



**UNIVERSIDAD SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**FACULTAD DE VETERINARIA DE LUGO**

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**ESTUDIO DE LA MICROBIOTA LACTICA AISLADA DE CARNE  
ENVASADA AL VACIO Y MEDIANTE EL SISTEMA AVANZADO DE  
ENVASADO DARFRESH®**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

Arlindo Samuel Inguane

Lugo, 25 de Octubre de 2014





---

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

ESTUDIO DE LA MICROBIOTA LACTICA AISLADA DE CARNE ENVASADA AL VACIO Y  
MEDIANTE EL SISTEMA AVANZADO DE ENVASADO DARFRESH®

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Arlindo Samuel Inguane**

Bajo la dirección de los Doctores:

Alberto Cepeda Sáez

Carlos Franco Abuín

Maria del Pilar Calo Mata

**Lugo, 2014**

---





Departamento de Química Analítica,  
Nutrición y Bromatología

D. Alberto Cepeda Sáez, catedrático de la Universidad, D. Carlos Franco Abuín, profesor titular de la Universidad y D<sup>a</sup> María del Pilar Calo-Mata, profesora titular de la Universidad, integrantes del Departament ode Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**AUTORIZAN** a D. Arlindo Samuel Inguane a la presentación del Trabajo titulado "Estudio de la microbiota lactica aislada de carne envasada al vacio y mediante el sistema avanzado de envasado Darfresh<sup>®</sup>" realizado bajo su dirección en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y, para que así conste, firma la presente en Lugo, en Octubre de 2014

Fdo. D. Alberto Cepeda Sáez

Fdo. D. Carlos Franco Abuín

Fdo. Maria del Pilar Calo Mata

Fdo. D. Arlindo Samuel Inguane



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar mis sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que con su ayuda durante estos años han hecho posible la realización de este trabajo.

Al **Dr. Alberto Cepeda Sáez** por concederme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral en el Laboratorio de Higiene e Inspección de Alimentos y por el apoyo recibido a lo largo de estos años.

A mi Director, **Dr. Carlos Manuel Franco** por aceptar dirigir este trabajo, que sin un buen seguimiento durante su realización, sobre todo en la fase experimental no sería posible terminar de forma satisfactoria.

A la directora de esta tesis, **Dra. María del Pilar Calo-Mata** por su buen seguimiento a este trabajo, por haber sabido transmitir los conocimientos en el área de biología molecular y por el gran apoyo recibido de forma continuada y que ha hecho posible la realización de esta tese. Gracias Pili!

Agradezco al **Dr. Jorge Barros-Velázquez** por haber sabido mantener la atención incondicional a todo momento durante la realización de este trabajo, tanto en el soporte científico y económico. Gracias Jorge!

A la **Dra. Marta Prado** por enseñarme las técnicas de Biología molecular desde el principio, que poca idea tenía en aquel momento, gracias a ti fue posible hacer experimentos en aquel laboratorio.

A la **Dra. Beatriz** por el apoyo brindado, que de forma directa o indirecta ha contribuido a la realización de este trabajo.

A la **Dra. Cristina Fuente** por haber enseñado a dar primeros pasos en Microbiología, sobre todo a tratar con los hongos. Quiero dar mis sinceros agradecimientos por preocuparse por mi salud al enviarme de inmediato junto a su hermana (Oftalmóloga) para que me observara la apariencia que tenía en un ojo para detectar o descartar posible problema de salud, por ello, muchas gracias Cris, te lo tengo presente!!!

---

A la **Dra. Mónica Guardón** por la amistad brindada, el compañerismo que ha demostrado en todo momento, por animarme a terminar esta tesis y por haber servido de apoyo en mis momentos difíciles.

A la **Dra. Inmaculada C. Fernández No** por animarme moralmente en los momentos más difíciles de mi estancia en el laboratorio: No se me olvida que haya acudido a mi rescate cuando tuve que refugiarme en un curso de mecánica de la Xunta para sobrevivir, por ello muchas gracias a ti y una vez más a Jorge Barroz-Velázquez, gracias también por tu sencillez.

Al **Dr. José Manuel Miranda** por su contribución para hacer posible esta tesis, sobre todo al participar en la corrección de dos artículos científicos titulados: *Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from beef and stored using vacuum packaging and advanced vacuum skin packaging systems* *Caracterización molecular de bacterias ácido-lácticas aisladas a partir de carne de ternera envasada al vacío de modo tradicional y mediante un sistema avanzado* y *Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Beef Stored on Vacuum-Packaged and Advanced Vacuum Skin Packaged System*. También por el apoyo brindado en esta última fase.

A la **Dra. Alicia Mondragón** por la amistad brindada a lo largo de estos años, por portarse bien conmigo y por toda ayuda brindada.

A la **Dra. Carolina Nebot** por haber ayudado a buscar salida a la crítica situación financiera por la que he estado pasando. Gracias a tu orientación he acudido al INEM, donde me asignaron un curso de Mecánica, que de mucho valió para alquiler de habitación. Gracias también por ayudarme a corregir y organizar este trabajo hasta el final, también por el compañerismo demostrado.

A **Carmen** por el apoyo que ha dado en la parte experimental, por estar siempre dispuesta a echar una mano y por portarse tan bien conmigo, por todo ello y demás, gracias!

