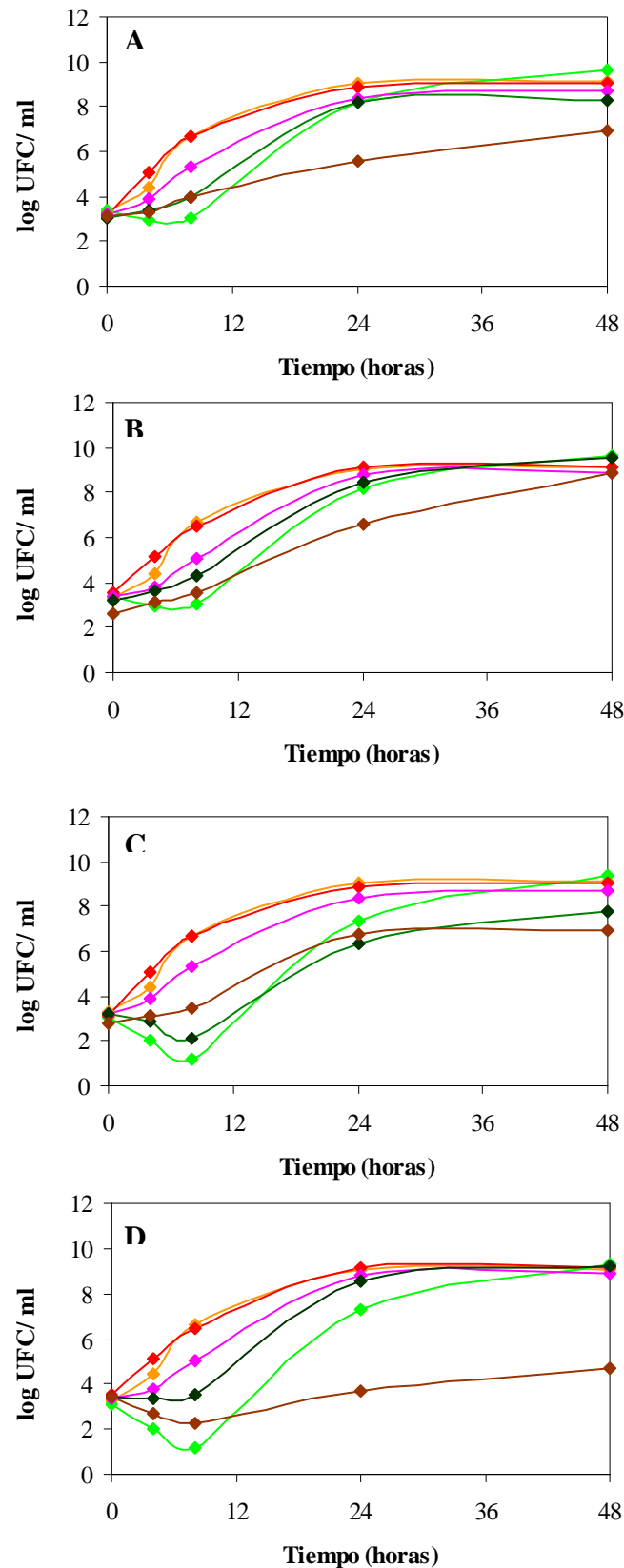


Figura 16.- Efecto combinado de AS-48 y palmitato de sacarosa (PS) o estearato de sacarosa (ES) sobre *S. aureus* en leche desnatada. (A y C) Efecto del PS. (B y D) Efecto del ES. (A y B) 30 µg/ml de AS-48. (C y D) 50 µ/ml de AS-48. Naranja: control. Verde claro: AS-48. Rojo: éster 0,01%. Rosa: éster 0,2%. Verde oscuro: AS-48 + éster 0,01%. Marrón: AS-48 + éster 0,2%.

2.3. Efecto sobre *Salmonella cholaresuis*

Al tratarse de un microorganismo Gram negativo mucho más resistente se emplearon altas concentraciones de AS-48 (50 µg/ml) combinadas con las distintas concentraciones de ambos ésteres. En esta ocasión, ningún tratamiento dio resultado en el control de las salmonellas, evolucionando todos los cultivos de forma similar al control, con ligeras diferencias no reseñables por no ser significativas, entre los distintos tratamientos a las 8 h.

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

A pesar de los recientes progresos en tecnología de alimentos, las infecciones ocasionadas por la contaminación microbiana de los mismos representan un grave problema en Europa, habiéndose registrado un gran número de brotes en los últimos años cuyos costes, directos e indirectos, se estiman en billones de euros/año. En España, se registraron 5517 de estos brotes durante el periodo 1993-1998, 182 de los cuales se debieron a productos lácteos y 355 a cárnicos (Anónimo, 2001b). A pesar de esta situación, como se ha comentado con anterioridad, es creciente la demanda de alimentos que, a la par que seguros estén mínimamente procesados y sin aditivos. Además de esto algunas propiedades organolépticas de los alimentos pueden perderse por los tratamientos conservantes habituales tales como el procesado térmico. Esto es especialmente cierto para el queso, ya que muchas de las variedades más apreciadas son elaboradas con leche cruda para evitar la pérdida de aquellas propiedades deseables peculiares que les confiere la microbiota autóctona de la leche.

AS-48 presenta varias características de interés en vistas a su aplicación en la bioconservación de los alimentos y de ahí el que se esté estudiando su efecto sobre varias bacterias patógenas de transmisión alimentaria, tanto mediante adición de preparaciones de la enterocina (producción *ex situ*) como por la inoculación de cepas productoras de la misma (producción *in situ*). En este apartado de control de patógenos por AS-48 en leche y quesos se ha optado preferentemente por la segunda vía.

Biocontrol de *Bacillus cereus* por AS-48 en productos lácteos

Uno de los microorganismos que contamina frecuentemente la leche y puede representar un problema para la industria láctea es *Bacillus cereus* (Coghill y Juffs, 1979; Ahmed *et al.*, 1983; Becker *et al.*, 1994) debido a su ubicuidad, la alta resistencia de sus esporas (Notermans y Tatini, 1993; Andersson *et al.*, 1995) y a la frecuencia cada vez mayor de razas enterotoxigénicas psicrótrofas (Dufrenne *et al.*, 1994; Dufrenne *et al.*, 1995). Los vegetales, la leche y los productos lácteos, incluyendo los pasteurizados, son las principales fuentes de esta bacteria y diferentes estudios indican que es imposible evitar por completo su presencia en la leche (Andersson *et al.*, 1995; Granum *et al.*, 1993). De hecho el procesado térmico de la leche la selecciona al eliminar la microbiota competitiva no siendo suficiente para matar las esporas de *B. cereus*. En la mayoría de los casos, la única alternativa para controlarla es el empleo de aditivos permitidos o la transformación del alimento mediante microorganismos, de forma que se supriman el

crecimiento de las células vegetativas, la germinación de las esporas y la formación de enterotoxina y, a la vez, se prevenga la recolonización del alimento durante su almacenamiento.

En los estudios previos realizados por nuestro grupo se puso de manifiesto que AS-48 mostraba una alta actividad antimicrobiana frente a todas las cepas de *B. cereus* ensayadas, inhibiendo *in vitro* a las células vegetativas, las esporas germinantes y la producción de enterotoxina en la cepa psicrótrófa LWL1 (Abriouel *et al.*, 2002). En los nuevos resultados que se presentan en esta Memoria se comprueba que la adición de la cepa AS-48⁺ a leche contaminada con *B. cereus* tiene un efecto inhibitor dramático y rápido sobre su crecimiento y la producción de enterotoxina, especialmente a partir del momento en el que la bacteriocina es liberada al medio por la cepa productora (12 h). En anteriores estudios de cocultivo realizados *in vitro* en medio BHI entre la cepa A-48-32 y *L. monocytogenes* la producción de bacteriocina fue detectada cuando los cultivos en crecimiento exponencial alcanzaron al menos 10⁷ UFC/ml (a las 2 h aprox.) y la inhibición de las listerias se correlacionó con la producción de la bacteriocina (Mendoza *et al.*, 1999). Durante el cocultivo en leche con *B. cereus*, el crecimiento de la cepa bacteriocinogénica fue más lento y la producción de AS-48 se detectó bastante más tarde, cuando los cultivos habían entrado en fase estacionaria. Sin embargo los niveles finales de bacteriocina fueron similares a los obtenidos en cultivos puros de esta misma cepa en leche y equiparables a los alcanzados en BHI (Gálvez *et al.*, 1986; Mendoza *et al.*, 1999). La detección tardía de AS-48 en leche puede ser atribuida a la interacción de la enterocina con los componentes de ésta y a la lenta liberación de las moléculas adsorbidas. De hecho, la inhibición de *B. cereus* se puso de manifiesto después de 9 h de cocultivo (6,6 log UFC/ml *versus* 7,1 log UFC/ml en los controles), cuando aún no se detectaba la bacteriocina en el medio. No obstante, el retraso de la liberación de AS-48 permitió a *B. cereus* alcanzar la concentración de 10⁷ UFC/ml referida como crítica para la producción de la enterotoxina (Notermans y Tatini, 1993). A pesar de ello su concentración en los cocultivos fue ocho veces menor que la detectada en los controles. Además, la eficacia de AS-48 fue corroborada por el hecho de que no se detectaron células viables de *B. cereus* después de 72 ni 96 h de cocultivo y que la concentración de bacteriocina en el medio permaneció estable durante el experimento.

Respecto a los quesos hechos con la cepa AS-48⁺, la actividad inhibitora fue detectada en las muestras extraídas a los 5 días de maduración. Las concentraciones de bacteriocina detectadas en queso fueron incluso más altas que las obtenidas en caldo BHI o en leche y

permanecieron prácticamente estables a lo largo de la maduración, determinando una disminución gradual de la población de *B. cereus*, mientras que los recuentos en los controles aumentaron hasta 8,12 log UFC/g a pesar de la caída del pH (5,18). Sin embargo, una pequeña fracción de la población inicial de bacilos (2,5 log UFC/g), posiblemente endosporas, permaneció viable hasta el fin del periodo de maduración (30 d). Se ha referido que los factores relacionados con las características de los alimentos pueden influir mucho en la actividad de las bacteriocinas sobre los patógenos transmitidos por alimentos (Styles *et al.*, 1991; Daeschel, 1993; Garriga *et al.*, 2002). En relación con ello estaría la aparente más baja efectividad de AS-48 en queso si se compara con la encontrada en leche o en BHI, que podría ser atribuida a una mayor retención de las moléculas de bacteriocina a los componentes del queso, a una difusión más baja y también a la distribución irregular de la sustancia en la matriz del queso con mayor porcentaje de materia seca que los medios líquidos. Por todos estos motivos la aplicación de las bacteriocinas y de otros agentes antimicrobianos ha de ser validada en cada sistema alimentario real.

Aunque no hay disponibles datos concluyentes de dosis-respuesta en relación a *B. cereus*, se ha sugerido que esta bacteria no siempre causa enfermedad (Notermans *et al.*, 1997) y se considera que las concentraciones de bacilos toxicogénicos en leche pasteurizada por encima del nivel crítico de 10^5 UFC/ml pueden ser peligrosas para los consumidores (Kramer y Gilbert, 1989; Notermans *et al.*, 1997). Al final del periodo de maduración la concentración de *B. cereus* en los quesos inoculados con la cepa AS-48⁺ estuvo siempre por debajo de esta concentración crítica y también por debajo de los niveles que han sido referidos como necesarios para la producción de la enterotoxina (Notermans y Tatini, 1993). La persistencia de la actividad de la bacteriocina en los quesos estuvo en concordancia con la continuada disminución de las células viables de *B. cereus* proporcionando así una protección prolongada frente a la posible germinación de las endosporas y consiguiente envenenamiento del alimento. Sin embargo, no fue posible determinar los niveles de enterotoxina en queso debido a la interferencia de los componentes de éste con el ensayo, interferencia que según los proveedores del sistema, puede ocurrir en alimentos con alto contenido en proteínas.

Es también interesante resaltar que el crecimiento de la cepa AS-48⁺ en el queso no tuvo ningún efecto inhibitorio sobre los cultivos iniciadores, ya que éstos alcanzaron concentraciones superiores a 8 log UFC/g similares a los de las muestras control a los días 5 y 10, siguiendo una evolución idéntica a lo largo de la maduración. Por tanto la presencia de la cepa bacteriocinogénica no parece afectar la producción de láctico y el consumo de

lactosa fue similar en ambos tipos de quesos. Consecuentemente la evolución del pH fue también similar. La detección de niveles apreciables de ácidos fórmico y acético durante la maduración de ambos tipos de queso podría indicar que una fracción significativa de piruvato se desvía directamente hacia una fermentación ácido mixta. Se ha referido que el metabolismo homofermentativo en lactococos puede desviarse hacia la formación de diversos ácidos (acético, fórmico) cuando crecen bajo condiciones de limitación de carbohidratos (Fordyce *et al.*, 1984). El bajo nivel de lactosa detectado a partir del 5° día de maduración apoya esta hipótesis.

Los niveles de butirato se mantuvieron bajos a lo largo del experimento, siendo la concentración más alta detectada de 16,2 mg/100 g. Este resultado es lógico al tratarse de quesos hechos con leche desnatada, dado que el incremento en ácidos grasos de cadena corta en la maduración se atribuye sobre todo a esterasas y lipasas inespecíficas de los lactococos y de otra microbiota secundaria (Kamaly y Marth, 1989; Stadhouders y Veringa, 1973).

Estos resultados, parecen indicar que la cepa bacteriocinogénica tuvo una influencia muy pequeña en la maduración del queso. Es relevante señalar que, al contrario que en las observaciones realizadas por otros autores (Oumer *et al.*, 2001), la presencia de la cepa AS-48⁺ en los quesos experimentales no dio lugar a un aumento en la proteólisis.

Biocontrol de *Listeria monocytogenes* por AS-48 en productos lácteos

L. monocytogenes es una bacteria patógena ampliamente distribuida en el medioambiente y presente en muchos alimentos, sobre todo leche y queso, carne y productos cárnicos, pescados y moluscos y vegetales (Farber y Peterkin, 1991; Beuchat, 1996; Samelis y Metaxopoulos, 1999). Su ubicuidad y su psicrotrofía hacen que su control sea extremadamente difícil. Así, varias investigaciones realizadas por instituciones europeas responsables de la salud pública han puesto de manifiesto que *Listeria* está presente en el 12-16% de los alimentos industriales fermentados (Anónimo, 1999). Aunque la contaminación con *L. monocytogenes* no es un problema frecuente en la industria láctea, conlleva serias consecuencias para la salud de los consumidores cuando aparece, especialmente para la población de alto riesgo, YOPIS (Young, Older, Pregnant, Immunocompromised People). En 1998 las listeriosis produjeron tasas de hospitalización más altas que las enfermedades causadas por otros

patógenos de transmisión alimentaria y fue responsable de un tercio de las muertes asociadas con este tipo de enfermedades en la población controlada en EEUU por la FoodNet de los Centers for Disease Control and Prevention (CDCP) (Anomymous, 2001a). En 1999, los CDCP informaron que *L. monocytogenes* ocupaba el segundo lugar en tasa de mortalidad debida a patógenos de transmisión alimentaria, siendo el responsable del 20% de las muertes. Se estima que causa aprox. 2500 casos de enfermedad al año con 500 muertes (Anónimo, 2001a). En el queso, *L. monocytogenes* ha sido responsable de varios brotes y de casos esporádicos en Norte América y Europa (Margolles *et al.*, 1997). Se cree que la leche cruda y la contaminación después del procesado es la principal fuente de esta bacteria para el queso. Además, una escasa acidificación y un tiempo de maduración corto son factores de riesgo que pueden favorecer su persistencia y multiplicación en los quesos (Margolles *et al.*, 1997). Por otro lado, al ser una bacteria psicrótrofa, su supervivencia y crecimiento se ven favorecidos durante el almacenamiento de los quesos en frío.

Al objeto de prevenir el desarrollo de las listerias en los alimentos se han empleado varias de las bacteriocinas producidas por las BAL. Tales son la nisina, lacticina 3147, enterocina 4231, enterocinas A y B o pediocina AcH, que han sido ensayadas, solas o en combinación con varios tratamientos físicos y químicos (calor, pH, conservantes químicos, alta presión hidrostática) al objeto de controlar el crecimiento de este patógeno en productos lácteos y otros alimentos (Maisnier-Patin, 1992; Lauková *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2001; Garriga *et al.*, 2002), siendo satisfactorios los resultados en general.

En los estudios preliminares realizados en medio BHI, AS-48 mostró una alta actividad frente a *L. monocytogenes*, tanto cuando la bacteriocina se añadió ya producida como cuando se produjo *in situ* por parte de la cepa *E. faecalis* A-48-32. Como se ha referido anteriormente, AS-48 comenzó a detectarse en los cocultivos cuando los recuentos de la cepa productora alcanzaron aprox. 7 log UFC/ml.