Al mismo hilo quiero agradecer al Director de Pescamar y cónsul de España **David Troncoso**, por la atención en la tramitación de mi expediente para que fuera posible la obtención de la Beca y por lo tanto el comienzo del doctorado.

Agradezco también a la **Dra. Luisa Arthur**, en calidad de Jefa de Departamento, el haber permitido hacer el postgrado.

---

Quiero de forma muy especial dar mis sinceros agradecimientos a mi gran amigo, **Dr. Ananías Pascoal Augusto**, quien en todo momento ha sabido ser y estar. Ha demostrado ser un amigo en todo momento y durante muchos años, el incansable, del que he recibido todo tipo de apoyo, desde lo económico cuando hiciera falta a lo moral, el que estando yo en Lisboa en misión de servicio, me ha registrado en el concurso para la beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional, ha movido el expediente hasta el final, desde donde empieza la historia de esta Tesis. Debo de destacar que ha tenido desde el principio dificultades de todo tipo para lograr la autorización para sus estudios y no ha importado que fuera a mí quien le tocara la suerte y a él no, por eso y, en voz alta digo: ¡MUCHAS GRACIAS por demostrar ser un verdadero amigo.

Quiero de igual forma, agradecer de manera muy especial a mi muy gran amiga, alguien que de una forma u otra le debo esta tesis por el apoyo que he recibido de forma incondicional, el consuelo, persona a la que, aunque se dice los hombres no lloran, he tenido el valor de soltar las lagrimas ante ella, la valiosa **Dra Estela Juliao Chichava Maússe**, sin palabras, eres grande y, muchas gracias. También aprovecho para agradecer a la familia Maússe por el apoyo que dieron a mí y a mi familia a lo largo de todos estos años

Al **Dr. Fabio Jorge** por facilitar los contactos con los directivos del Laboratorio de Higiene para realizar la Investigación y por ser un buen compañero.

Agradezco a mi familia, a mis padres, por la educación que me dieron, la cultura del sacrificio triunfar y a triunfar pese a las dificultades que se presenten por el camino, la paciencia que han demostrado durante esos años. A mis hermanos todos, os quiero!

Quiero por último, no por orden de importancia, ya que ocupan un lugar primordial en mi vida, agradecer a mis pequeños: **Paulo Arlindo Inguane, Arlindo Junior Inguane y Samuel Arlindo Inguane** por la paciencia que han demostrado y que son los grandes merecedores de este esfuerzo y que tengo la esperanza de que para el mañana sigan el Ejemplo. ¡Que Dios os Bendiga! Aprovecho también para agradecer a su madre, Sra. **Lea Juliao Maússe**, que ha servido de ejemplo como madre, la mejor madre que unos niños pueden tener, por ello, muchas gracias.

A **Veneranda Angue Obiang Mondomo** por haber hecho pasar momentos agradables durante estos años mientras se desarrollaba esta Tesis y por su buena actitud

---

Agradezco a **Javier y Aurita**, propietarios del Bar “Los Tres Pies” por permitirme estar unas horas en su establecimiento, como forma de tener ingresos y por pagarme la matrícula del año 2010-2011.

A **Rosa** y su familia por ser tan amables, por darme trabajitos que gracias a ello tuve con que comer en algún momento del desarrollo de esta Tesis y por animarme a no dejarla. También por ofrecerse a pagarme la matrícula correspondiente al año 2011-2012, por todo ello, gracias!

A **Cristina y Manuel** (el gran Maestro) por ser tan maravillosos, simpáticos y cariñosos conmigo. También por apoyarme a seguir con esta Tesis. Cris, no se me olvidará el que hayas tomado con seriedad el tema de mi residencia, broncas por el pasaporte, etc. Por todo ello, muchas gracias!

A **Paquita** por haber permitido trabajar con ella, generar algún ingreso para afrontar esta Tesis.

A **María da Coruña** y Familia por ser amables, aconsejarme incondicionalmente.

A **Don José** (el Cura) por ser tan amable conmigo y por dar ideas para seguir adelante.



## INDICE

<b>INDICE.....</b>	<b>I</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>III</b>
<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>V</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. La carne .....	1
1.1.1. Definición de carne a efectos sanitarios .....	1
1.1.2. Definición comercial de carne.....	1
1.1.3. Composición e importancia nutritiva de la carne .....	1
1.1.4. Microbiología de la carne fresca .....	2
1.1.5. Conservación de la carne.....	4
1.2. Las bacterias lácticas .....	11
1.2.1. Características generales de las bacterias lácticas .....	12
1.2.2. Clasificación de las bacterias lácticas.....	13
1.2.3. Cultivos bioprotectores.....	14
1.3. Probióticos .....	19
1.3.1. Las Bacterias lácticas como probióticos.....	21
1.3.2. Mecanismo de acción de los probióticos.....	21
1.3.3. Protección probiótica contra organismos patógenos .....	22
1.3.4. Inmunomodulación ejercida por los probióticos .....	24
1.4. Características tecnológicas de las bacterias lácticas .....	24
1.4.1. Proteólisis .....	25
1.4.2. Lipólisis .....	26
1.5. Aspectos de seguridad de las bacterias lácticas.....	26
1.5.1. Producción de aminas biógenas.....	26
1.6. Las bacteriocinas. ....	28
1.6.1. Definición y clasificación.....	28
1.6.2. Espectro de actividad.....	30
1.6.3. Modo de acción .....	31
1.6.4. La Enterocina P, una bacteriocina <i>sec</i> -dependiente de la subclase IIa.....	34
1.6.5. Bacteriocinas de la subclase IIa.....	35
1.6.6. Características estructurales .....	35
1.6.7. Métodos de detección de las Bacteriocinas .....	37
1.7. Métodos rápidos de identificación de microorganismos .....	39
1.7.1. Métodos basados en reacciones bioquímicas y enzimáticas. ....	39
1.7.2. Métodos basados en reacciones antígeno-anticuerpo.....	40

---

1.7.3. Métodos basados en los ácidos nucleicos.....	41
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>50</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
3.1. Análisis de los polimorfismos de un solo nucleótido en el gen estructural de la enterocina P en cepas de <i>Enterococcus faecium</i> aisladas de alimentos de origen animal no fermentados .....	51
3.2. Caracterización molecular y estudio probiótico de cepas de <i>Enterococcus faecium</i> productoras de bacteriocinas aisladas de alimentos de origen animal no fermentados...	62
3.3. Caracterización molecular de bacterias ácido-lácticas aisladas a partir de carne de ternera envasada al vacío de modo tradicional y mediante un sistema avanzado .....	75
3.4. Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Beef Stored on Vacuum-Packaged and Advanced Vacuum Skin Packaged System .....	88
<b>DISCUSIÓN GLOBAL.....</b>	<b>95</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>100</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>101</b>



## INDICE DE FIGURAS

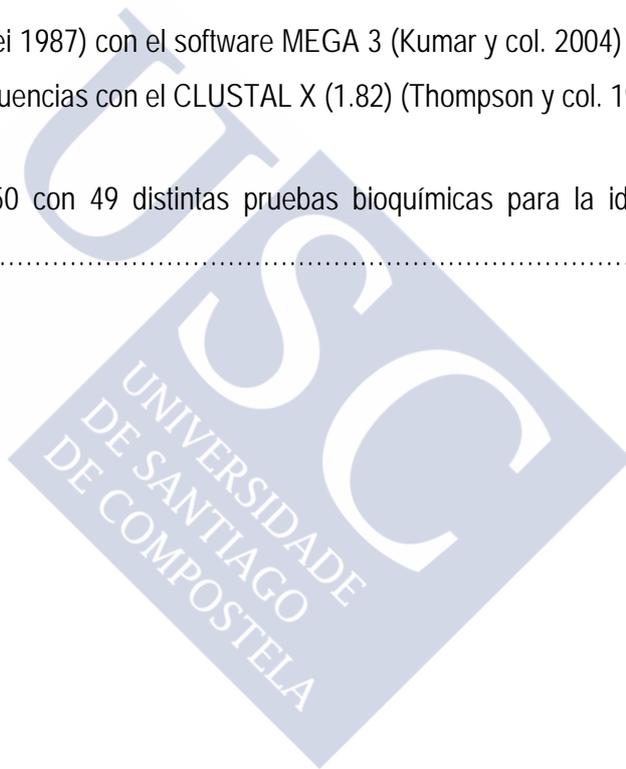
**Figura 1.** La reuterina como metabolito intermedio en la ruta de degradación del glicero .....18

**Figura 2.** Representación del papel beneficioso de las bacterias probióticas en el tracto intestinal de mamíferos.....23

**Figura 3.** Mecanismo de acción de bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas.....33

**Figura 4.** Relación filogenética entre bacteriocinas de la clase IIa obtenida por el método neighbor-joining (Saitou y Nei 1987) con el software MEGA 3 (Kumar y col. 2004) después de un alineamiento múltiple de secuencias con el CLUSTAL X (1.82) (Thompson y col. 1994). .....38

**Figura 5.** Galería API CH50 con 49 distintas pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias lácticas.....40





## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular producidos por bacterias lácticas.....	<b>16</b>
<b>Tabla 2.</b> Criterios para el uso de probióticos en humanos.....	<b>20</b>
<b>Tabla 3.</b> Secuencia aminoacídica de bacteriocinas de la subclase IIa producidas por bacterias lácticas.....	<b>35</b>
<b>Tabla 4:</b> Métodos moleculares usados en la discriminación de especies.....	<b>48</b>





---

## ABREVIATURAS

A	Adenina
AB	Aminas biógenas.
ABC	Del inglés " <i>Adenosin triphosphate Binding Cassette</i> )
ADT	Prueba de difusión en agar (del inglés " <i>Agar well Difussion Test</i> ")
AFLP	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ANOVA	Análisis de Varianza
16S-ARDRA	Análisis de restricción del ADN ribosómico 16S amplificado / Amplified 16S rDNA Restriction Analysis
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATP	Del inglés <i>Adenosine Triphosphate</i>
AU	Unidades arbitrarias
AVSP	Sistema avanzado de envasado al vacío ( <i>Advanced skin packaging system</i> )
$A_w$	Actividad de agua.
B.	<i>Bacillus</i>
B.	Bifidobacterias
BAL	Bacterias ácidas lácticas
BHI	Infusión cerebro-corazón (del inglés <i>Brain Heart Infusion</i> - medio de cultivo)
Bp	Pares de bases ( <i>Base pair</i> )
BSH	Hidrolisis de sales biliares "del ingles <i>bile salt hydrolase</i> "
C	Citocina
$Ca^{2+}$	Calcio
CCUG	Colección de Cultivos de la Universidad de Goteborg
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
Cfu	Unidades formadoras de colonia
D	Tempo de reducción decimal
DHA	Deshidroalanina
DHB	Deshidrobutirina
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E.	<i>Enterococcus</i>
ELISA	Del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Ent.	Enterocinas