En los cocultivos de este patógeno en leche inoculada con el cultivo iniciador y con cualquiera de las dos cepas de enterococos AS-48⁺, se comenzó a detectar la bacteriocina entre las 8 y las 24 h de incubación, ya entrados los cultivos de ambas en la fase estacionaria (aprox. 8 log UFC/ml). Consecuentemente, el descenso en la población de *Listeria* comenzó en ese mismo periodo (8-24 h) cuando la bacteriocina se estaba acumulando en el medio. No obstante, al igual que en los cocultivos con *B. cereus*, las concentraciones finales de AS-48 fueron muy similares a las obtenidas en los cultivos

puros de la cepa A-48-32 en leche o en BHI y a las de la cepa UJA 32-81 en BHI, manteniéndose estables hasta el final del experimento. Hay que señalar que en experimentos previos hechos con cultivos puros de UJA 32-81 en leche, la producción de bacteriocina fue muy baja, probablemente debido a su carácter no proteolítico. Esta hipótesis se confirmó cuando fue cocultivada con una cepa proteolítica no bacteriocinogénica, ya que la producción de AS-48 se mejoró significativamente (Fernández, 2004).

La eficacia de AS-48 para controlar a las listerias en leche fue confirmada por el hecho de que los recuentos se redujeron hasta niveles indetectables a las 72 h en los cocultivos con cualquiera de las cepas AS-48⁺, aún cuando *E. faecium* UJA32-81 tuvo una peor implantación, alcanzando recuentos 1 log UFC/ml inferiores que los de *E. faecalis* A-48-32, siendo también ligeramente más bajos los niveles de bacteriocina. Esa situación no fue obstáculo para que ejerciera un efecto antilisteria muy semejante al de A-48-32. En este caso la ausencia de actividad proteolítica fue suplida posiblemente por los cultivos iniciadores que alcanzaron títulos superiores a 9 log UFC/ml, en los tres tipos de cocultivos, a pesar de lo cual en los controles las listerias sobrepasaron los 7 log UFC/ml.

En los quesos hechos con cualquiera de las cepas AS-48⁺, la actividad inhibidora fue detectada en las primeras muestras analizadas recogidas inmediatamente después de la coagulación de la leche. Las concentraciones máximas de bacteriocina fueron en ambos casos similares a las obtenidas en BHI o en leche y también a las detectadas en los experimentos con *B. cereus*. La bacteriocina causó una bajada gradual de *L. monocytogenes* en el curso de la maduración de los quesos, mientras que en el control los recuentos subieron hasta 6,6 log UFC/g a pesar de que el pH cayó hasta 5,48. Sin embargo una pequeña fracción de la población inicial de *Listeria* (aprox. 2 log UFC/g) permaneció viable hasta el final de la maduración (30 d). De nuevo nos encontramos con una efectividad más baja de la bacteriocina en el queso que en la leche, cuyas posibles causas se han apuntado más arriba.

No obstante, la persistencia de la bacteriocina en el queso puede proporcionar una protección prolongada frente a la contaminación del queso por este patógeno evitando su proliferación hasta niveles intolerables. A este respecto, la ubicuidad de listeria en los alimentos y en los ambientes donde éstos son procesados, junto con consideraciones acerca de su patogenicidad y dosis infectiva, han llevado a los legisladores europeos a

considerar límites de tolerancia de 2 log UFC/g en los alimentos (M. Hugas, comunicación personal).

Tampoco en este caso el crecimiento de las cepas AS-48⁺ tuvo efecto inhibitorio alguno sobre el cultivo iniciador ya que se detectaron concentraciones similares del mismo en las muestras control y en las tratadas durante 7, 15 y 30 días. Estos resultados, junto con los de los análisis fisicoquímicos, vuelven a indicar que la presencia de cualquiera de las dos cepas bacteriocinogénicas tiene poca influencia sobre la maduración y características finales del queso.

Biocontrol de *Staphylococcus aureus* por AS-48 en productos lácteos

Esta bacteria es un importante patógeno responsable de una amplia gama de infecciones en humanos y en animales, incluidas aquellas transmitidas por alimentos y causadas por toxinas. *S. aureus* es considerado la segunda o tercera causa de brotes de intoxicación alimentaria, después de *Salmonella* y *Clostridium perfringens* (Todd, 1983; Bean y Griffin, 1990; Bean *et al.*, 1996). En España se le atribuyen 228 de los 5517 brotes de intoxicaciones alimentarias ocurridos en el periodo 1993-1998 (Anónimo, 2001b). Los humanos y la mayoría de los animales domésticos son portadores de *S. aureus* y por ello es de esperar que los estafilococos estén presentes en la mayoría, si no todos, los alimentos de origen animal o en aquéllos manipulados directamente por los humanos, a menos que se aplique un tratamiento térmico después del procesado para destruirlos. Además, *S. aureus* es causa común de mastitis en vacas, de forma que si la leche de los animales afectados por la enfermedad producida por cepas toxicogénicas es consumida o empleada para fabricar queso, existe un alto riesgo de intoxicación del alimento, sobre todo si se emplea leche no pasteurizada (García *et al.*, 1988; Simko y Bartko, 1996).

Se han utilizado diversas bacteriocinas para controlar este patógeno en los alimentos, como alternativa a los habituales conservantes químicos y físicos, bien solas o en combinación con otras barreras, obteniendo resultados variables (Liao *et al.*, 1994; Thomas y Wimpenny, 1996; Lauková *et al.*, 1999; Alpas y Bozoglu, 2000; Garriga, *et al.*, 2002).

La susceptibilidad de los estafilococos en general y de la cepa productora de enterotoxina A, *S. aureus* CECT 976 en particular, a la enterocina AS-48 había sido estudiada previamente en medios de cultivo definidos, habiéndose comprobado que

ciertos conservantes químicos (nitrito, lactato y cloruro sódico), así como un choque moderado de calor actúan sinérgicamente con AS-48 (Ananou *et al.*, 2004). También se ha demostrado la eficacia de AS-48, producido *ex situ* e *in situ*, en el control de esta bacteria en un modelo cárnico tipo salchichón (Ananou *et al.*, 2005b).

En los cocultivos de *S. aureus* en leche, con cultivos iniciadores solos o en compañía de las dos cepas AS-48⁺, tuvo lugar un crecimiento en las primeras 8 h en torno a 1-2 log UFC/ml. Sin embargo, en los cocultivos con las cepas bacteriocinogénicas se detectó una brusca disminución del número de estafilococos viables en las siguientes 16 h acompañada con la detección de AS-48, si bien no llegaron a desaparecer por completo de los cocultivos estabilizándose entre las 24-48 h en torno a 2 log UFC/ml. De nuevo la implantación de la cepa AS-48⁺ de *E. faecium* fue más baja, alcanzando máximos niveles poblacionales inferiores en más de una unidad log a los de la cepa productora de *E. faecalis*, aunque el control ejercido sobre *S. aureus* fue muy similar.

En experimentos anteriores de cocultivo entre *S. aureus* y *E. faecalis* A-48-32 en ausencia de cultivos iniciadores (Ananou, 2003) se obtuvo una mejor implantación de la cepa AS-48⁺, que alcanzó niveles poblacionales superiores a los 9 log UFC/ml y, además, consiguió eliminar por completo a los estafilococos tras 6 días de cocultivo. Los títulos de bacteriocina alcanzados fueron sensiblemente superiores (18 mm de diámetro del halo de inhibición en ausencia de iniciadores *versus* 14 mm en su presencia). De ello se deduce que los cultivos iniciadores de BAL compiten con las cepas bacteriocinogénicas y dificultan su implantación, impidiendo que alcancen los niveles poblacionales requeridos para una óptima producción de bacteriocina.

En los quesos frescos hechos con cualquiera de las cepas AS-48⁺ como adjuntos a los iniciadores, la bacteriocina se detectó también por primera vez en la cuajada a niveles ligeramente más bajos que en la leche, pero más altos que los determinados en BHI. La producción de bacteriocina causó una disminución de aprox. 1 log en la población de *S. aureus* durante el primer día de almacenamiento a 4°C, frente a los 3 log UFC/g que incrementó en el control. El efecto de las cepas AS-48⁺ fue menos marcado durante los días siguientes de almacenamiento a 4 °C, probablemente debido a la sensibilidad más baja de la bacteria frente a AS-48 a esta temperatura. Este hecho ya había sido referido previamente para *L. monocytogenes* (Mendoza *et al.*, 1999) y *S. aureus* (Ananou *et al.*, 2004) en medio BHI. De nuevo se puso de manifiesto que la

presencia de las cepas AS-48⁺ no interfería con el desarrollo de los cultivos iniciadores ni con las características fisicoquímicas de los quesos.

Los resultados presentados son muy alentadores en cuanto a la posibilidad de controlar el desarrollo de bacterias patógenas transmitidas por productos lácteos mediante la bacteriocina AS-48. La no interferencia de las cepas productoras de AS-48 con el desarrollo de los cultivos iniciadores y con las características fisicoquímicas de los quesos apuntan la posibilidad de ensayar inóculos más altos de las mismas al objeto de conseguir una producción más temprana de la bacteriocina para alcanzar niveles que permitan la inhibición rápida y completa de estos patógenos, como se ha demostrado en el control de *L. monocytogenes* y *S. aureus* en un modelo cárnico (Ananou *et al.*, 2005a; Ananou *et al.*, 2005b). No obstante se habrá de determinar previamente el posible efecto negativo de las altas concentraciones de enterococos sobre la proliferación y el comportamiento de los cultivos iniciadores.

Otra solución sería incorporar en los cultivos iniciadores una cepa productora de AS-48. Hasta la fecha no ha sido posible expresar el carácter AS-48 completo (producción e inmunidad) en bacterias lácticas distintas de los enterococos. Sin embargo, su expresión en *E. faecium*, especie con menos implicaciones en procesos patológicos, y su buena actuación en leche, queso y derivados cárnicos es de gran interés con vistas al desarrollo de una cepa de grado alimentario. A este respecto, hoy día existe la opinión bastante extendida entre los microbiólogos de que “los enterococos están en la encrucijada de la seguridad alimentaria” (Franz *et al.*, 1999) debido a su doble papel. De un lado ciertas cepas están frecuentemente asociadas con infecciones nosocomiales oportunistas y, de otro, juegan una importante función en la maduración y en la calidad del queso y de otros alimentos fermentados. De hecho, ellos tienen actividades acidificantes, proteolíticas y lipolíticas (Carrasco de Mendoza *et al.*, 1992) y los estudios realizados incluyendo especies de enterococos en los cultivos iniciadores para la fabricación de quesos como el Cebreiro y el Cheddar han puesto de manifiesto que pueden contribuir a que los quesos industriales tengan características similares a las de los artesanales (Centeno *et al.*, 1999; Gardiner *et al.*, 1999). Además, los enterococos están asociados con quesos tradicionales elaborados en países europeos tales como Grecia, Italia, España y Portugal a partir de leche cruda o pasteurizada de cabra, oveja, búfalo de agua o vaca (Ordoñez *et al.*, 1978; Trovatelli y Schiesser, 1987; Coppola *et al.*, 1988; Del Pozo *et al.*, 1988; Litopoulou-Tzanetaki, 1990; Litopoulou-Tzanetaki y Tzanetakis, 1992; Poulet *et al.*, 1993; Kalogridou-Vassiliadou *et al.*, 1994; Torri Tarelli

et al., 1994; Macedo *et al.*, 1995; Centeno *et al.*, 1996; Cuesta *et al.*, 1996; Zárata *et al.*, 1997; Aran, 1998; Bouton *et al.*, 1998; Pérez Elortondo *et al.*, 1999; Xanthopoulos *et al.*, 2000; Sarantinopoulos *et al.*, 2002a; Manolopoulou *et al.*, 2003) siendo mayoritarios entre la microbiota aislada de quesos artesanales españoles hechos con leche cruda, tales como el de Cebreiro (46,82%) (Centeno *et al.*, 1996), el de Tetilla (39,8%) (Menéndez *et al.*, 2001) y el de San Simón (38,89%) (García *et al.*, 2002), donde *E. faecalis* es la especie más frecuentemente aislada. No obstante, dada la falta de discriminación de las técnicas de cultivo en la asignación de especies dentro del género *Enterococcus*, es posible que este dato cambie cuando se apliquen técnicas moleculares más precisas y concluyentes. La frecuente presencia de estos microorganismos en quesos hechos a partir de leche pasteurizada se atribuye a su gran resistencia al calor (Richard, 2000; Giraffa, 2003) y su persistencia a lo largo del proceso de maduración del queso, su amplio intervalo de temperatura de crecimiento y su elevada tolerancia a los ácidos y a la sal.

Puesto que los enterococos en general son más proteolíticos y producen más diacetilo/acetoína que otras bacterias lácticas aisladas de muchos quesos, podría sopesarse la posibilidad que los cultivos iniciadores incorporasen a estos microorganismos para reproducir las características típicas de los quesos tradicionales hechos con leche cruda, como así ha sido demostrado en el caso del queso Feta (Sarantinopoulos *et al.*, 2002a). Además, algunas cepas de *E. faecalis* y de *E. faecium* han sido evaluadas y/o empleadas como probióticos en humanos y también como suplementos de alimentación animal, en razón a los efectos beneficiosos atribuidos a su consumo (prevención de diarrea asociada a antibióticos, aumento de la respuesta inmune, reducción del colesterol en sangre) (Wunderlich *et al.*, 1989; Agerbaek *et al.*, 1995; Buydens y Debuckelaere, 1996; Rossi *et al.*, 1999; Beyacoub *et al.*, 2003; Saavedra *et al.*, 2003; Stropfová *et al.*, 2004). Asimismo es muy frecuente en estas bacterias la producción de bacteriocinas activas frente a *Listeria*, *Clostridium*, *S. aureus*, *B. cereus* y otros patógenos transmitidos por alimentos (Franz *et al.*, 1999; Giraffa, 1995). Hay ya diversos productos en el mercado que contienen cepas de *E. faecium* comercializadas como probióticos: SF 68 comercializada como Cylastin LBC SF68 ME10 (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) o PR88 (*E. faecium* Fargo 688, Quest Internacional, Naarden, The Netherland), entre otras. Además, desde febrero de 2004, 10 preparaciones (de 9 cepas diferentes de *E. faecium* están autorizadas como aditivos de alimentos medicinales en la Unión Europea) (European Comisión, 2004) Por

otro lado, la colonización del intestino con cepas de enterococos probióticos podría interferir con el establecimiento de enterococos potencialmente patógenos. Sin embargo, el uso alimentario de los enterococos aún despierta muchos recelos y en palabras de Giraffa (2003) la comunidad investigadora que estudia las aplicaciones tecnológicas de estas bacterias aún se encuentra “justo en medio de la encrucijada”.

Potenciación de la actividad de AS-48 por tratamientos combinados con ésteres de sacarosa

El empleo de una bacteriocina mediante la adición de preparaciones de la misma al alimento (producción *ex situ*) implica que las concentraciones han de ser rebajadas en lo posible para abaratar sus costes. Ello se puede conseguir mediante el uso racional de la tecnología de las barreras que permite disminuir las concentraciones de los conservantes y ampliar su espectro de actividad. Con este objetivo se han empleado diversas combinaciones de bacteriocinas y tratamientos conservantes físicos (calor, alta presión hidrostática) y químicos (ácidos orgánicos, nitritos, etc.). Uno de estos últimos son los ésteres de ácidos grasos y sacarosa, inicialmente usados por sus propiedades como emulsificantes, lubricantes, modificadores de la viscosidad, aireadores y estabilizantes en una amplia gama de alimentos. Recientemente, se han detectado sus propiedades antimicrobianas frente a una serie de microorganismos que envenenan y alteran los alimentos, como *Bacillus* sp., *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Escherichia coli* O157, *L. monocytogenes*, *S. aureus* (Suwa *et al.*, 1988; Tomida *et al.*, 1991; Kabara, 1993; Monk y Beuchat, 1995; Hathcox y Beuchat, 1996; Monk *et al.*, 1996), siendo más activos frente a organismos Gram positivos. Algunos de estos compuestos muestran sinergismo en su actividad antimicrobiana con conservantes químicos como EDTA, ácido cítrico y ácido fosfórico (Kato y Shibasaki, 1975, 1976, 1977; Monk *et al.*, 1996) y también con bioconservantes como la nisina (Thomas *et al.*, 1998). Además, las propiedades de los ésteres de sacarosa, que carecen de sabor y de olor y que no son tóxicos ni irritantes para ojos ni piel, los hacen adecuados para ser usados en alimentos, en medicamentos y en cosméticos.

La combinación de palmitato o estearato de sacarosa tuvo un significativo efecto potenciador de la actividad antibacteriana de AS-48 frente a *L. monocytogenes* en leche desnatada, ya que la aplicación simultánea de uno u otro sucroéster consiguió rebajar la CMB de la bacteriocina desde 10 hasta 0,5 µg/ml. El mejor resultado lo dio la

combinación de 0,5 µg/ml de AS-48 con un 0,2% de estearato de sacarosa. Puesto que los ésteres de sacarosa y AS-48 parecen actuar sobre la membrana citoplasmática no es sorprendente que el empleo combinado de ambos tipos de antimicrobianos tenga efecto sinérgico, si bien el mecanismo exacto del mismo no está claro. Hay que señalar, que al contrario de los resultados referidos por otros autores (Monk y Beuchat, 1995), ninguno de los dos sucroésteres tuvo efecto inhibitor sobre *Listeria* ni siquiera a la máxima concentración ensayada (0,2%). Esto no es, por otra parte, extraño ya que este tipo de compuesto ejerce su acción antimicrobiana preferentemente a pH ácido (Thomas *et al.*, 1998) y nuestros experimentos se realizaron a pH neutro.

La combinación de AS-48 (30 y 50 µg/ml) y ésteres de sacarosa tuvo también un efecto sinérgico frente a *S. aureus* si bien con ninguna de las 4 combinaciones de las concentraciones de los dos compuestos ensayadas se consiguió la eliminación total de los estafilococos. El mejor resultado lo dio la aplicación conjunta de 50 µg/ml de AS-48 y 0,2% de estearato de sacarosa, lo que confirma el mejor resultado obtenido con este sucroéster en el tratamiento combinado frente a *Listeria*.

Sin embargo no se detectó sinergismo alguno entre AS-48 (50 µg/ml) y las diferentes combinaciones con los sucroésteres en el efecto sobre *Salmonella*. Esto por otra parte no es raro ya que las sinergias detectadas hasta ahora para AS-48 en su acción sobre bacterias Gram negativas han sido con compuestos que desestabilizan la membrana externa: agentes quelantes, calor y pH extremos (Abriouel *et al.*, 1998; Ananou *et al.*, 2005). Por ello, un aspecto interesante a ser investigado sería el de la influencia del pH en la eficacia de estos tratamientos combinados sobre bacterias Gram negativas.

RESULTADOS CAPÍTULO III

III. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE AS-48 PRODUCIDO *ex situ* A MASAS CÁRNICAS

Es ampliamente conocido que la eficacia de las bacteriocinas está muy influenciada por la naturaleza física y química del alimento en el que es aplicada. Por tanto para su empleo en cada tipo de alimento se debe hacer un estudio particularizado acerca de las concentraciones óptimas necesarias para interferir con el crecimiento de la microbiota cuyo desarrollo se quiere interferir.

En esta ocasión, a instancias de la industria DOMCA, comercializadora de conservantes alimentarios, se procedió al estudio del efecto de la adición de la bacteriocina sobre la vida media de dos tipos de masas cárnicas porcinas, no sometidas a fermentación (hamburguesa y salchicha fresca).

1. Efecto de la adición de AS-48 a carnes de porcino tipo hamburguesa y salchicha

Una vez elaboradas y envasadas las hamburguesas y las salchichas según se explica en Métodos, se procedió a almacenarlas a 4 °C. De ambos tipos de alimentos se tomaron muestras tanto del lote control como del tratado con AS-48 a los 0, 2, 4 y 6 días en el caso de las hamburguesas, y a los 0, 1, 5, 8, 10 y 14 días en el de las salchichas, siendo el último tiempo de muestreo el correspondiente a la fecha aproximada de caducidad para ambos tipos de productos.

Siguiendo la normativa vigente, en cada muestra se procedió a determinar el número de microorganismos totales de los siguientes grupos: psicrófilos, mesófilos, mohos y levaduras, *S. aureus*, coliformes totales y fecales y presencia de salmonelas. Además se procedió a la extracción de la bacteriocina a partir de las masas cárnicas.

1.1 En carne tipo hamburguesa

La carne resultó estar libre de estafilococos, si bien a partir del segundo día de almacenamiento en frío, se detectaron salmonelas tras un paso en medio de enriquecimiento, que fueron aisladas y tipificadas según lo dispuesto en la legislación vigente.

Se encontraron variaciones en el recuento de mesófilos totales en las carnes tratadas con respecto a los controles, ya que en el segundo día de almacenamiento, los recuentos

alcanzaban 7 log UFC/g en las hamburguesas no tratadas, frente a 5,82 log UFC/g en las tratadas (Fig. 1). Esta tendencia se mantuvo durante los dos días siguientes (8,91 log UFC/g en los controles frente a 7,23 log UFC/g de las carnes tratadas a los 4 días) si bien al final del experimento los recuentos de mesófilos casi se igualaron en ambos tipos de carne (Fig 1) (9,18 log UFC/g y 8,73 log UFC/g en controles y tratados respectivamente). Así pues, la diferencia en los recuentos entre las carnes control y las tratadas resultó ser superior a 1 unidad logarítmica durante al menos los 4 primeros días de almacenamiento (1,18 y 1,68 unidades log en los días 2 y 4 respectivamente) (porcentaje de disminución del 93,35 % y 97,91 % para los días 2 y 4) lo que puede atribuirse a la presencia de AS-48 en las carnes tratadas si bien ésta no pudo ser detectada mediante la técnica de extracción empleada.

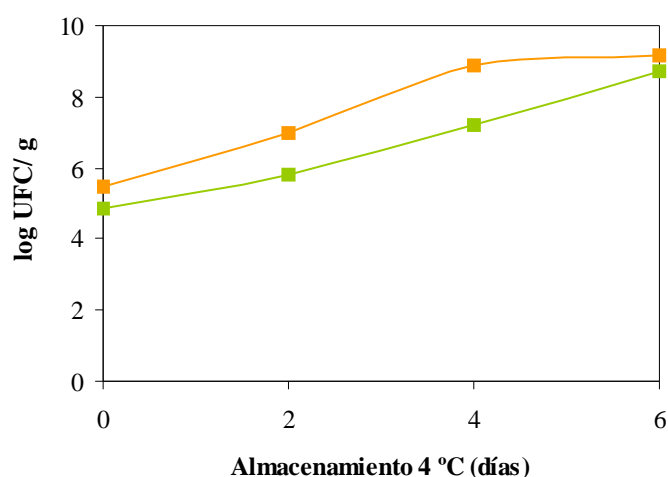


Figura 1.- Efecto de la adición de AS-48 sobre la población de microorganismos mesófilos totales en un modelo cárnico tipo hamburguesa. Naranja: carnes control. Verde: carnes elaboradas con AS-48.

No hubo diferencia alguna en los recuentos de mohos y levaduras y de coliformes en ambos tipos de carnes al ser microorganismos eucariotas y Gram negativos, ya que son resistentes o necesitan concentraciones mucho más altas de las ensayadas para ser inhibidos, respectivamente.

En cuanto a las características organolépticas conferidas por la adición de AS-48, las muestras de carne recién preparadas fueron cocinadas a la plancha, sin sal ni grasas y probadas por un panel de seis catadores. Se apreciaron ligeras diferencias en el sabor,

resultando la hamburguesa tratada con AS-48 ligeramente más sabrosa o salada (según la sensibilidad del catador), y debido sin duda al vehículo de la preparación (solución de NaCl) ya que procede del intercambio catiónico. Además, antes de ser cocinadas, presentaban un color más rojizo y “saludable” (Fig. 2) que la hamburguesa control.

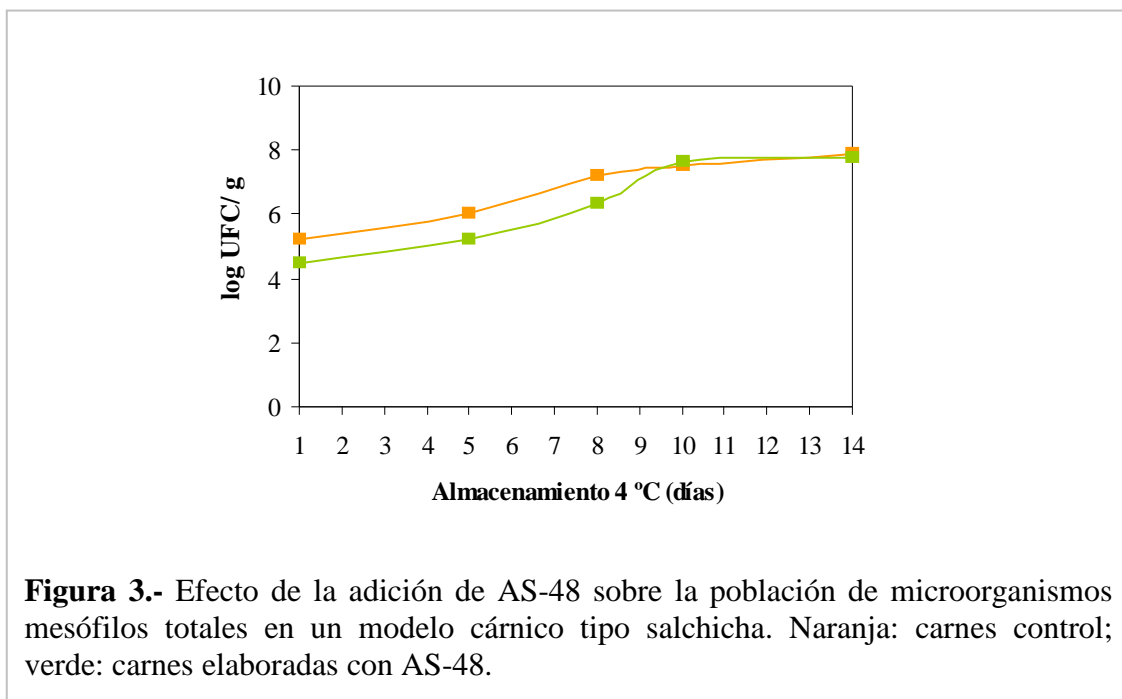


1.2. En carne tipo salchicha

En este caso también la carne empleada estaba libre de estafilococos pero, de forma similar al anterior se detectó la presencia de salmonelas desde el día 1° de almacenamiento, procediendo igualmente a su tipificación.

También en este caso se detectaron variaciones, aunque menores, en el recuento de mesófilos totales en las carnes tratadas respecto de los controles en los días 1, 5 y 8 de almacenamiento en frío, siendo los recuentos de UFC/g en las carnes control de 5,21, 6 y 7,2 unidades log y en las tratadas de 4,49, 5,19, y 6,32 unidades log (Fig. 3), respectivamente. A partir del día 10 los recuentos de mesófilos se igualaron en ambos

tipos de carne (7,9 y 7,76 unidades log UFC/g en el día 14 en controles y tratados respectivamente). Tampoco aquí pudo detectarse la bacteriocina.



Como era de esperar no se detectó diferencia alguna entre ambos tipos de carnes (control y tratada) en lo referente a los recuentos de mohos y levaduras ni en los números estimados de coliformes.

Como en el caso precedente, las muestras de carne recién preparadas fueron cocinadas y catadas del mismo modo que las hamburguesas, no apreciándose apenas diferencias en el sabor entre los controles y los tratados, probablemente debido a la mayor cantidad de aditivos empleados en la fabricación de este alimento. Sin embargo, cuando se les retiró la tripa antes de ser cocinadas, las diferencias en el color fueron más notables ya que las masas tratadas estaban más rojizas y fueron más atractivas para los catadores (Fig. 4).



Figura 4.- Aspecto de las carnes tipo salchicha, fabricadas con y sin AS-48.

2. Efecto de la adición de AS-48 sobre *Brochothrix thermosphacta* en carnes

2.1. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de AS-48 sobre *Br. thermosphacta* en BHI

Br. thermosphacta es una bacteria responsable de la alteración de productos cárnicos y de pescados. Al no haberse ensayado con anterioridad su sensibilidad a la enterocina AS-48 en medios de cultivo de laboratorio, como paso previo a los experimentos en carnes, y con el propósito de aproximar la concentración a emplear en carnes, se procedió a determinar la CMB de AS-48 frente a ella en medio BHI.

El ensayo se realizó a 4, 15 y 26 °C (T^a óptima), dentro del intervalo de temperaturas (0 a 30 °C) que permite el crecimiento de este microorganismo. Una vez obtenidos estos resultados se seleccionó la temperatura de 26 °C para ensayar la influencia del pH (5,5, 7,2 y 8,6) en la actividad de AS-48 frente a *Brochothrix*. Los valores medios de CMB obtenidos de dos experimentos se muestran en la Tabla 1.

Tª \ pH	26 °C	15 °C	4 °C
7,2	0,75 µg/ml	1,5 – 1,75 µg/ml	0,6 µg/ml
5,5	0,2 µg/ml	ND	ND
8,6	0,4 µg/ml	ND	ND

Tabla 1.- Valores de la CMB de AS-48 frente a *Brochothrix thermosphacta* a distintos pHs y temperaturas. ND: No determinado.

La bacteria se mostró muy sensible a la bacteriocina a cualquiera de las temperaturas ensayadas, siendo algo mas resistente a la Tª subóptima de 15 °C pero prácticamente igual de sensible a 26 que a 4 °C.

Los resultados obtenidos a diferentes pH son acordes con los obtenidos con otras bacterias ya que la CMB baja cuando el pH del medio se aparta del óptimo y es ácido o alcalino.

2.2. Efecto de la adición de AS-48 sobre carne de ternera

Dada la alta sensibilidad de *Br. thermosphacta* a la bacteriocina en medio BHI, se empleó en una primera instancia la carne en filetes con una solución de AS-48 de 10 µg/ml.

Desde el primer muestreo (tiempo 0) y durante las 48 horas siguientes, el número de viables de *Br. thermosphacta* en las muestras control se mantuvo en torno a 1,5 unidades logarítmicas por encima de obtenido en las muestras tratadas (5,74, 7,09 y 7,1 log UFC/cm² para los controles frente a 3,98, 5,47 y 5,53 log UFC/cm² para las muestras tratadas, a las 0, 24 y 48 horas, respectivamente) (Fig. 5). A los 7 días, sin embargo, el recuento de viables alcanzó valores similares en los dos lotes (7,72 y 7,07 unidades log UFC/cm² en los controles y tratados, respectivamente). Si bien no se logró extraer la bacteriocina de la carne, la disminución en el número de células viables se puede atribuir a la presencia de AS-48. Debido al alto grado de descomposición de la carne en ambos lotes no se consideró necesario continuar el experimento hasta el tiempo fijado de 14 días.

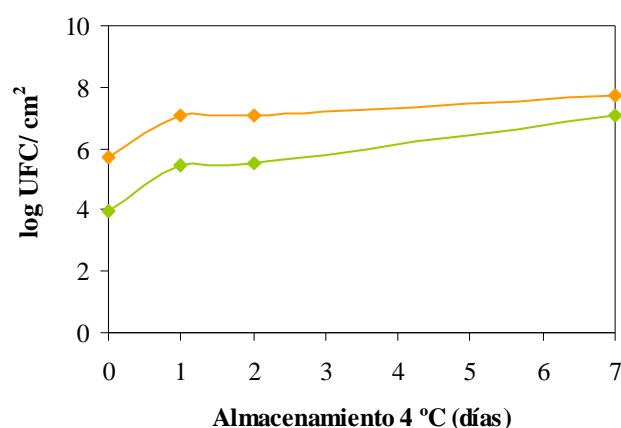


Figura 5.- Efecto de la adición de AS-48 sobre el crecimiento de *B. thermosphacta* en carne de ternera a 4°C. Naranja: muestras control. Verde: muestras tratadas con 10 µg/ml de AS-48.

2.3. Efecto de la adición de AS-48 sobre jamón cocido

2.3.1. Efecto de AS-48 en jamón cocido

Dada la mayor facilidad de manipulación de este sistema cárnico, fue elegido para ensayar diferentes concentraciones de AS-48 (10, 25 y 40 µg/ml). En el caso de las muestras tratadas con 10 µg/ml, los recuentos de *Br. thermosphacta* se mantuvieron durante las primeras 48 h 1,5 unidades log por debajo de los obtenidos en los controles (relación unidades log UFC/cm² controles/tratados de 4,64/3,1, 5,74/4,25 y 6,34/4,94 a las 0, 24 y 48 h, respectivamente). A partir de los 7 días, sin embargo, la población de células en las muestras tratadas aumentó hasta equipararse a la población de los controles a los 14 días (8,91 log UFC/cm² en los controles y 9,03 log UFC/cm² en las tratadas) (Fig. 6A).