---

---

EVA	Copolímero etilenoacetato de vinilo
EVOH	Etileno-alcohol vinílico
FDA	Food and Drug Administration
G	Guanina
G+C	Contenido de guanina y citosina
GCP-1	Glucagon como Péptido-1
GIT	Tracto gastrointestinal
GRAS	Del inglés <i>Generally Recognized as Safe</i>
HC	Histidina Descarboxilasa
<i>hdc</i>	Gen histidina descarboxilasa / Histidine Decarboxylase Gene
HDPE	Polietileno de alta densidad
IgA	Inmunoglobulina
ILSI	Del inglés "Research Foundation, Risk Science Institute"
IU	Unidades internacionales "del inglés <i>international units</i> "
Kb	Kilobases
kDa	kg dalton
Knt	Abreviatura empleada para expresar la longitud (numero de nucleótidos), en el caso de una molécula de ADN/ARN monocatenario
L.	<i>Lactobacillus</i>
L.	<i>Lactococcus</i>
L.	<i>Listeria</i>
LAB	Bacterias el ácido láctico ( <i>lactic acid bacteria</i> )
LDPE	Polietileno lineal de baja densidad
LHICA	Laboratorio de Higiene y Control de Alimentos
Ltd	Limitada.
MAO	Mono-aminoxidasa
MPA	Del inglés " <i>Microtiter Plate Assay</i> "
MRS	Dde Man, Rogosa y Sharpe (medio de cultivo)
MW	Del inglés "molecular weight"
NADH	Forma reducida de nicotinamida adenina dinucleotido
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCCLS	National committee of clinical Laboratory Standards
NCFB	National Collection of Dairy Organisms
NCTC	Colección Nacional de Cultivos Tipo

---

---

ND	No determinado/a
ng	Nanogramos
P	Probabilidad
PA.	Poliamida
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Bufer fosfato salino "del ingles phosphate buffer saline"
PCA	Medio de cultivo para recuentos "del ingles Plate count Agar"
PCR	Reacción en la cadena de polimerasa (del ingles <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PE	Polietileno
PET	Polietilen-tereftalato
PETG	Poliéster glicol modificado
PFGE	Macrorrestricción de ADN y Electroforesis en campo pulsante
pGr41	Proteína G acoplado al receptor 41
PMF	Fuerza protón motriz (del inglés " <i>Proton Motive Force</i> ")
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVC	Policloruro de vinilo
PVDC	Policloruro de vinilideno
R	Regresión
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimorfico ( <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> )
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico (del inglés " <i>Ribosomic ribonucleic acid</i> ")
rev min <sup>-1</sup>	Revoluciones por minuto
S	Staphilococcus
SDs	Desviación estándar
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida "del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> "
SNP	Polimorfismo en un nucleótido ( <i>single nucleotide Polymorphism</i> )
Spp	Especies
T	Timidina.
TAE	"del inglés Tris acetate EDTA"
TGI	Tracto gastrointestinal
TLR	"Del inglés Toll-like receptor
TSA	Agar Triptona de soja "del ingles Trypticase Soy Agar"

---

TX-100	Tritón X-100
UA	Unidades arbitrarias
UB	Unidades de bacteriocina
Ufc/g	Unidades formadoras de colonia por gramo
UPGMA	"Del inglés <i>unweighted pair group method with arithmetic averages</i> "
USA	Estados Unidos de America " <i>United States of America</i> "
UV	Ultravioleta
VSP	Del inglés <i>vacuum skin packaging</i>



# CAPITULO 1

## INTRODUCCION





# INTRODUCCIÓN

## 1.1. La carne

### 1.1.1. Definición de carne a efectos sanitarios

El término “carne” tiene varios usos y significados según el contexto, sin embargo, teniendo en cuenta las disposiciones sobre inspección de carnes, se considera a todas las porciones de la canal que sirven para consumo humano y los alimentos elaborados a partir de las mismas (Prändl, 1994).

“Carne”, se puede definir como el músculo de los animales usado como alimento por los seres humanos. Esta definición se limita a unas pocas decenas de cerca de las 3000 especies de mamíferos, incluyendo además de la musculatura, órganos como el hígado, los riñones, el cerebro y otros tejidos comestibles (Lawrie, 1998). Para los efectos sanitarios de la carne este adquiere pues un sentido genérico en el que se incluyen todas las partes de los animales de abasto sanos, sacrificados en condiciones higiénicas y que sirven de alimento para el hombre, sin embargo en ocasiones se limita solamente a la musculatura esquelética.