En los experimentos en los que se ensayó el efecto de la pulverización de la carne con una concentración mayor, 25 µg/ml, de AS-48, las muestras tratadas con la bacteriocina se repartieron en dos lotes, uno fue incubado a 4 °C y otro a 15 °C. En el lote almacenado a 4 °C, los recuentos de *Br. thermosphacta* en las muestras tratadas se mantuvieron, desde el primer momento y durante todo el experimento (14 días), en torno a 1 unidad log por debajo de los obtenidos en los controles, si bien en el día 7 de

almacenamiento la diferencia aumentó hasta 2 unidades log. (relación de unidades log UFC/cm² controles/tratados: 5,34/4,24, 5,85/4,51, 5,6/4,6, 7,58/5,58 y 8,96/7,91 log UFC/cm² a los 0, 1, 2, 7 y 14 días) (Fig 6B). A 15 °C los resultados mostraron que AS-48 tenía menor eficacia para controlar la proliferación de *Brochothrix* lo que estuvo de acuerdo con los resultados obtenidos en medio BHI. A las 24 horas la relación entre la unidades log UFC/cm² controles/tratados fue de 5,91/5,06 y la diferencia se fue acortando en el curso del experimento, siendo a los 7 días la relación unidades log UFC/cm² controles/tratados de 8,3/8,22. Debido a la gran alteración de la carne, el experimento no pudo prolongarse más allá de los 7 días.

En el caso de las muestras tratadas con 40 µg/ml, los recuentos de *B. thermosphacta* se mantuvieron, desde el primer momento y durante la primera semana, a aproximadamente 1,5 unidades log. por debajo de los recuentos obtenidos en los controles (relaciones unidades log UFC/cm² controles/tratados de 4,79/3,36, 5,43/3,68, 5,71/4,18 y 7,09/5,6 en los días 0, 1, 2 y 7, respectivamente); las diferencias entre los controles y los tratados fueron significativas en el tiempo 0 ($P < 0,05$) y en el día 1 de refrigeración ($P \leq 0,001$). A los 14 días, sin embargo, la población de células aumentó hasta equipararse a la población de los controles (8,52 log UFC/cm² en los controles y 8,39 log UFC/cm² en las muestras tratadas) (Fig. 8D).

No se observaron diferencias significativas en los recuentos de *Br. thermosphacta* entre los lotes pulverizados con 25 µg/ml de AS-48 y los tratados con 40 µg/ml, salvo a las 24 horas ($P < 0,01$), cuando la diferencia de recuento de viables entre ambos tipos de muestras tratadas fue de 0,83 unidades log (4,51 para el tratado con 25 µg/ml y 3,68 para el tratado con 40 µg/ml).

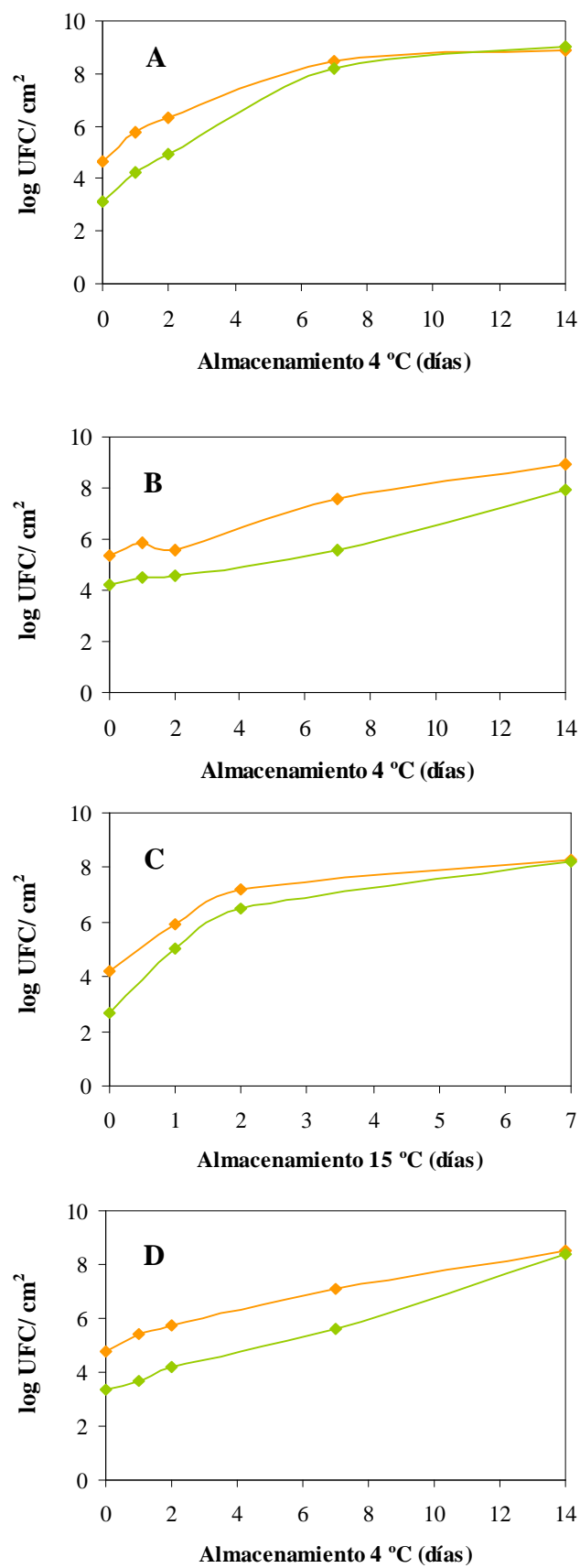


Figura 6.- Efecto de la adición de AS-48 sobre la población de *Br. thermosphacta* en jamón cocido. **A)** 10µg/ml, 4 °C; **B)** 25 µg/ml, 4 °C; **C)** 25 µg/ml, 15 °C y **D)** 40 µg/ml 4 °C. Naranja: muestras control. Verde: muestras tratadas con AS-48.

2.3.2. Efecto combinado de AS-48 y TPF en jamón cocido

De los resultados obtenidos en el experimento anterior se estableció que la concentración mas eficaz para el control de la población de *Br. thermosphacta* en jamón cocido a 4 °C era de 25 µg/ml, y que no se conseguía aumentar de forma significativa la eficacia de AS-48 incrementando la concentración de la bacteriocina aplicada de 25 a 40 µg/ml. Por ello se resolvió aplicar un tratamiento combinado de AS-48 y tripolifosfato sódico (TPPS). Este conservante, empleado en productos cárnicos (E-450), había mostrado sinergia con AS-48 frente a *S. aureus* en medio BHI (Ananou *et al.*, 2004) y frente a *E. coli* O157:H7 en zumo de manzana (Ananou *et al.*, 2005 b).

Se ensayaron dos concentraciones de TPPS (0,3 y 0,5 % p:v) para lo cual se elaboraron tres lotes de jamón cocido loncheado, uno sin tratar, otro tratado con TPPS (0,3 o 0,5 %) y otro tratado con la combinación de TPPS y AS-48. En ningún caso se apreció sinergia al combinar AS-48 y TPPS (datos no mostrados).

DISCUSIÓN CAPÍTULO III

La carne cruda es un alimento muy susceptible de sufrir alteración microbiana debido a sus propiedades ecológicas (alta a_w , pH próximo a la neutralidad y alto contenido en nutrientes). En la actualidad se ha confiado en la refrigeración como forma de alargar la vida media de los productos cárnicos frescos, pero la emergencia de microorganismos alterantes y patógenos tolerantes al frío, junto con el hecho reconocido de la frecuente interrupción de la cadena de frío en el procesado, transporte y almacenamiento de los alimentos, hace necesario establecer barreras adicionales a la baja temperatura.

Hasta la fecha la efectividad de AS-48 en sistemas cárnicos se había ensayado en un modelo de embutido fermentado mediante la adición de una preparación semipurificada de AS-48 o de una cepa productora de la bacteriocina. En ambos casos se comprobó la alta eficacia de AS-48 para controlar a las bacterias patógenas *Listeria monocytogenes* o *S. aureus* (Ananou *et al.*, 2005 a, b) inoculadas expresamente en el sistema.

Efecto de la adición de AS-48 en masas cárnicas tipo salchicha y hamburguesa

En este caso se trató de comprobar si la adición de AS-48 a masas porcinas tipo salchicha y tipo hamburguesa era capaz de prolongar la vida media del producto, ya que esta cuestión era de interés para la empresa DOMCA que colabora con nuestro grupo de investigación en este tema concreto. El resultado fue positivo en el caso de las hamburguesas en lo que respecta a la población de mesófilos, que se redujo en 93,35 % y 97,91 % durante los días 2 y 4 respecto de los controles no tratados, lo que puede implicar un alargamiento de su vida útil. Dado que las concentraciones finales de AS-48 en la carne fueron bajas (100 $\mu\text{g/ml}$), debido a que estaban limitadas por la concentración de la preparación de bacteriocina (500 $\mu\text{g/ml}$) y por la cantidad de agua que admitía la masa cárnica (15-20%), es dado esperar mejores resultados cuando se disponga de preparaciones más concentradas de AS-48. Es posible que otro factor que haya restado eficacia a la enterocina en las condiciones particulares de este ensayo haya sido la baja temperatura de incubación que, se ha referido anteriormente, vuelve menos susceptibles a bacterias como *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Mendoza *et al.*, 1999; Ananou *et al.*, 2004). En las masas cárnicas tipo salchicha, el efecto de AS-48 sobre los mesófilos fue algo menor, siendo las diferencias de recuentos de mesófilos entre controles y tratados siempre inferiores a 1 log, si bien estas diferencias se mantuvieron durante un tiempo más prolongado (8 d). Hay que remarcar el elevado número inicial de

bacterias en las masas cárnicas, superior a 10^5 UFC/g, lo que indudablemente también influyó en los resultados presentados.

Como era de esperar las concentraciones de coliformes totales y fecales y de mohos y levaduras fueron iguales en los lotes controles y en los tratados. Referente a los primeros, aunque AS-48 es activa frente a algunas bacterias Gram negativas, necesita ser aplicada a concentraciones al menos 10 veces superiores que frente a Gram positivas (Gálvez *et al.*, 1986, 1989d; Abriouel *et al.*, 1998). No obstante hay diversos tratamientos (barreras) que aplicados conjuntamente con la enterocina AS-48 aumentan enormemente la susceptibilidad de *E. coli* y *Salmonella* (Abriouel *et al.*, 1998; Ananou *et al.*, 2005c). Por lo que respecta a los mohos y levaduras, AS-48 es inactiva frente a células eucariotas.

Es importante señalar que la adición de la bacteriocina no produjo ninguna alteración de las características organolépticas del producto cárnico y además mejoró el aspecto (color) del mismo.

Efecto de la adición de AS-48 sobre *Brochothrix thermosphacta* en carnes

La actividad de AS-48 ha sido finalmente ensayada frente a una típica bacteria alterante de productos cárnicos y de pescados, *Br. thermosphacta*. Esta bacteria crece sobre pescados y carnes crudos y cocidos, envasados y almacenados en frío. Se ha encontrado como organismo dominante en carne almacenada en atmósfera modificada (80% O₂, 20% CO₂) y constituye, junto con las bacterias del ácido láctico, la microbiota mayoritaria en productos cárnicos envasados a vacío (Borch *et al.*, 1996). En éstos, el crecimiento de *Brochothrix* conduce a su alteración debido a su carácter proteolítico y a la producción de ácido láctico, etanol y ácidos grasos de cadena corta que provocan la aparición de olores desagradables. En medio definido BHI, la bacteria fue muy sensible a la enterocina, variando las CMB entre 0,75, 1,5 – 1,75 y 0,6 µg/ml a los 26, 15 y 4 °C respectivamente. El pH también tuvo alguna influencia en la actividad de AS-48 frente a *Br. thermosphacta* ya que a pH subóptimo (5,5 y 8,6) fue menor la CMB. En cualquier caso las CMBs determinadas eran de las más bajas encontradas para bacterias Gram positivas (Gálvez *et al.*, 1989; Mendoza *et al.*, 1999; Ananou *et al.*, 2004). Los datos referidos de sensibilidad de *Brochothrix* a la nisina en medios de cultivo definidos son muy similares, 0,625-2,5 µg/ml a 25°C para 10^3 células/ml (Thomas y Delves-Broughton, 2001).

La mayoría de los experimentos realizados con esta bacteria se han centrado sobre todo en jamón cocido loncheado. Este alimento está entre los productos cárnicos más perecederos y en los que con mayor frecuencia se ha referido la alteración debida a *Brochothrix*. Además, se trata de un alimento susceptible de ser protegido con barreras múltiples, adicionales a las escasas que el producto en sí mismo presenta frente al crecimiento microbiano: bajo contenido en sal (aprox. 2%), pH en torno a 6 y actividad de agua superior a 0,945, incapaces de inhibir los tipos más habituales de microorganismos asociados a la contaminación postprocesado. Hasta ahora se ha ensayado el envasado a vacío como forma de controlar a *Brochothrix*, pues se había referido que la ausencia de oxígeno impedía el crecimiento de esta bacteria. Sin embargo los datos al respecto son bastante contradictorios (Roth *et al.*, 1975; Sutherland *et al.*, 1975; Seideman *et al.*, 1976) y su inhibición por vacío parece ser pH-dependiente, siendo más efectiva cuando el pH está por debajo de 5,8 (Campbell *et al.*, 1979). De cualquier forma el vacío no es suficiente para proteger de la alteración por *Brochothrix* y, además, puede ser interesante encontrar métodos que puedan aplicarse en el control de esta bacteria, como alternativa al vacío o también como barrera complementaria al mismo. Con este objeto se han combinado con el vacío, distintos conservantes químicos (lisozima, láctico, EDTA) y biológicos (nisina) para aumentar su eficacia. En general los resultados de combinar la nisina con el vacío y con otros conservantes han dado resultados satisfactorios (Cutter y Siracusa, 1996; Gill y Holley, 2000). En nuestro caso el estudio se ha iniciado con productos cárnicos, carne cruda y jamón loncheado, no implementados con ninguna otra barrera. En ambos casos, la aplicación de AS-48 resultó mucho menos efectiva, ya que no consiguió eliminar a *Brochothrix*, aunque si mantenerlo por debajo del control no tratado en 1 log. El aumento de la concentración en las preparaciones pulverizadas de AS-48 desde 10 hasta 25 y 40 μ /ml no aumentó su eficacia frente a este alterante, así como tampoco el aumento de la temperatura de incubación (de 4 a 15 °C), como cabía esperar dado que la caída en los recuentos (1 log) de las muestras tratadas se produjo en el tiempo cero, cuando aún la carne no se había enfriado.

La aplicación combinada de AS-48 y tripolifosfato sódico, aditivo empleado en el jamón cocido, no incrementó la actividad de AS-48 en este caso, como había ocurrido en los casos de *S. aureus* en medio BHI (Ananou, 2003) y en el *E. coli* O157:H7 en zumo de manzana (Ananou *et al.*, 2005c). Dada la mayor sensibilidad de *Brochothrix* en relación con *S. aureus* a la enterocina AS-48 es probable que la falta de sinergia se

deba al modelo alimentario en donde se ha ensayado y a la falta de un sistema de aplicación eficaz estandarizado.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

1. Se han ensayado distintos subproductos lácteos para la producción de AS-48, obteniéndose un rendimiento óptimo de 160-320 UA/ml en las siguientes condiciones: cultivo establecido con 8% de inóculo de la cepa *Enterococcus faecalis* A-48-32 en lactoalbúmina al 5% suplementada con glucosa (1%) a pH estabilizado en 6,55-6,65 e incubado a 28°C durante 18-24h.
2. A partir de los cultivos en lactoalbúmina se pueden obtener preparaciones concentradas de AS-48 libres de células mediante adsorción directa sobre carboximetil sephadex CM25 y tratamiento térmico a 90 °C durante 5 min del eluido.
3. La cepa *E. faecalis* A-48-32 inoculada en alimentos lácteos produce AS-48 y ejerce un control eficaz sobre *Bacillus cereus*. Inoculada en leche determina la eliminación del patógeno y reduce de forma significativa la producción de enterotoxina. Su presencia en queso disminuye la población de bacilos por debajo del nivel considerado crítico para producir la enfermedad.
4. La cepa *E. faecium* UJA 32-81 produce AS-48 en leche aunque su implantación es más baja que la de *E. faecalis* A-48-32. En los cocultivos realizados, ambas fueron capaces de controlar a *Listeria monocytogenes*, eliminándola tras 72 h. de incubación. En los quesos fabricados con cualquiera de estas cepas también se detectó una reducción significativa de la población de listerias a partir del día 15 de maduración.
5. Ambas cepas productoras de AS-48 son capaces de controlar el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en leche y en queso, si bien en este caso con menor eficacia dada la mayor resistencia que presenta este patógeno a la bacteriocina.
6. La presencia de cualquiera de las cepas productoras de AS-48 no afecta el desarrollo de los cultivos empleados como iniciadores en la fabricación del queso, como se deduce de los niveles poblacionales de éstos y de las características físico-químicas determinadas en quesos controles y tratados.

7. Los ésteres de sacarosa, palmitato y estearato, ejercen un marcado efecto sinérgico en la acción de AS-48 frente a *L. monocytogenes* y en menor medida frente a *S. aureus*. En cambio la combinación de ambos ésteres con AS-48 no reforzó la actividad de la bacteriocina frente a *Salmonella choleraesuis* al menos en las condiciones ensayadas.

8. *Brochothrix thermosphacta* ha resultado muy sensible a la bacteriocina en medio BHI, estando la concentración mínima bactericida comprendida entre 1,75 y 0,2 µg/ml, dependiendo de la temperatura de incubación y el pH del medio empleado.

1. After testing different by-products of the dairy industry for bacteriocin AS-48 production, best results (160-320 AU/ml) are obtained when culture media composed of 5% lactalbumin and 1% glucose are inoculated (8%) with the producer strain *Enterococcus faecalis* A-48-32 and incubated for 18-24 h with pH controlled to 6.55-6.65.
2. Cell-free bacteriocin concentrates can be obtained from lactalbumin cultures by cation exchange on carboxymethyl sephadex CM25 followed by thermal treatment (90 °C, 5 min) of the effluent.
3. When strain *E. faecalis* A-48-32 is inoculated in dairy foods, it produces AS-48 and controls growth of *Bacillus cereus* efficiently. After being inoculated in milk, this strain eliminates the pathogenic bacilli, and reduces enterotoxin production significantly. In cheese inoculated with strain A-48-32, the population of bacilli decreases below the concentrations considered to be critical to cause illness.
4. Strain *E. faecium* UJA 32-81 also produces AS-48 in milk, although it has a lower proliferation capacity than *E. faecalis* A-48-32. Both strains are able to control *Listeria monocytogenes* in cocultures, causing its complete elimination after 72 h. In cheeses inoculated with either of the producer strains, the population of listeria is reduced significantly after day 15 of maturation.
5. Both AS-48 producer strains tested can also control proliferation of *Staphylococcus aureus* in milk and in cheese. The higher resistance of this bacterium to AS-48 imposes a more limited efficacy of the produced bacteriocin.
6. Neither of the AS-48 producer strains tested has any undesirable effect on development of the starter cultures used for cheese manufacture, as shown by the cell densities reached during maturation and the physico-chemical properties of control and test cheeses.
7. Fatty esters of sucrose and palmitate as well as stearate show a marked synergistic effect on the activity of AS-48 against *L. monocytogenes* and also, to a lower extent,

against *S. aureus*. Nevertheless, neither of them was able to potentiate bacteriocin activity against *Salmonella choleraesuis*, at least under the experimental conditions tested.

8. *Brochothrix thermosphacta* is highly sensitive to this bacteriocin in BHI broth, with a minimal bactericidal concentration ranging from 1.75 to 0.2 µg/ml, depending on the incubation temperature and pH of the medium.

BIBLIOGRAFÍA

Aasen, I.M., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., and Storro, I. 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**:159-166.

Abee, T., and Wouters, J.A. 1999. Microbial stress response in minimal processing. *Int. J. Food Microbiol.* **50**: 65-91.

Abriouel, H. 2000. Estudios físico-químicos y biológicos de la bacteriocina AS-48. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Abriouel, H., Lucas, R., Ben Omar, N., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez-Cañamero M., and Gálvez, A. 2005. Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by the food isolate *Enterococcus faecium* RJ16. *Sys. Appl. Microbiol.* **28**: 383-397.

Abriouel, H., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. 2002. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by bacteriocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1473-1477.

Abriouel, H., Sánchez-González, J., Maqueda, M., Gálvez, A., Valdivia, E., and Gálvez-Ruiz, M. 2001. Monolayer characteristics of bacteriocin AS-48, pH effect and interactions with dipalmitoyl phosphatidic acid at the air-water interface. *J. Colloid. Interface Sci.* **233**: 306-312.

Abriouel, H., Valdivia, E., Gálvez, A., and Maqueda, M. 1998. Response of *Salmonella choleraesuis* LT2 spheroplasts and permeabilized cells to the bacteriocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4623-4626.

Abriouel, H., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., and Gálvez, A. 2003. A simple method for semi-preparative-scale production and recovery of enterocin AS-48 derived from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* A-48-32. *J. Microbiol. Methods.* **55 (3)**: 599-605.

Achemchem, F., Martínez-Bueno, M., Abrini, J., Valdivia, E., and Maqueda, M. 2005. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *J. Appl. Microbiol.* **99**:141-150.

Adams, M.R. 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* **68**: 171-178.

Agerbaek, M., Gerdes, L.U., and Richelsen, B. 1995. Hypocholesteroleamic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. *Eur. J. Clin. Nutr.* **49**: 346-352.

Aguirre, M. and Collins, M.D. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 95-107.

Ahmed, A.A.H., Moustafa, M.K. and Marth, E.H. 1983. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and milk products. *J. Food Prot.* **46**: 126-128.

Allison, G.E., Fremaux, C. and Klaenhammer, T.R. 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* **176**: 2235-2241.

Alpas, H., and Bozoglu, F. 2000. The combined effect of high hydrostatic pressure, heat and bacteriocins on inactivation of foodborne pathogens in milk and orange juice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 387-392.

Alves, V.F., De Martinis, E.C., Destro, M.T., Vogel, B.F., and Gram, L. 2005. Antilisterial activity of a *Carnobacterium piscicola* isolated from Brazilian smoked fish (surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]) and its activity against a persistent strain of *Listeria monocytogenes* isolated from surubim. *J. Food Prot.* **68**: 2068-2077.

Amiali, M.N., Lacroix, C., and Simard, R.E. 1998. High nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 in whey permeate with aeration. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 887-889.

Ananou, S. 2003. Estudio de la eficacia de la enterocina AS-48 en el control de bacterias patógenas transmitidas por alimentos. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Ananou, S., Garriga, M., Hugas, M., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., and Valdivia, E. 2005a. Control of *Listeria monocytogenes* in sausages by enterocin AS-48. *Int. J. Food. Microbiol.* **103**: 179-190.

Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., and Valdivia, E. 2005b. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Sci.* **71**: 549-556.

Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., and Valdivia, E. 2005c. Synergistic effect of enterocin AS-48 in combination with outer membrane permeabilizing treatments against *Escherichia coli* O157:H7. *J. Appl. Microbiol.* **99**: 1364-1372.

Ananou, S., Valdivia, E., Martínez Bueno, M., Gálvez, A., and Maqueda, M. 2004. Effect of combined physico-chemical preservatives on enterocin AS-48 activity against the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 strain. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 48-56.

Anderssen, E.L., Diep, D.B., Nes, I.F., Eijsink, V.G.H. and Nissen-Mayer, J. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: Two new two-peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK, and the induction factor plantaricin A. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 2269-2272.

Andersson, A., Rönner, U., and Granum, P.E. 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? Int. J. Food Microbiol. **28**: 145-155.

Angelidis, A.S., Chronis, E.N., Papageorgiou, D.K., Kazakis, I.I., Arsenoglou, K.C., and Stathopoulos, G.A. 2006. Non-lactic acid, contaminating microbial flora in ready-to-eat foods: A potential food-quality index. Food Microbiol. **23**: 95–100.

Anonymous. 1969. Specification for the identity and purity of food additives and their toxicological evolution: Some antibiotics. 12th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Tech. Rept. Series No. 430. World Health Org., Geneva, Switzerland.

Anonymous. 1988. Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. Food and Drug Admin. Fed. Reg. **53**: 11247.

Anonymous. 1999. Opinion of the scientific committee on the veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*. European Commission. Health & Consumer Protection Directorate. General Directorate B-Scientific Health Opinions Units B3- Management of Scientific Committees. II Summary Report of the Meeting of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health. Brussels, 23-24 September, 1999.

Anonymous. 2001a. Draft Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition. USDA/Food Safety and Inspection Service. Centers for Disease Control and Prevention. January 2001. <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmriskex.html>.

Anonymous. 2001b. WHO Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe. Seventh report 1993-1998. 2001. En: K. Schmidt, & C. Tirado (Eds). Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine (BgVV) (FAO/WHO Collaboration Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses). Berlin.

Anonymous. 2003. WHO surveillance programme for control of food-borne infections and intoxications in Europe. 8th report: 1999-2000, Berlin.

- Aran, N.** 1998. A microbiological study of Kashar cheese. *Milchwiss.* **53**: 565-568.
- Archer, D.L.** 2004. Freezing: an underutilized food safety technology? *Int. J. Food Microbiol.* **90**: 127-138.
- Aymerich, T., Artigas, M.G., Garriga, M., Monfort, J.M., and Hugas, M.** 2000a. Effect of sausage ingredients and additives on production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of *En vitro* production and anti-listerial effect in fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 686-694.
- Aymerich, T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M. and Hugas, M.** 2000b. Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria Ennocua* in meat products. *J. Food Prot.* **63**: 721-726.
- Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M., and Nes, I.F.** 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1676-1682.
- Azizi, A.** 1999. Heat treatment of foods. Thermal processing required for canning. pp 1008-1016. En: Robinson, R.K, Batt, C.A., Patel, P.D (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford, U.K. 2000.
- Baccus-Taylor, G., Arihara, K., Bater, B., Maurer, A.J., and Cassens, R.G.** 1992. Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in turkey summer sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3053-3059.
- Balla, E., Dicks, L.M., Du Toit, M., Van Der Merwe, M.J., and Holzapfel, W.H.** 2000. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1298-1304.
- Banwart, G.J.** 1979. *Basic food microbiology*. AVI Publishers, Westport, Conn.
- Barbaros, H.O.** 1999. Microbiology of liquid milk. pp. 1436-1441. En: Robinson, R.K, Batt, C.A., Patel, P.D (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford, U.K. 2000.
- Bárcena, J.M., Siñeriz, F., González de Llano, D., Rodríguez, A., Suárez, J.E.** 1998. Chemostat production of plantaricin C by *Lactobacillus plantarum* LL441. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3512-3514.
- Batt, C.A.** 1999. *Lactobacillus*. Introduction. pp. 1134-1136. En: Robinson, R.K, Batt, C.A., Patel, P.D (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford, U.K. 2000.

Bean, N. H., and Griffin, P. M. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles and trends. *J. Food Prot.* **53**: 804-817.

Bean, N. H., Goulding, J. S., Lao, C., and Angulo, F. J. 1996. Surveillance for foodborne-disease outbreaks-United States, 1988-1992. Morbidity and Mortality Weekly Report, (SS-5). **45**: 1-66.

Becker, H., Schaller, G., Von Wiese, W., and Terpian, G. 1994. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.* **23**: 1-15.

Ben Embarerek, P.K. 1994. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **23**: 17-34.

Ben Omar, N., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N. M. K., Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H., Pérez-Pulido R., Martínez-Canámero, M., and Gálvez, A. 2004. Functional and Safety Aspects of Enterococci Isolated from Different Spanish Foods. *Sys. Appl. Microbiol.* **27**: 118-130.

Benkerroum, N. and Sandine, W.E. 1988. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Science* **71**: 3237-3245.

Bennik, M.H., Vanloo, B., Basseur, R., Gorris, L.G., and Smid, E.J. 1998. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1373**: 47-58.

Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G.L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R.E., Schiffrin, E.J., von der Weid, T. 2003. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *J. Nutr.* **133**: 1158-1162.

Bernard, D.T. 1997. Hazard Analysis and Critical Control Point System. Use in Controlling Microbiological Hazard. En: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (Eds). *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington DC., 1997.

Berry, E.D., Hutkins, R.W. and Mandigo, R.W. 1991. The use of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* to control post-processing *Listeria monocytogenes* contamination of frankfurters. *J. Food Prot.* **54**: 681-686.

Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh products. *J. Food Prot.* **59**: 204-216.

Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C., and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. Appl. Environ. Microbiol. **57**:1265-1267.

Blaser, M.J., Perez, G.P., Smith, P.F., Patton, C.M., Tenover, F.C., Lastovica, A.J., and Wang, W.L. 1986. Extra intestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections : host factors and strain characteristics. J. Infect. Dis. **153**: 552-559.

Borch, E., Kant-Muermans, M. L., and Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. Int. J. Food Microbiol. **33**: 103-120.

Bottone, E., Allerhand, J., and Pisano, M.A. 1971. Characteristics of bacteriocin derived from *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes* antagonistic to *Diplococcus pneumoniae*. Appl. Microbiol. **22**: 200-204.

Bouton, Y., Guyot, P., and Grappin, R. 1998. Preliminary characterization of microflora of Comte´ cheese. J.Appl. Microbiol. **85**: 123-131.

Boziaris, I. S., and Adams, M. R. 1999. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. Int. J. Food Microbiol. **53**: 105-113.

Brackett, E. 2001. Fruit, vegetables and grains. En: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (Eds). 2001. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. 2^a ed. ASM Press, Washington DC.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.

Brock, T.D., and Davies, J.M. 1963. Probable identity of a group D-hemolysin with a bacteriocine. J. Bacteriol. **86**: 709-712.

Bruno, M.E.C., and Montville, T.J. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 3003-3010.

Buydens, P., and Debeuckelaere, S. 1996. Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. Scan. J. Gastroenterol. **31**: 887-891.

Buyong, N., Kok, J., and Luchansky, J.B. 1998. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 4842- 4845.

Buzby, J.C., Roberts, T., Jordan Lin, C.T., and MacDonald, J.M. (Eds). 1996. Bacterial Foodborne Diseases: Medical costs and Productivity Losses. Agricultural Economic Report. **741**: 100.

Campbell, J.V., Mohle-Boetani, J., Reporter, R., Abbott, S., Farrar, J., Brandl, M., Mandrell, R., and Werner, S.B. 2001. An outbreak of Salmonella serotype Thompson associated with fresh cilantro. *J. Infect. Dis.* **183**: 984-987.

Campbell, R.J., Egan, A.F., Grau, F.H., and Shay, B.J. 1979. The growth of *Microbacterium thermosphactum* on beef. *J. Appl. Bacteriol.* **47**: 505-509.

Cárcoba, R., Delgado, T., and Rodríguez, A. 2000. Comparative performance of a mixed strain starter in cow's milk, ewes' milk and mixtures of these milks. *Eur. Food. Res. Technol.* **211**: 141-146.

Carolissen-Mackay, V., Arendse, G., and Hastings, J.W. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.* **34**: 1-16.

Carrasco de Mendoza, M. S., Scarinci, M. S., Huerto-Garat, H. E., and Simonetta, A. C. 1992. Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. *Microbiologie-Aliments-Nutrition.* **10**: 289-293.

Casaus, P., Cintas, L.M., Rodríguez, J.M., Hernández, P.E., Holo, H., and Nes, I.F. 1995. Partial biochemical characterization of an enterocin produced by an *Enterococcus faecium* strain of meat origin. Abstract of the 1st Meeting of the EU-Biotech Project in LAB Antimicrobial Compounds.

Casaus, P., Pilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernandez P.E., and Holo, H. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiol.* **143**: 2287-2294.

Casp, A., and Abril, J. 1999. *Procesos de conservación de alimentos.* A. Madrid Vicente- Mundi Prensa. Madrid

Centeno, J.A., Menéndez, S., and Rodriguez-Otero, J.L. 1996. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *Int. J. Food Microbiol.* **33**: 307-313.

Centeno, J.A., Menéndez, S., Hermida, Ma., and Rodríguez-Otero, J.L. 1999. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* **48**: 97-111.

Chen, C., and Durst, R.A. 2006. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* with an array-based immunosorbent assay using universal protein G-liposomal nanovesicles. *Talanta* **69**: 232-238.

Chinachoti, N., Matsusaki, H., Sonomoto, K., and Ishikazi, A. 1997 Utilization of xylose as an alternative carbon source for nisin Z production by *Lactococcus lactis* IO-1. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* **42**: 171-181.

Cintas, L.M., Casaus, P., Havarstein, L.S., Hernandez, P.E., and Nes, I.F. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4321-4330.

Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Havarstein, L.S., Holo, H., Hernandez P.E., and Nes, I.F. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* **182**: 6806-6814.

Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I.F., and Havarstein, L.S. 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* **180**: 1988-1994.

Cladera-Olivera, F., Caron, G. R., and Brandelli, A. 2004. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* **21**: 53-58.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., and Chikindas, M.L. 2001. bacteriocins: safe natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**: 1-20.

Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Valdivia, E., Lucas, R., Maqueda, M., Martínez Cañamero, M., and Gálvez, A. 2005. Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. **71**: 7781-7787.

Cobos, E., Filimonov, V., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., Martínez, J.C., and Mateo, P.L. 2002. The denaturation of circular enterocin AS-48 by urea and guanidinium hydrochloride. *Biochim. Biophys. Acta.* **1598**: 98-107.

Cobos, E., Filimonov, V.V., Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Martínez, J.C., and Mateo, P.L. 2001. AS-48: a circular protein with an extremely stable globular structure. *FEBS Lett.* **505**: 379-382.