### 1.1.2. Definición comercial de carne

El RD 1324/2002, transposición de una Directiva con el objeto de armonización comunitaria a efectos de etiquetado y que entró en vigor en julio de 2003 define el término carne como: “Los músculos del esqueleto, (diafragma y maseteros incluidos, pero no así el corazón, la lengua, los músculos de la cabeza, diferentes de los maseteros, del carpo, del tarso y de la cola), de las especies de mamíferos y de aves (reconocidas como aptas para el consumo humano con los tejidos naturalmente incluidos o adheridos a ellos).

### 1.1.3. Composición e importancia nutritiva de la carne

La carne es una fuente fundamental para suministro de proteínas. Su composición varía según la especie y las distintas partes del animal de donde procede la carne, pero en general, los valores medios para la composición bruta de la fracción comestible, o sea, libre de grasa subcutánea de la carne fresca son: proteína (16-22 %), grasa (1,5-13 %), humedad (65-80 %), hidratos de carbono (0.5-1.5 %) y 1% de cenizas. La eliminación de pequeñas cantidades de grasa del músculo magro tiene como consecuencia un incremento de los niveles de proteína y humedad, además, un importante descenso en las cantidades de grasa y energía. Un músculo magro

---

cuidadosamente seleccionado y del que se ha eliminado la grasa de cobertura puede tener tan sólo un 3-5% de grasa. La carne comercial no posee prácticamente carbohidratos (menos del 1%) y tampoco contiene fibra (Price y Schweigert, 1994).

En general, la carne y sus derivados son de alta digestibilidad 95-100%, mientras que la de los alimentos vegetales es tan sólo el 65-75% (Hopkins, 1981). El contenido lipídico, vitamínico y de minerales es notable, aunque el mayor interés en cuanto a la composición de oligoelementos es como fuente de hierro, disponible en mayor proporción que la que se puede encontrar en otros alimentos como las leguminosas y los cereales. El hemo-hierro de la carne presenta una excelente absorción y, además, incrementa la absorción del hierro procedente de otras fuentes alimenticias (Godber, 1994).

Los aminoácidos de la carne en general son resistentes al tratamiento térmico durante los procesos de cocinado. Sin embargo, durante el escaldado de pequeños trozos de músculo fresco, se pueden perder ciertas cantidades de lisina, metionina y triptófano (Bodwell y Anderson, 1986). Las metodologías comúnmente empleadas en la producción comercial de carnes curadas no afectan al valor nutritivo de la proteína de la carne. El enlatado tiende a reducir la digestibilidad de la carne y el valor nutritivo de la proteína de la carne se ve también ligeramente afectado. Estas modificaciones están correlacionadas con la intensidad del tratamiento térmico a que es sometida la lata durante el proceso de esterilización. Los métodos de congelación rápida, liofilización y radiación ionizante no producen modificaciones significativas en el valor biológico de la proteína cárnica (Bodwell y Anderson, 1986; Lawrie & Ledward, 2006); sin embargo el proceso de deshidratación afecta a la digestibilidad y el valor nutritivo, debido a cambios oxidativos, enzimáticos, la formación de cristales de hielo y pequeños cambios degradativos que pueden seguir ocurriendo durante el almacenamiento (Zhou y col., 2010).

#### **1.1.4. Microbiología de la carne fresca**

A pesar de que el músculo como tal, es prácticamente estéril, la contaminación de productos cárnicos con bacterias es inevitable durante el procesado de la materia prima (Labadie, 1999). Esta contaminación es consecuencia de una amplia variedad de manipulaciones a la que se somete durante el procesado así como de fuentes del propio animal (Boerema y col., 2003; Gill y Landers, 2004; Gill y McGinnis, 2000), por lo tanto, se puede considerar que las características de la microbiota que se desarrolla en la carne y sus productos son el resultado de las condiciones ambientales predominantes que pueden favorecer al crecimiento de un tipo de microbiota inicialmente presente en la materia prima o introducida por la contaminación cruzada (Barkocy-Gallagher y col., 2003; Fegan y col., 2004). En general, el conjunto de factores intrínsecos y