Coghill, D., and Juffs, H.S. 1979. Incidence of psychrotrophic sporeforming bacteria in pasteurised milk and cream products and effect of temperature on their growth. *Aust. J. Dairy Technol.* **34**: 150-153.

- Condon, S., and Sala, F.J.** 1992. Heat resistance of *Bacillus subtilis* in buffer and foods of different pH. *J. Food Prot.* **55**: 605-608.
- Coppola, T.M., Parente, J.E., Dumontet, S., and La Peccerella, A.** 1988. The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water buffalo milk. *Lait.* **68**: 295-310.
- Coque, T.M., Patterson, J.E., Steckelberg, J.M., and Murray, B.E.** 1995. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J. Infect. Dis.* **171**: 1223-1229.
- Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature reviews Microbiol.* **3**: 777-788.
- Cowell, N. D.** 1999. History of food microbiology. pp. 1066-1071. En: Robinson, R.K, Batt, C.A., Patel, P.D (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford, U.K. 2000.
- Cuesta, P., Fernández-García, E., González de Llano, D., Montilla, A., Rodríguez, A.** 1996. Evolution of the microbiological and biochemical characteristics of Afuega'l Pitu cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* **79**: 1693-1698.
- Cutter, C.N., and Siragusa, G.R.** 1994. Efficacy of organic acids against *Escherichia coli* O157: H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model carcass washer. *J. Food Prot.* **57**: 97-103.
- Cutter, C.N., and Siragusa, G.R.** 1998. Incorporation of nisin into a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**: 19-23.
- Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., and Simard, R.E.** 1993. Influence of growth conditions in production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 166-173.
- Daeschel, M.A.** 1993. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. pp. 63-91. En: D.G. Hoover, & L.R. Steenson (Eds.). *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic Press Inc., New York.
- Daeschel, M.A. McGuire, J., and Al-Makhlafi, H.** 1992. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surface. *J. Food Prot.* **55**: 731-735.
- Dahiya, J.P., Hoehler, D., Wilkie, D.C., Van Kessel, A.G., and Drew, M.D.** 2005. Dietary glycine concentration affects intestinal *Clostridium perfringens* and lactobacilli populations in broiler chickens. *Poult. Sci.* **84**:1875-1885.

Dallas, H.L., Sathyamoorthy, V., and Hitchins, A.D. 1996. Purification of the anti-listerial bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Enterococcus faecium* 108. *J. Food Safety* **16**: 183-199.

Dass, C.R. 1999. Starter cultures. Importance of selected genera. pp. 2095-2100. En: Robinson, R.K, Batt, C.A., Patel, P.D (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford, U.K. 2000.

Davidson, P.M. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. pp. 520-549. En: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (Eds). *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington DC.

Davies, E.A., Bevis, H.E., and Delves-Broughton, J., 1997. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservativo in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**: 343-346.

Davies, E.A., Falahee, M.B., and Adams, M.R. 1996. Involvement of the cell envelope of *Listeria monocytogenes* in the acquisition of nisin resistance. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 139-146.

Davies, E.A., Milne, C.F., Bevis, H.E., Potter, R.W., Harris, J.M., Williams, G.C., Thomas, L.V., and Delves-Broughton, J. 1999. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. *J. Food Prot.* **62**: 1004-1010.

De Vuyst, L., and Vandamme, E.J. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 571-578.

De Vuyst, L., Callewaert, R., and Crabbé, K. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiol.* **142**: 817-827.

De Vuyst, L., Foulquié-Moreno, M.R., and 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.

Del Pozo, B.F., Gaya, P., Medina, M., Rodriguez-Marin, M.A., Nuñez, M. 1988. Changes of microflora of La Serena ewe's milk cheese during ripening. *J. Dairy Res.* **55**: 449-455.

Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* **44**: 100-117.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., and Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**: 193-202.

Delves-Broughton, J., Williams, G.C., and Wilkinson, S. 1992. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in pasteurized liquid whole egg. *Lett. Appl. Microbiol.* **15**: 133-136.

Díaz Torres, M.L. 1999. Análisis y expresión de los genes implicados en la producción y resistencia frente a AS-48. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Dicks, L.M.T., Mellet, F.D., and Hoffman, L.C. 2004. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *curvatus* in production of ostrich meat salami, *Meat Sci.* **66** : 703-708.

Diep, D.B., and Nes, I.F. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* **3**: 107-122.

Doores, S. 1993. Organic acids. pp. 95-136. En: Davidson, P.M., Branen, A.L. (Eds.). *Antimicrobials in Foods*, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

Dufrenne, J., Bijwaard, M., te Giffel, M., Beumer, R., and Notermans, S. 1995. Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* **27**: 175-183.

Dufrenne, J., Soentoro, P., Tatini, S., Day, T., and Notermans, S. 1994. Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* **23**: 99-109.

Egli, T., and Zinn, M. 2003. The concept of multiple-nutrient-limited growth of microorganisms and its application in biotechnological processes. *Biotechnology Advances* **22**: 35-43. NO LO ENCUESTRO EN EL TEXTO!!

Eguchi, T., Kaminaka, K., Shima, J., Kawamoto, S., Mori, K., Choi, S.H., Doi, K., Ohmomo, S., and Ogata, S. 2001. Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 247-253.

Ekperigin, H.E., and Nagaraja, K.V. 1998. Microbial food borne pathogens. *Salmonella*. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **14**: 17-29.

Enan, G., el-Essawy, A.A., Uyttendaele, M., and Debevere, J. 1996. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. *Int. J. Food Microbiol.* **30**: 189-215.

Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. 2001. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *Int. J. Food Microbiol.* **70**: 291-301.

Ennahar, S., Assobhei, O. and Hasselmann, C. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *J. Food Prot.* **61**: 186-191.

Eppert, I., Valdes-Stauber, N., Gotz, H., Busse, M., and Scherer, S. 1997. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium lenes* as evaluated in situ on soft cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4812-4817.

European Commission. 2004. List of the authorized additives in feedingstuffs published in application of Article 9t (b) of Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. Official Journal of the European Union of 25.2.2004, C50.

FAO/WHO *Codex Alimentarius*, Comisión 1996.

Farber, J.M., and Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**: 476-511.

Farías, M.E., Farías, R.N., Ruíz Holgado, A.P., and Sesma, F. 1996. Purification and N-terminal amino acid sequence of enterocin CRL35, a pediocin like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL35. *Lett Appl Microbiol.* **22**: 417-419.

Farkas, J. 2006. Irradiation for better foods. *Trends in Food Science & Technology* 1-5.

Fernández Rodríguez, M. 2004. Análisis funcional y de expresión de la enterocina AS-48 en *Enterococcus faecalis* y transferencia a otras bacterias del ácido láctico. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Fernández, M., Sánchez-Hidalgo, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., García-Quintáns, N., López, P., and Maqueda, M. 2006. Transcriptional analysis and regulation of the *as-48ABC* cluster, essential for the biogenesis of the enterocin AS-48. *J. Bacteriol.* (Submitted).

Ferreira, M.A. and Lund, B.M. 1996. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture médium and long-life cottage cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**: 433-438.

Fields, F.O. 1996. Use of bacteriocins in food: regulatory considerations. *J. Food Protect.* **S**: 72-77.

- Foegeding, P.M., Thomas, A.B., Pilkington, D.H. and Klaenhammer, T.R. 1992.** Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 884-890.
- Folli, C., Ramazzina, I., Arcidiaco, P., Stoppini, M., and Berni, R. 2003.** Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiol. Lett.* **221**: 143-149.
- Food preservation.** Encyclopedia of Science, 2nd ed. Ed. Rob Nagel. Gale, 2002.
- Fordyce, A.M., Crow, V.L., and Thomas, T.D. 1984.** Regulation and product formation during glucose or lactose limitation in nongrowing cells of *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 332-337.
- Foulquié-Moreno, Rea, M.C., Cogan, T. M., and, De Vuyst, L. 2003.** Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* **81**: 73-84.
- Franz, C.M., Schillinger, U., and Holzappel, W.H. 1996.** Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black lives. *Int J Food Microbiol.* **29**: 255-270.
- Franz, C.M.A.P., Holzappel, W.H. and 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., and Holzappel, W.H. 2003.** Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **88**:105-122.
- Gálvez, A. 1987.** Purificación, caracterización y actividad biológica de una sustancia antibacteriana de amplio espectro producida por *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Gálvez, A., Giménez-Gallego, G., Maqueda, M. and Valdivia, E. 1989a.** Purification and amino-acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* subsp. *Liquefaciens* S-48. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 437-441.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. 1989d.** Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against Gram-positive and Gram negative bacteria and other organisms. *Res. Microbiol.* **140**: 57-68.
- Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. 1991.** Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **173**: 886-892.

Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., Quesada, A. and Montoya, E. 1986. Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can. J. Microbiol.* **32**: 765-771.

Gálvez, A., Valdivia, E., Abriouel, H., Camafeita, E., Méndez, E., Martínez-Bueno, M., and Maqueda, M. 1998. Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Arch. Microbiol.* **171**: 59-65.

Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., and Montoya, E. 1985. Production of bacteriocin-like substances by group D streptococci of human origin. *Microbios* **43**: 223-232.

Gálvez, A., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M. and Maqueda, M. 1989b. Bactericidal action of peptide antibiotic AS-48 against *Escherichia coli* K-12. *Can. J. Microbiol.* **35**: 318-321.

Gálvez, A., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M. and Maqueda, M. 1989c. Effect of peptide AS-48 on *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-47. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 641-645.

Gálvez, A., Valdivia, E., Martínez-Bueno, M., and Maqueda, M. 1990. Induction of autolysis in *Enterococcus faecalis* S-47 by peptide AS-48. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 406-413.

García, M.C., Otero, A., García, M.L., García, M.R. and Moreno, B. 1988. Species identification of staphylococci and micrococci isolated from ewe's milk cheeses. *J. Dairy Res.* **55**: 269-272.

García, M.C., Rodríguez, M.J., Bernardo, A., Tornadijo, M.E., and Carballo, J. 2002. Study of enterococci and micrococci isolated throughout manufacture and ripening of San Simón cheese. *Food Microbiol.* **19**: 23-33.

Gardiner, G.E. Ross, R.P., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jagers, P.P.J.M., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., and Stanton, C. 1999. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of Cheddar cheese. *J. Agr. Food Chem.* **47**: 4907-4916.

Garneau, S., Martin, N.I. and Vederas, J.C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* **84**: 577-592.

Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M. and Hugas, M. 2002. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in meat model system during storage. *Food Microbiol.* **19**: 509-518.

Garriga, M., Hugas, M., Gispert, M.J., and Sarraga, C. 1993. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus faecium* CTC 492 isolated from fermented sausages. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 131.

Gilbert, R.J. 1979. *Bacillus cereus* gastroenteritis. p 495. En: H. Reimann and F. L. Bryan (Eds). *Food-borne infections and Intoxications*, 2nd ed. Academic Press, Inc., New York, NY.

Gill, A.O., and Holley, R.A. 2000. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Res. Int.* **33**: 83-90.

Gilmore, M.S. Segarra, R.A. and Booth, M.C. 1990. An HlyB-type function is required for expression of the *Enterococcus faecalis* hemolysin-bacteriocin. *Infect. Immun.* **58**: 3914-3923.

Giraffa, G. 1995. Enterococcal bacteriocins: Their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.* **12**: 291–299.

Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **88(2-3)**: 215-222

Goff, J.H., Bhunia, A.K., and Johnson, M.G. 1996. Complete inhibition of low levels of *Listeria monocytogenes* on refrigerated chicken meat with pediocin AcH bound to heat-killed *Pediococcus acidilactici* cells. *J. Food Prot.* **59**: 1187-1192.

Gomori. 1955. After Sorensen, *Meth. Enzymol.* **1**: 145

González, C., Langdon, G.M., Bruix, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., and Rico, M. 2000. Bacteriocin AS-48, a cyclic polypeptide structurally and functionally close to mammalian NK-lysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 11221-11226.

Goulhen, F., Megrhous, J., and Lacroix, C. 1999. production of nisin Z/pediocin mixture by pH-controlled mixed-strain batch cultures in supplemented whey permeate. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 339-406.

Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., and Givskov, M. 2002. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **78**: 79-97.

Grande, M. J., Lucas, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Valdivia, E., and Gálvez, A. 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* **104**: 289-297.

Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda,

M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero M., and Gálvez, A. 2006. Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 185-194.

Granum, P.E. 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Bacteriol. Symp.* **76** (Suppl.): 61S-66S.

Granum, P.E., and Lund, T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* **157**: 223-228.

Granum, P.E., Brynestad, S., and Kramer, J.M. 1993. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. 1993. *Int J Food Microbiol.* **17**: 269-279.

Guerra, N.P, Rua, M.L, and Pastrana, L. 2001. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *Int. J. Food Microbiol.* **70** (3): 267-281.

Gutiérrez, J., Criado, R., Citti, R., Martín, M., Herranz, C., Nes, I.F., Cintas, L.M., and Hernández, P.E. 2005. Cloning, production and functional expression of enterocin P, a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*. *Intern. J. Food Microbiol.* **103** (3): 239-250.

Harasawa, R., Sozuki, K., and Mitsuoka, T. 1980. *Streptococcus faecium* – derived antibacterial substance antagonistic to Bifidobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**: 58-62.

Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E. and Klaenhammer, T.R. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **52**: 384-387.

Hathcox, A.K. and Beuchat, L.R. 1996. Inhibitory effects of sucrose fatty acid esters, alone and in combination with ethylenediaminetetraacetic acid and other organic acids, on viability of *Escherichia coli* O157:H7. *Food microbiology* **13**: 213-225.

Hernández, P.E., Rodríguez, J.M., Cintas, L.M., Moreira, W.L., Sobrino, O.J., Fernández, M.F. and Sanz, B. 1993. Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. *Microbiología SEM.* **9**: 37-48.

Hirsch, A., Grinsted, E., Chapman, H. R. and Mattick, A.T.R. 1951. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing *Streptococcus*. *J. Dairy Sci.* **18**: 205–206.

Hite, B.H. 1899. The effect of pressure in preservation of milk. West Virginia University Agricultural Experiment Station Bulletin 85, 15 (Cited in Hoover, D.G.,

Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F. and Knorr D., 1989. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology* **43**: 99-107).

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

Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.* **49**: 139-150.

Hugas, M., Garriga, M., and Aymerich, M. T. 2003. Functionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 223-233.

Hugas, M., Garriga, M., and Monfort, J.M. 2002. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Sci.* **62 (3)**: 359-371.

Hugenholtz, J., and De Veer, G.J.C.M. 1991. pp. 440-447. Application of nisin A and nisin Z in dairy technology. En. *Nisin and novel lantibiotics.* Jung, G. and Sahl, H-G. (Eds.) Leiden : Escom.

Huycke, M.M., Abrams, V., and Moore, D.R. 2002. Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis.* **23 (3)**: 529-536.

Jack RW, Tagg JR, and Ray B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev.* **59**: 171-200.

Jackson, T.C., Marshall, D.L., Acuff, G.R., and Dickson, J.S. 2001. Meat, poultry and seafood. En: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (Eds). 2001. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers.* 2^a ed. ASM Press, Washington DC.

Jacob, A.E., Douglas, G.J., and Hobbs, S.J. 1975. Self-transferable plasmids determining the hemolysin and bacteriocin of *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J Bacteriol.* **121**: 863-872.

Jaquette, C.B., and Beuchat, L.R. 1998. Combined effects of pH, nisin, and temperature in growth and survival of psychrotrophic *Bacillus cereus*. *J. Food Prot.* **61**: 563-570.

Jennes, W., Dicks, L.M., and Verwoerd, D.J. 2000. Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 349-357.

Jenson, I., Baird, L. and Delves-Broughton, J. 1994. The use of nisin as a preservative in Crumpets. *J. Food Prot.* **57**: 874-877.

Jett, B.D., Huycke, M.M., and Gilmore, M.S. 1994. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**: 462-478.

Johnson, A.P. 1994. The pathogenicity of enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**: 1083-1089.

Joosten, H.M., Nuñez, M., Devreese, B., Van Beeumen, J. and Marugg, J.D. 1996. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA4. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4220-4223.

Jung, D.S., Bodyfelt, F.W. and Daeschel M.A. 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficiency of the nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. **75**: 387-393.

Kabara, J.J. 1993. Medium chain fatty acids and esters. pp. 35-40. En: Davidson, P.M., Branen, A.L. (Eds.) *Antimicrobials in Foods*, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

Kaiser, A.L, and Montville, T.J. 1993. The influence of pH and growth rate on the production of the bacteriocin, bavaricin MN, in batch and continuous fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 536-540.

Kalogridou-Vassiliadou, D., Tzanetakis, N., and Litopoulou-Tzanetaki, E. 1994. Microbiological and physicochemical characteristics of FAnthotyro, a Greek traditional whey cheese. *Food Microbiol.* **11**: 15-19.