---

extrínsecos se imponen en la selección microbiana, de forma que pueden determinar la cantidad y el tipo de microorganismos presentes en el producto final. Los factores intrínsecos son predominantemente de naturaleza química/bioquímica Tales como: la disponibilidad de nutrientes y su concentración, pH, el potencial redox, la  $a_w$ , la estructura de la carne, mientras los factores extrínsecos están relacionados con las condiciones medioambientales de procesamiento que incluyen: equipos, utensilios, operarios, entre muchos otros y el almacenamiento (Dainty y col., 1983, 1992; Fung y col., 2008; Koutsoumanis y col., 2006; Labadie, 1999; Nychas y col., 2008). En el almacenamiento podemos encontrar parámetros importantes como la temperatura y la disponibilidad de oxígeno, que a menudo son manipulados para ampliar la vida útil de la carne y sus productos. La higiene durante el sacrificio y la manipulación de las piezas, junto con una adecuada refrigeración tiene una importancia crucial en la calidad y seguridad de la carne. Las bajas temperaturas empleadas para el enfriamiento inmediato de las canales, representan la primera barrera para frenar el desarrollo bacteriano (Chang y col., 2003; Beaufort, y col., 2009). Además, la microbiota de las canales es sumamente dependiente de las condiciones ambientales en las cuales los animales fueron criados, transportados, sacrificados y procesados (Fike y Spire, 2006). Las condiciones durante el sacrificio, la extensión de contaminación durante el mismo y la relación tiempo-temperatura de almacenamiento son factores importantes que van a determinar la calidad microbiológica de la carne (Looper y col., 2006; Aymerich y col., 2008; Zhou y col., 2010). Recientemente, la introducción de innovaciones en la tecnología de la industria cárnica para reducir la contaminación y desarrollo de agentes patógenos y alterantes del producto, han recibido una especial atención y han demostrado ser eficaces (Ghafir y col., 2005; Rault y col. 2012). Después de la preparación de las canales, la microbiota en ellas presente comprende una mezcla de mesófilos y psicrótrofos, que será seleccionada gradualmente durante el proceso de refrigeración de la carne. En estas condiciones, el crecimiento de mesófilos es lento, mientras la microbiota psicrótrofa se va a desarrollar con normalidad. Debido a que la mayor parte de los patógenos que pueden estar presentes son mesófilos, la carne obtenida en buenas condiciones de higiene no representará ningún riesgo para la salud del consumidor. Sin embargo, *L. monocytogenes* ha seguido levantando preocupaciones en la seguridad alimentaria durante más de dos décadas, sobre todo en lo que concierne a productos "listo para consumo". La listeriosis se sitúa entre las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia en la salud pública, debido al impacto social y económico que tiene por la severidad de su cuadro clínico y altos índices de mortalidad (DFBMD, 2008; Medline Plus, 2010), por todo el mundo brotes de origen alimentarlo en los cuales los productos cárnicos fueron implicados han estado ocurriendo durante las dos décadas pasadas (Mead y col., 2005; Okutani y col., 2004; Vaillant y col., 2005). Debido a su carácter ubicuo, *L.*

---

*monocytogenes* puede crecer en rangos de temperaturas de entre 1 a 45 °C, a pH 4.6-9.6, en presencia de altas concentraciones de sal, y puede sobrevivir al tratamiento que se someten los equipamientos y otros utensilios incluidos los de acero inoxidable, mediante la formación de biofilms, que podrían ser una potencial fuente de contaminación (Autio y col., 1999; Keskinen y col. 2008). Este hecho pone de relevancia los biofilm como un factor de importancia en la contaminación cruzada. Un alto porcentaje de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* (el 73 % y el 75 %, respectivamente) han sido detectados en carne de ternera congelada (Hassan y col, 2001). Aunque se han desarrollado varias estrategias de evaluación de riesgo para controlar *L. monocytogenes* en productos alimenticios (Chen y col., 2003; Salvat y Fravalo, 2004; ILSI Research Foundation; Risk Science Institute, 2005), los datos sugieren que este patógeno difícilmente puede ser completamente eliminado del ambiente de procesamiento y de determinados productos alimenticios (Castellano y col., 2009).

Una vez sacrificados los animales y preparadas las canales, el desarrollo microbiano dependerá de las condiciones de almacenamiento, durante el cual, los factores del ambiente de almacenaje como las temperaturas, atmósfera gaseosa y el pH de la carne, seleccionarán el crecimiento de ciertas bacterias.

El almacenamiento de la carne en frío disminuye el crecimiento bacteriano, sólo una pequeña cantidad (10 %) de las bacterias inicialmente presentes tendrán la capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración (Sun y Holley, 2012). La reducción de oxígeno usada en envasado al vacío o atmósferas modificadas reduce drásticamente la presencia de *Pseudomonas* mientras otros grupos de la microbiota bacteriana será gradualmente seleccionada hacia organismos tolerantes al CO<sub>2</sub>, lo que podrá contribuir a evitar el rápido deterioro, extensión de la vida útil y preservación de la calidad del producto (Brody y col., 2008). En estas condiciones, los microorganismos dominantes resultarán ser *Brochothrix thermosphacta*, bacterias ácido lácticas, principalmente los *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium* (Fontana y col., 2006; Jones, 2004).

#### 1.1.5. Conservación de la carne

A diferencia de la gran mayoría de las industrias modernas, la industria de elaboración de la carne y subproductos asienta sus bases en los tiempos prehistóricos. Desde aquel entonces el hombre ha tenido que afrontar grandes problemas para evitar el rápido deterioro de los alimentos frescos, por lo que su conservación siempre ha constituido una preocupación, razón por la que ya en la más antigua literatura aparecen referencias que indican que ciertas prácticas de conservación de la carne eran de conocimiento común. La desecación de la carne era empleada por los aborígenes de América; las técnicas de ahumado y salazón eran empleadas ya en el año 1000 a.C.

---

Básicamente el objetivo esencial de las técnicas de conservación es crear barreras que permitan un cierto control sobre las reacciones químicas, enzimáticas (proteínas activas) de los propios alimentos y la actividad de los microorganismos responsables del deterioro de los alimentos, logrando de esta forma la estabilidad de los productos alimenticios durante su almacenamiento y comercialización. Estas barreras se pueden lograr de manera aislada o mediante la combinación de factores de conservación, con el consiguiente retraso en la degradación de los componentes de los alimentos e inhibir el crecimiento de los microorganismos patógenos, lo cual permitirá mantener las características sensoriales y condiciones de seguridad de los alimentos.

En términos generales dos tipos de procedimientos de conservación son comúnmente empleados: los métodos físicos (como el calor, el frío, el empleo de radiaciones ionizantes y el envasado) y químicos (aditivos), es también frecuente la combinación de ambos métodos.

La refrigeración es el método de conservación más empleado para garantizar la seguridad y extensión de la vida útil de los alimentos. La aplicación de esta forma de conservación tiene la ventaja de no producir modificaciones en la calidad de los productos alimenticios. Así, no se producen alteraciones importantes en el color, el sabor o la consistencia, además de permitir un periodo de conservación prolongado (Voges y col., 2007; Beaufort y col., 2009). Las bajas temperaturas constituyen la primera barrera que los microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos tienen que superar para su crecimiento.

Para garantizar que la refrigeración sea efectiva, es necesario en primer lugar que la carne a refrigerar sea de buena calidad, así como la aplicación del frío inmediatamente después del sacrificio y despiece. Además hay que asegurar el descenso rápido de las temperaturas y el mantenimiento de las mismas. Otros aspectos importantes a tener en cuenta además de lograr un descenso rápido son las siguientes:

- *Temperatura:* Las temperaturas de refrigeración a aplicar tendrán que ver con el tipo de alimento, para los tejidos animales la refrigeración ha de realizarse a bajas temperaturas, de entre -1 a 7°C.
- *Circulación y purificación del aire.* La circulación del aire debe ser adecuada para mantener una temperatura necesaria e uniforme en todo el recinto de almacenamiento. La purificación es importante para eliminar compuestos aromáticos liberados por otros alimentos almacenados conjuntamente con la carne y que podrían ser absorbidos por la misma.

#### **1.1.5.1. Envasado de la carne fresca**

Debido al cambio en los hábitos de los consumidores en los últimos años que demandan productos frescos y que la globalización de los mercados implica a su vez tener que recorrer

---

grandes distancias desde las zonas de producción hasta el consumidor final, esto añadido al hecho de que la distribución de la carne exige una amplia manipulación de dicho alimento fresco, el empleo de un envase protector conjuntamente con la refrigeración va a permitir mantener la calidad y frescura de la carne por un periodo prolongado, denominándose dicho periodo "vida útil" (Aymerich y col., 2008). Además el envase ejerce un papel fundamental como soporte del etiquetado.

Hay varios factores a mencionar que pueden afectar la vida útil de los productos cárnicos y que hay que tener en cuenta a la hora de proceder al envasado de la carne. Estos son los siguientes:

1 – *Pérdida o ganancia de humedad*: La pérdida puede provocar disminución del sabor. La ganancia puede facilitar el desarrollo de agentes microbianos en la superficie. Para evitar estos inconvenientes se han creado envases impermeables al vapor de agua y el desarrollo de técnicas como el envasado al vacío.

2 – *Desarrollo de los agentes microbianos*: este factor está directamente relacionado con la vida útil de los productos cárnicos. Para la vida útil de las carnes es muy importante la carga inicial, la atmósfera interior del envase y la temperatura de almacenamiento. Los microorganismos psicrotrofos aerobios son generalmente los responsables de la alteración de las carnes almacenadas en refrigeración (Ercolini y col., 2009), por lo que el uso de un envase impermeable al oxígeno y envasado al vacío resulta importante para inhibir el crecimiento de estos microorganismos responsables del deterioro (Skandamis y Nychas, 2002; Cornforth y Hunt, 2008).

3 – *Color*: es un factor importante desde el punto de vista comercial, ya que en el mercado la selección del producto por los consumidores obedece al aspecto de éste que viene dado fundamentalmente por el color que presenta puesto que el consumidor lo relaciona directamente con la frescura (Cornforth y Hunt, 2008). Este criterio no se corresponde con la realidad ya que el uso de material impermeable al oxígeno, hace que la oximioglobina, responsable del color rojo brillante, se transforme en otras formas menos coloreadas de dicho pigmento, adquiriendo tonalidades pardas o púrpuras, menos apetecibles para el consumidor pero no indicativas de un menor grado de frescura. Este inconveniente se ha subsanado con la introducción en el sistema de envasado de películas permeables al oxígeno (Zhou y col., 2010).

Existe una diversidad de materiales usados para el envasado de productos cárnicos. Por lo general el material de envasado no es único, si no que se emplea la combinación de diversos tipos de láminas, formando un material compuesto que conjuga las propiedades que el producto a envasar requiere para una mejor conservación del mismo. La selección de los componentes de un envase multilaminar va a depender de las propiedades que se quieran para el producto final (Lee y

---

col., 2008). Hay que tener en cuenta la permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua, así como las características de dureza, estabilidad, facilidad para la impresión y sellado, así como la facilidad en su procesamiento, necesidades del mercado y, sobretodo, el coste (Sebranek y Houser, 2006). Los materiales flexibles del envasado se agrupan teniendo en cuenta la función que desempeñan dentro de la estructura multicapa.