Kamaly, K.M., and Marth, E.H. 1989. Enzyme activities of cell-free extracts from mutant strains of lactic streptococci subjected to sublethal heating or freeze-thawing. *Cryobiol.* **26**: 496-507.

Kato, N., and Shibasaki, I. 1975. Combined effect of different drugs on the antibacterial activity of fatty acids and their esters. *J. Antibacterial and Antifungal Agents* **3**: 355-361.

Kato, N., and Shibasaki, I. 1976. Combined effect of citric acid and polyphosphoric acid on the antibacterial activity of monoglycerides. *J. Antibacterial and Antifungal Agents* **4**: 2-9.

Kato, N., and Shibasaki, I. 1977. Combined effects of citric acid and polyphosphoric acid on the antibacterial activity of monocaprin against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *J. Antibacterial and Antifungal Agents* **5**: 1-6.

Kato, T., Matsuda, T., Ogawa, E., Ogawa, H., Kato, H., Umeyuki, D., and Nakamura, R. 1994. Plantaricin-149, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149. *J. Fermentation Bioengineering.* **77**: 277-282.

Kawamoto, S., Shima, J., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Shibato, J., Horikoshi, N., Takeshita, K., and Sameshima, T. 2002. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3830-3840.

Kelly, W.J., Asmundson, R.V. and Huang, C.M. 1996. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *Intern. J. Food Microbiol.* **33**: 209-218.

Kim, W.S., Hall, R.J., and Dunn, N.W. 1997. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 449-453.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 39-86.

Komitopoulou, E., Boziris, I.S., Davies, E.A., Delves-Broughton, J. and Adams, M.R. 1999. *Int. J. Food Sci. Technol.* **34**: 81-85.

Korhonem, H., Pihlanto-Leppälä, A., Rantamäki, P., and Tupasela, T. 1998. The functional and biological properties of whey proteins: prospects for the development of functional foods. *Agr. Food Sci. Finl.* **7**: 283-296.

Kramer, J. M. and Gilbert, R. J. 1989. *Bacillus cereus* and other bacilli species. pp 21-70. En: Doyle, M.P. (Ed.). *Food-borne pathogens*. Marcel Dekker, New York, N.Y.

Krämer, J., and Brandis, H. 1975. Mode of action of two *Streptococcus faecium* bacteriocins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **7**: 117-120.

Krämer, J., Keness, J., and Brandis, H. 1983. Transfer of a mini-plasmid determining bacteriocin production and bacteriocin immunity in *Streptococcus faecium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **20**: 385-389.

Langdon, G.M., Bruix, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., and Rico, M. 1998. Sequencespecific ¹H assignment and secondary structure of the bacteriocin AS-48 cyclic peptide. *J. Biomol. NMR* **1**: 173-175.

Langeveld, L.P.M., van Sponen, W.A., van Beresteijn E.C.H., and Noterman, S. 1996. Consumption by healthy adults of pasteurized milk with high concentration of *Bacillus cereus*. A double blind study. *J. Food Protect.* **59**: 723-726

Lara, F. 1982. Código de Hammurabi, Madrid, Editora Nacional.

Lauková, A., Czikková, S. Dobránsky, T. and Burdová, O. 1999a. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milk products. *Food Microbiol.* **16**: 93-99.

Lauková, A., Czikková, S., Laczková, S. and Turek, P. 1999b. Use of enterocin CCM 4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated dry fermented Hornád salami. *Int. J. Food Microbiol.* **52**: 115-119.

Lauková, A., Mareková, M., and Javorsky, P. 1993. Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM4231. *Lett. Appl. Microbiol.* **16**: 257-260.

Law, B.A., Sharpe, M.E., Mabbitt, L.A., and Cole, C.B. 1973. Microflora of Cheddar cheese and some of the metabolic products. pp. 1-9. En: F. A. Skinner and D. W. Lovelock (Eds.), *Sampling—microbiological monitoring of environments*. London, UK: Academic Press.

Leclercq, R. 1997. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin. Infect. Dis.* **24** (Suppl. 1): S80-S84.

Leisner, J.J., Greer, G.G. and Stiles, M.E. 1996. Control of beef spoilage by sulfide-producing *Lactobacillus sake* strain with bacteriocinogenic *Leuconostoc gelidum* UAL 187 during anaerobic storage at 2 °C. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2610-2614.

Leistner, L. 1978. Hurdle effect and energy saving. pp. 553-557. En: Downey, W.K. (Ed.), *Food Quality and Nutrition*, Applied Science Publishers, London, UK.

Leistner, L. 1994. Further developments in the utilization of hurdle technology for food preservation. *J. Food Engineering* **22**: 421-432.

Leistner, L. 1997. Microbial stability and safety of healthy meat, poultry and fish products. pp. 347-360. En: Pearson, A.M., Dutson, T.R. (Eds.), *Production and Processing of Healthy meat, Poultry and Fish Products*, Blackie Academic and Professional, London.

Leistner, L. 1999a. Combined methods for food preservation. pp. 457-485. En: Shafiur Rahman, M (Ed.), *Handbook of Food Preservation*, Marcel Dekker, New York.

Leistner, L. 1999b. Use of combined preservative factors in food in developing countries. En: Lund, B.M., Baird-Parker, A.C., Gould, G.W. (Eds.). *The Microbiological Safety of Foods*, Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland.

Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* **55**: 181-186.

Leroy, F., Fouquié Moreno, M.R., and De Vuyst, L. 2003. *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 235-240.

- Li, Y., Shahbazi, A., and Kadzere, C.T.** 2006. Separation of cells and proteins from fermentation broth using ultrafiltration. *J. Food Eng.* **75**: 574-580.
- Liao, C.C., Yousef, A.E., Chism, G.W., and Richter, E.R.** 1994. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in buffer, culture media and foods by lacidin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* OSU133. *J. Food Safety* **14**: 87-101.
- Liao, C.C., Yousef, A.E., Richter, E.R. and Chism, G.W.** 1993. Pediococcus acidilactici PO2 bacteriocin production in whey permeate and inhibition of *Listeria monocytogenes* in foods. *J. Food Sci.* **58**: 430-434.
- Litopolou-Tzanetaki, E.** 1990. Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. *J. Food Sci.* **55**: 111-113.
- Litopoulou-Tzanetaki, E., and Tzanetakis, N.** 1992. Microbiological study of whitebrined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiol.* **9**: 13-19.
- Liu, C., Liu, Y., Liao, W., Wen, Z., and Chen, S.** 2004. Simultaneous production of nisin and lactic acid from cheese whey: optimization of fermentation conditions through statistically based experimental designs. *Appl Biochem Biotechnol.* **113-116**: 627-638.
- López-Lara, I., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. and Valdivia, E.** 1991. Purification, characterization, and biological effects of a 2nd bacteriocin from *Enterococcus faecalis* ssp *liquefaciens* S-48 and its mutant strain B-48-28. *Can. J. Microbiol.* **37**: 769-774.
- Luchansky, J.B.** 1999. Overview on applications for bacteriocin-producing lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Antonie von Leeuwenhoek*, **76**: 335.
- Luchansky, J.B.** 1999. Overview on applications for bacteriocin-producing lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Antonie von Leeuwenhoek*, **76**: 335.
- Luchansky, J.B., Glass, K.A., Harsono, K.D., Degnan, A.J., Faith, N.G., Cauvin, B., Baccus-Taylor, G., Arihara, K., Bater, B., Maurer, A.J. and Cassens, R.G.** 1992. Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in turkey summer sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3053-3059.
- Macedo, C.A., Malcata, F.X., and Hogg, T.A.** 1995. Microbiological profile in Serra ewe's cheese during ripening. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 1-11.
- Maisnier-Patin, S., Deschamps, N., Tatini, S. R., and Richard, J.** 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Le Lait* **72**: 249-263
- Maisnier-Patin, S., Forni, E. and Richard, J.** 1996. Purification, partial characterisation and mode of action of enterococcin EFS2, an

antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. Intern. J. Food Microbiol. **30**: 255-270.

Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I.G., and Anifantakis, E.M. 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. Int. J. Food Microbiol. **82**: 153-161.

Maqueda, M., Fernández, M., Martín, M.C., Valdivia, E., and Martínez-Bueno, M. 2003. Expresión del carácter AS-48 en diversas bacterias lácticas. Proceed. XIX Congreso Nacional de Microbiología. Santiago de Compostela. Spain.

Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. 1998. Widespread production of AS-48-like bacteriocins in strains of *Enterococcus faecalis*. Mol. Microbiol. **29**: 1318-1319.

Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Sánchez-Barrena, M.J., González, C., Albert, A., Rico, M., and Valdivia, E. 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. Curr. Protein Pept. Sci. **5**:3 99-416.

Margolles, A., Rodríguez, A., and García de los Reyes-Gavilán, C. 1997. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening, and cold storage of Afuega 1 Pitu cheese. J. Food Prot. **60**: 689-693.

Martin, S.E., and Iandolo, J.J. 1999. *Staphylococcus*. Introduction. pp. 2062 – 2065. En Robinson, R.K, Batt, C.A., Patel, P.D (Eds). Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, Oxford, U.K. 2000.

Martínez-Bueno, M. 1986. Inducción y curación de la producción de sustancias antimicrobianas por *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada.

Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Valdivia, E., and Maqueda, M. 1990. A transferable plasmid associated with AS-48 production in *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol. **172**: 2817-2818.

Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Gálvez, A., Samyn, B., Van Beeumen, J., Coyette, J., and Valdivia, E. 1994. Determination of the gene sequence and molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. J. Bacteriol. **176**: 6334-6339.

Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K., and Ishikazi, A. 1996. Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1:relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. Appl. Microbiol. Biotechnol. **45**: 36-40.

Mattick, A.T.R. and Hurst, A. 1944. A powerful anhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature* **154**: 551.

Mauriello, G., Aponte, M., Andolfi, R., Moschetti, G., and Villani, F. 1999. Spray-Drying of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria. *J. Food Prot.* **62**: 773-777.

McAuliffe, O., Ross, R.P. and Hill, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 285-308.

McKay, L.L., and Baldwin, K.A. 1990. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**: 3-14.

McMeekin, T.A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D.S., Olley, J., Presser, K., Ratkowsky, D.A., Ross, T., Salter, M., and Soontranon, S. 1997. Quantitative Microbiology: A Basis for Food Safety. *Emerging Infectious Diseases.* **3**: 541-549.

McMeekin, T.A., Olley, J., Ratkowsky, D.A, and Ross, T. 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* **73**: 395-407.

Meghrous, J., Huot, E., Quittelier, M., Petitdemange, H. 1992. Regulation of nisin biosynthesis by continuous cultures and by resting cells of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Res. Microbiol.* **143**: 879-890.

Mendoza, F., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. 1999. Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48-adapted strain of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 618-625.

Menéndez. S., Godínez, R., Centeno, J.A., and Rodríguez-Otero, J.L. 2001. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of 'Tetilla' raw cows-milk cheese. *Food Microbiol.* **18**: 151-158.

Ming, X.T., Werber, G.H., Ayers, J.W., and Sandine, W.E. 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *J. Food Sci.* **62**: 413-415.

Molinos, A.C., Abriouel, H., Ben Omar, N., Valdivia, E., López, R.L., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., and Gálvez, A. 2005. Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Appl Environ Microbiol.* **71 (12)**:7781-7787.

Monk, J.D., and Beuchat, L.R. 1995. Viability of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and psychotrophic spoilage micro-organisms in refrigerated

ground beef supplemented with sucrose esters of fatty acids. *Food Microbiol.* **12**: 397-404.

Monk, J.D., Beuchat, L.R., and Hathcox, A.K. 1996. Inhibitory effects of sucrose monolaurate, alone and in combination with organic acids, on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 7-18.

Montville, T.J. and Wikowski, K. 1997. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. pp. 557-577. En: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. (Eds), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington DC.

Montville, T.J., Rogers, A.M. and Okereke, A. 1992. Differential sensitivity of *Clostridium botulinum* strain to nisin. *J. Food Prot.* **56**: 444-448.

Montville, T.J., Winkowski K., and Chikindas, M.L. 2001. Biologically based preservation system. En: *Food Microbiology. Fundamentals and frontiers*. 2^a ed. Doyle, Buechat y Montville (Eds). ASM Press. Washington, D.C.

Morgan, S.M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R.P., and Hill, C. 1999. Development of a lactacin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. *J. Food Prot.* **62**: 1011-1016.

Morgan, S.M., Galvin, M., Ross, R.P. and Hill, C. 2001. Evaluation of a spray lactacin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 387-391.

Morovsky, M., Pristas, P., Czikkova, S., and Javorsky, P. 1998. A bacteriocin-mediated antagonism by *Enterococcus faecium* BC25 against ruminal *Streptococcus bovis*. *Microbiol. Res.* **153 (3)**: 277-281.

Morrison, D., Woodford, N., and Cockson, B. 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement* **83**: 89S-99S.

Mortvedt-Abildgaa, C.I., Nissen-Meyer, J., Jelle, B., Grenov, B., Skaugen, M., and Nes, I.F. 1995. Production and pH-Dependent Bactericidal Activity of Lactocin S, a Lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:175-179.

Muñoz, A., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., and Valdivia, E. 2004. Biocontrol of psychrotrophic enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a nonfat hard cheese by an enterococcal strain-producing enterocin AS-48. *J. Food Prot.* **67**: 1517-1521.

Muriana, P.M., and Luchansky, J.B. 1993. Biochemical methods for purification of bacteriocins. pp. 41-61. En: Hoover, D.G. and Steenson, L.R. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. San Diego: Academic Press.

Nachamkin, I., Blaser, M.J. and Tompkins, L.S (Eds). 1992. *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends*. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Nakagawa, S. 1979. Studies on bacteriocins produced by group D streptococci. I. Characterization of several bacteriocins. *Hiroshima Med. J.* **27**: 809-825.

Navaratna, M.A.D.B., Sahl, H-G., and Tagg, J.R. 1998. Two-Component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4803-4808.

Nes, I.F., Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V., and Holo H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**: 113–128.

Nettles, C.G., and Barefoot, S.F. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* **56**: 338-356.

Nicolas, G., Auger, I., Beaudoin, M., Halle, F., Morency, H., LaPointe, G., Lavoie, M.C. 2004. Improved methods for mutacin detection and production. *J. Microbiol. Methods.* **59** (3): 351-361.

Nielsen, J.W., Dickson, J.S., Crouse, J.D. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2142-2145.

Nilsen, T., Nes, I.F., and Holo, H. 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2975-84.

Nissen-Mayer, J., Holo, H., Håvarstein, L.S., Sletten, K. and Nes, I.F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* **174**: 5686-5692.

Notermans, S. 1999. Food poisoning outbreaks. pp. 835 – 840. En: Robinson, R.K, Batt, C.A., Patel, P.D (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford, U.K. 2000.

Notermans, S., and Tatini, S. 1993. Characterization of *Bacillus cereus* in relation to toxin production. *Neth. Milk Dairy J.* **47**: 71-77.

Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P., Beumer, R., te Giffel, M., and PeetersWeem, P. 1997. A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiol.* **14**: 143-151.

Núñez, M., Rodríguez, J.L., Garcia, E., Gaya, P. and Medina, M. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 671-677.

O'Sullivan, L. Ross, R.P. and Hill, C. 2002. Potencial od bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochem.* **84**: 593- 604.

Ogden, K. and Tubb, R.S. 1985. Inhibition of beer-spoilage lactic acid bacteria by nisin. *J. Inst. Brew.* **91**: 390-392.

Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M., and Nakanishi, K. 2001. Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 81-89.

Olasupo, N.A., Schillinger, U., Franz, C.M., and Holzapfel, W.H. 1994. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from 'wara', a fermented skimmed cow milk product from west Africa. *Lett Appl Microbiol.* **19**: 438-441.

Onda, T., Yanagida, F., Uchimura, T., Tsuji, M., Ogino, S., Shinohara, T. and Yokotsuka, K. 2002. Widespread distribution of the bacteriocin-producing lactic acid cocci in *Miso*-paste products. *J. Appl. Microbiol.* **92**: 695-705.

Ordoñez, J.A., Barneto, R., and Ramos, M. 1978. Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwiss.* **33**: 609-612.

Oumer B.A., Gaya, P., Fernández-García, E., Marciaca, R., Garde, S., Medina, M., and Nuñez, M. 2001. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *J. Dairy Res.* **68**: 117-29.

Pantev, A., Valcheva, R., Danova, S., Ivanova, I., Minkov, I., Haertle, T., and Chobert, J.M. 2000. Effect of enterococcin A 2000 on biological and synthetic phospholipid membranes. *Int. J. Food Microbiol.* **80**: 145-152.

Parente, E., and Hill, C. 1992. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **73**: 290-298.

Parente, E., and Ricciardi, A. 1994. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**: 12-15.

Parente, E., and Ricciardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 628-638.

Parente, E., Brienza, C., Ricciardi, A., Addario, G. 1997. Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 62-67.

Parente, E., Ricciardi, A., and Addario, G. 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140 NWC during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**:388-394.

Park, E.S., Moon, W.S., Song, M.J., Kim, M.N., Chung, K.H. and Yoon, J.S. 2001. Antimicrobial activity of phenol and benzoic acid derivatives. *Int. Biodet.* **47**: 209-214.

Park, S.H., Itoh, K., and Fujisawa, T. 2003. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. *J. Appl. Microbiol.* **95**: 294-300.

Pascual Anderson, M.R., and Calderón y Pascual, V. 1999. *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas.* 2ª ed. Díaz de Santos. Madrid.

Peck, M.W., and Stringer, S.C. 2005. The safety of pasteurised in-pack chilled meat products with respect to the foodborne botulism hazard. *Meat Sci.* **70**: 461-475.

Pérez Elortondo, F.J., Albisu, M., and Barcina, Y. 1999. Physicochemical properties and secondary microflora variability in the manufacture and ripening of Idiazabal cheese. *Lait.* **79**: 281-290.

Pérez Guerra, N., Bernárdez, P.F., Agrasar, A.T., López Macías, C., Castro. 2005. LPFed-batch pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 on whey. *Biotechnol Appl Biochem.* **42** (Pt 1): 17-23.

Periago, P.M., and Moezelaar, R. 2001. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.* **68** (1-2):141-148.

Persson, A., Jonson, A-S., and Zacchi, G. 2001. Separation of lactic acid-producing bacteria from fermentation broth using a ceramic microfiltration membrane with constant permeate flow. *Biotechnol. Bioengin.* **72**: 269-277.

Piard, J.C., and Desmazeaud, M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* **72**: 525-541.

Piard, J.C., Kuipers, O.P., Rollema, H.S., Desmazeuad, M.J. and De Vos, W.M. 1993. Structure, organization and expression of the *lct* gene for lactacin 481, a novel lantibiotics produced by *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **268**: 16361-16368.

Poulet, B., Huertas, M., Sánchez, A., Cáceres, P., Larriba, G. 1993. Main lactic acid bacteria isolated during ripening of Casar de Ca'ceres cheese. *J. Dairy Res.* **60**: 123-127.

Pringle H. 1998. Neolithic agriculture: The Slow Birth of Agriculture. *Sci.* **282**: 1446.

Qin, X., Singh, K.V., Weinstock, G.M., and Murray, B.E. 2000. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and serine protease and virulence. *Infect. Immun.* **68**: 2579-2586.

Radler, F. 1990a. Possible use of nisin in winemaking. I. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeasts in solid and liquid media. *Am. J. Enol. Vitic.* **41**:1-6.

Radler, F. 1990b. Possible use of nisin in winemaking. II. Experiments to control lactic acid bacteria in the production of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **41**: 7-11.

Ray, B. 1992. Bacteriocins of starter culture bacteria as food biopreservative: an overview. En: Ray, B. and Daeschel, M. (Eds). *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. CRC Press. Boca Raton.

Richard, J.A. 2000. Les entérocoques dans les fromages: une menace discutable pour quelques consommateurs, à risque, une amélioration possible de la qualité des fromages au lait cru...ou pasteurisé. *Sciences des Aliments.* **20**:143-152.

Rodríguez, E., Arques, J.L., Núñez, M., Gaya, P., and Medina, M. 2005. Combined Effect of High-Pressure Treatments and Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria on Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Raw-Milk Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3399-3404.

Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J. L., Rodríguez, J. M., Núñez, M., Medina, M. 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *Intern. Dairy J.* **15**:51-57.

Rodríguez, J.L., Gaya, P., Medina, M. and Núñez, M. 1997. Bactericidal effect of enterocin 4 on *Listeria monocytogenes* in a model dairy system. *J. Food Prot.* **60**: 28-32.

Rogers, L.A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* **16**: 321-325.

Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P., de Vos, W.M. and Seizen, R.J. 1995. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2873-2878.

Ross, A.I.V., Griffiths, M.W., Mittal, G.S., and Deeth, H.C. 2003. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *International J. Food Microbiol.* **89**: 125-138.

Ross, R.P., Morgan, S. and Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* **79**: 3-16.

Rossi, E.A., Vendramini, R.C., Carlos, I.Z., Pei, Y.C., and de Valdéz, G.F. 1999. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. *Eur. Food Res. Technol.* **209**: 305-307.

Roth, L.A., and Clark, D.S. 1975. Effect of lactobacilli and carbon dioxide on the growth of *Microbacterium thermosphactum* on fresh beef. *Can. J. Microbiol.* **21**: 629-632.

Ryan, M.P., Jack, R.W., Josten, M., Sahl, H.G., Jung, G., Ross, R.P. and Hill, C. 1999. Extensive-translational modification, including a serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lacticine 3147. *J. Biol. Chem.* **247**: 37544-57550.

Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C. and Ross, R.P. 1996. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 612-619.

Saavedra, L., Taranto, M.P., Sesma, F., and Font de Valdez, G. 2003. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 241-245.

Sabia, C., Manicardi, G., Messi, P., de Niederhausern, S., and Bondi, M. 2002. Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **75 (1-2)**: 163-170.

Sahl, H.G., Jack, R.W., and Bierbaum, G. 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.* **230**: 827-853.

Salvat, G., Toquin, M.T., Michel, Y., and Colin, P. 1995. Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: The lessons of a listeriosis outbreak in France. *Int. J. Food Microbiol.* **25**: 75-81.

Samelis, J., and Metaxopoulos, J. 1999. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and meat processing plant. *Food Microbiol.* **16**: 465-477.

Samyn, B., Martínez-Bueno, M., DeOvrees, B., Maqueda, M., Gálvez, A., Valdivia, E., Coyette, J., Van Beeumen, J. 1994. The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett.* **352**: 87-90.

Sánchez-Barrena, M., Martínez-Ripoll, G., Gálvez, A., Valdivia, E., Maqueda, M., Cruz, V., and Albert, A. 2003. Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *J. Mol. Biol.* **334**: 541-549.

Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., and Tsakalidou, E. 2002a. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **76 (1-2)**: 93-105.

Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., and De V.L. 2002b. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *Int J Food Microbiol.* **72 (1-2)**: 125-136.

Sartingen, S., Rozdzinski, E., Muscholl-Silberhorn, A., and Marre, R. 2000. Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infect. Immun.* **68**: 6044-6047.

Scannell, A.G., Schwarz, G., Hill, C., Ross, R.P., Arendt, E.K. 2001. Pre-inoculation enrichment procedure enhances the performance of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* meat starter culture. *Int. J. Food Microbiol.* **64**: 151-159.

Schillinger, U., Geisen, R. and Holzapfel, W.H. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* **7**: 158-164.

Schoeman, H., Vivier, M.A., Du, T.M., Dicks, L.M. and Pretorius, I.S. 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 647-656.

Seideman, S.C., Vanderzant, C., Hanna, M.O., Carpenter, Z.L., and Smith, G.C. 1976. Effect of various types of vacuum packages and length of storage on the microbial flora of wholesale and retail cuts of beef. *J. Milk Food Technol.* **39**: 745-753.

Shankar, V., Baghdayan, A.S., Huycke, M.M., Lindahl, G., and Gilmore, M.S. 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.* **67**: 193-200.

Shelef, L.A. and Seiter, J.A. 1993. Indirect antimicrobials. pp. 539-570. En: Davidson, P.M. and Branen, A.L. (Eds). Antimicrobials in Foods. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

Silva, J., Carvalho, A.S., Teixeira, P., and Gibbs, P.A. 2002. Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. Letters in Applied Microbiology. **34**: 77-81.

Simko, S., and Bartko, P. 1996. Resistance to antibiotics in *Staphylococcus aureus* at ewe mastitis, in sheep milk and its products. Veterinary Medicine. **41**: 241-244.

Siragusa, G.R. 1992. Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus hirae*. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 3508-3513.

Smulders, F.J.M., Barendsen, P., Van Logtestijn, J.G., Mossel, D.A.A. and Van Der Marel, G.M. 1986. Review: Lactic acid: considerations in favour of its acceptance as a meat decontaminant. J. Food Technol. **21**: 419-436.

Song, H.J., and Richard, J. 1997. Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. Int. J. Food Microbiol. **36**: 155-161.

Sparo, M.D., Castro, M.S., Andino, P.J., Lavigne, M.V., Ceriani, C., Gutiérrez, G.L., Fernández, M.M., De Marzi, M.C., Malchiodi, E.L., and Manghi, M.A. 2006. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. J. Appl. Microbiol. **100**: 123-134.

Splittstoesser, D. F., Leasor, S.B., and Swanson, K.M. 1986. Effect of food composition on the heat resistance of yeast ascospores. J. Food Sci. **51**: 1265-1267.

Stadhouders, J., and Veringa, H.A. 1973. Fat hydrolysis by lactic acid bacteria in cheese. Neth. Milk. Dairy J. **27**: 77-91.

Steven, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A. and Klaenhammer, T.R. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 3613-3615.

Stiles, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. **70**: 331-345.

Strompfová, V., Lauková, A., and Ouwehand, A.C. 2004. Selection of enterococci for potential canine probiotic additives. Veterinary Microbiol **100** (1, 2): 107-114.

Styles, M.E., Hoover, D.G., and Farkas, D.F. 1991. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to high hydrostatic pressure. J. Food Sci.

56: 1404-1407.

Sulzer, G. and Busse, M. 1991. Growth inhibition of *Listeria* spp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. *Int. J. Food Microbiol.* **14:** 287-296.

Surekha, M., and Reddy, M. 1999. Preservatives. Classification and properties. En: Robinson, R.K, Batt, C.A., Patel, P.D (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford, U.K. 2000.

Süßmuth, S.D., Muscholl-Silberhorn, A., Wirth, R., Susa, M., Marre, R., Rozdzinski, E. 2002. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect. Immun.* **68:** 4900-4906.

Sutherland, J.P., Patterson, J.T., and Murray, J.G. 1975. Changes in the microbiology of vacuum-packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.* **39:** 227-237.

Suwa, N., Shirota, N., and Machida, H. 1988. Effects of food emulsifiers on spoilage of canned coffee caused by thermophilic spore forming bacteria. *J. Japan. Soc. Food Sci. Technol.* **35:** 706-708.

Tagg, J.R. 1992. Bacteriocins of Gram-positive bacteria: an opinion regarding their nature, nomenclature and numbers. pp 33-36. En: Lazdunski, R.J.C. and Pattus, F. (Eds). *Bacteriocins, microcins and lantibiotics*. Springer-Verlag, Heidelberg Germany.

Tagg, J.R., and Macgiver, A.R. 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.* **21:** 943.

Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positiva bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40:** 722-755.

Tamime, A.Y. 1999. Cheese: in the marketplace. En: Robinson, R.K, Batt, C.A., Patel, P.D (Eds). *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, Oxford, U.K. 2000.

Tarelli, T., Carminati, G., and Giraffa, G. 1994. Produccion of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria Ennocua* from dairy Enterococci. *Food Microbiol.* **11:** 234-252.

Thomas, L.B., and Wimpenny, J.W.T. 1996. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62:** 2006-2012.

Thomas, L.V. and Delves-Broughton, J. 2001. New advance in the application of the food preservative nisin. *Res. Adv. Food Sci.* **2:** 11-22.

Thomas, L.V., Clarkson, M.R. and Delves-Broughton, J. 2000. Nisin. pp. 463-524. En: Thomas, L.V., Clarkson, M.R. and Delves-Broughton, J. (Eds). Natural food antimicrobial systems. CRC Press. A.S. Naidu, USA.

Todd, E.C.D. 1983. Foodborne disease in Canada-a 5-year summary. *J. Food Prot.* **46**: 650-657.

Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J. M., Ivanova, I., and Dousset, X. 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *Int. J. Food Microbiol.* **48 (3)**: 167-177.

Todorov, S.D., and Dicks, L.M. 2005. Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. *J. Microbiol.* **43**: 370-374.

Todorov, S.D., and Dicks, L.M. 2006. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. *Microbiol. Res.* **161**: 102-108.

Tomida, M., Suwa, N., Machida, H., Nishimura, A., and Makino, S. 1991. Inhibition of germination of *Bacillus stearothermophilus* spores by sucrose monoalkylates and others surfactants. *J. Japan. Soc. Food Sci. Technol.* **38**: 1044-1049.

Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., and Ike, Y. 1996. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J. Bacteriol.* **178**: 3585-3593.

Tomita, H., Fujimoto, S., Tanimoto, K., and Ike, Y. 1997. Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J. Bacteriol.* **179**: 7843-7855.

Torri Tarelli, G., Carminati, D., and Giraffa, G. 1994. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. *Food Microbiol.* **11**: 243-252.

Trovatelli, L.D., and Schliesser, A. 1987. Identification and significance of enterococci in hard cheese made from raw cow and sheep milk. *Milchwiss.* **42**: 717-719

Turtell, A. and Delves-Broughton, J. 1998. International acceptance of nisin as a food preservative. *Bull. Int. Dairy Federation* **329**: 20-23.

Untermann, F. 1999. Hazard Appraisal (HACCP). The overall concept. pp 982 – 992. En Robinson, R.K, Batt, C.A., Patel, P.D (Eds). Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, Oxford, U.K. 2000.

Van Belkum, M.J., and Stiles, M.E. 2000. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. Nat. Prod. Rep. **17**: 323–335.

Van der Meulen, B., Van der Velde, M. 2006. Modern european food safety law. pp 559-617. En: Safety in the agri-food Cain. Luning, P.A., Devlieghere, F. y Verhe, R. (Eds). Wageningen Publishers. The Netherlands.

Van Garde, S.J., and Woodburn, M.J. 1987. Food discard practices of householders. J. Am. Diet. Assoc. **87**: 322-329.

Van Netten, P., Perales, I., Van de Moosdijk, A., Curtis G.D.W. and Mossel, D.A.A. 1989. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. Int. J. Food Microbiol. **8**: 299-316.

Vedamuthu, E.R., Henderson, J., Marugg, J. and Van Wassear, P. 1992. Bacteriocin from *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. pp. 173-292. Quest International Flavor and Food Ingredient Company, Bridgewater, NJ, USA.

Vega-Mercado H., Góngora-Nieto, M.M., and Barbosa-Cánovas G.V. 2001. Advances in dehydration of foods, J. Food Engineering **49**: 271-289.

Vignolo, G., Fadda, S., de Kairuz, M.N., Ruiz Holgado, A.A. and Oliver, G. 1996. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by Lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL705. Int. J. Food Microbiol. **29**: 397- 402.

Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P., and Coppola, S. 1993. Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. J Food Prot. **74**: 380-387.

Vlaemynck, G., Herman, L., and Coudijzer, K. 1994. Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. **24**: 211-225.

Wan, J., Harmark, K. and Davidson, B.E. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by psicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. J. Appl. Microbiol. **82**: 273-280.

Wigley, R.C. 1999. Starter cultures. Uses in the food industry. pp 2084-2095. En: Robinson, R.K, Batt, C.A., Patel, P.D (Eds). Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, Oxford, U.K. 2000.

Wilbey, R.A. 1999. Heat treatments of foods. Principles of pasteurization. pp 1030-1036. En: Robinson, R.K, Batt, C.A., Patel, P.D (Eds). Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, Oxford, U.K. 2000.

Woods, A., and Krieg, N.R. (Eds.). 1989. Methods for general and molecular bacteriology. p. 634. ASM Press, Washington DC.

Wunderlich, P.F., Braun, L., Fumagalli, I., D'Apuzzo, V., Heim, F., Karly, M., Lodi, R., Politta, G., Vonbank, F., and Ja Zeltner, L. 1989. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *J. Int. Med. Res* **17**: 333-338.

Xanthopoulos, V., Polychroniadou, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., and Tzanetakis, N. 2000. Characteristics of Anevato cheese made from raw or heat-treated goat milk inoculated with a lactic starter. *Leb. Wiss. Technol.* **33**: 483-488.

Yamamoto, Y., Togaza, Y., Shimosaka, M., and Okazaki, M. 2003. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ-11. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** (10): 5746-5753.

Yanagida F, Chen Y, Onda T, Shinohara T. 2005. Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil. *Lett Appl Microbiol.* **40**: 430-435.

Yang, C., Jiang, Y., Huang, K., Zhu, C., and Yin, Y. 2003. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.* **38**: 265-271.

Yang, R. and Ray, B. 1994. Prevalence and biological control of bacteriocin-producing psychrotrophic leuconostocs associated with spoilage of vacuum-packaged processed meats. *J. Food Prot.* **57**: 209-217.

Zárate, V., Belda, F., Pérez, C., and Cardell, E. 1997. Changes in the microbial flora of Tenerife goat's milk cheese during ripening. *Int. Dairy J.* **7**: 635-641.