Un ejemplo de materiales de envasado flexible son las bolsas

Son envases preformados, con lado abierto por el que se introduce el producto. Pueden hacerse con una estructura multicapa no retráctil en la parte inferior o bien ser una película con forma cilíndrica y termorretráctil. Permiten controlar el exudado siempre y cuando se consiga evitar la presencia de arrugas (Brody, 1996). Suelen usarse para envasar productos de forma irregular o loncheada.

#### **1.1.5.2. Sistemas de envasado**

El envasado juega un papel crucial en la conservación de los alimentos por su papel en la inhibición del deterioro químico y microbiológico durante el procesado y almacenamiento (Rodgers, 2007, Chen y Xiong, 2008; Zhou y col., 2010). La elección de un determinado sistema de envasado obedece fundamentalmente a la naturaleza del producto, la cantidad a producir, la necesidad de un equipo versátil que permita el envasado de diferentes productos, su coste y las necesidades específicas del mercado (demanda). La naturaleza del producto es de extrema importancia porque si el producto a envasar es de bajo contenido graso y alto grado de humedad se debe de inhibir especialmente el crecimiento de los microorganismos. En cambio, si el producto es de alto contenido graso y de una baja actividad de agua, lo más importante es la protección contra la oxidación. Al envasar la carne para la venta directamente al consumidor se tiene en cuenta la permeabilidad al oxígeno, de manera que garantice que esta llegue al consumidor con su color brillante característico, que es el demandado por el consumidor (Han, 2005; Duizer y col., 2009).

Los sistemas de envasado se clasifican en función del material, del proceso de elaboración del envase, y del método de eliminación de oxígeno para alcanzar el vacío. Así, algunos de los sistemas de envasado más interesantes son: envasado al vacío, en atmósfera modificada y Sistema *Darfresh*.

#### **1.1.5.3. Envasado al vacío**

Es una técnica bastante empleada, básicamente consiste en eliminar aire del envase y en consecuencia la reducción de oxígeno del envase, lo que minimiza el deterioro causado por las

---

reacciones oxidativas, además de producir una reducción drástica de la microbiota aerobia alterante, permitiendo de esta manera prolongar la vida útil del producto (Zhou y col., 2010).

Durante el envasado al vacío el oxígeno va disminuyendo gradualmente, mientras que el CO<sub>2</sub>, ácido láctico por glucólisis y otros productos metabólicos se van acumulando. En estos procesos intervienen además de los microorganismos los procesos enzimáticos de los tejidos. Estas modificaciones harán que disminuya el perfil microbiano, disminuyendo el crecimiento y multiplicación de los microorganismos como *Pseudomonas*, *Brochothrix thermosphacta* y Enterobacterias, en un proceso selectivo que favorece el incremento de la microbiota bacteriana Gram-positiva tolerante al ácido láctico y al CO<sub>2</sub>. Sobre estas condiciones, los microorganismos dominantes serán las bacterias ácido lácticas, destacándose los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium* (Castellano y col., 2008; Fontana y col., 2006; Jones, 2004).

La carne envasada al vacío se caracteriza por adquirir un color púrpura, lo cual no se dará importancia ya que una vez que se abre el envase y entra en contacto con el oxígeno atmosférico, recupera el color rojo característico de la carne fresca preferido por los consumidores (Taylor, 1985).

Resumiendo, se puede plantear que en las condiciones de almacenamiento en vacío, o sea, en anaerobiosis, la microbiota dominante en carne fresca es la microbiota ácido láctica en general (Sakala y col., 2002), que a bajas temperaturas pueden superar a sus competidores (Brody, 1996). En carne envasada al vacío y almacenada entre 0 y 4,2 °C, el crecimiento de microorganismos aerobios es escaso, mientras el crecimiento de los *Lactobacillus* es favorecido, interfiriendo éstos además en el crecimiento de las bacterias aerobias.

#### 1.1.5.4. Sistema de envasado en atmósferas modificadas

Este sistema de envasado constituye una mejora de la tecnología de envasado al vacío implicando la eliminación del aire contenido en el envase, seguida de la inyección de un gas o mezcla de ellos, lográndose de esta forma el envasado al vacío con atmósfera controlada y modificada, lo cual desfavorece marcadamente el desarrollo de los microorganismos (García-Iglesias y col., 2006; Gobantes y Gómez, 2007). En el envasado en atmósfera modificada el gas de relleno empleado puede ser el nitrógeno (78%), que es un gas inerte, el oxígeno (20.99%), argón (0.94%), aunque también se puede usar un gas más reactivo como es el caso del CO<sub>2</sub> (0.03%) (McMillin, 2008). El CO<sub>2</sub> reacciona con la humedad de la superficie de la carne dando lugar a ácido carbónico, que inhibe algunos microorganismos. Algunas bacterias psicrótrofas alterantes de las carnes, como es el caso de *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, son sensibles al CO<sub>2</sub>. Sin embargo las levaduras y las bacterias ácido lácticas son capaces de sobrevivir en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> y han

sido la microbiota dominante, ejerciendo una función protectora y aumentando así la seguridad en los alimentos almacenados en estas condiciones (Stiles y col., 1996; Matarangas y col., 2003). El emplear altas concentraciones de O<sub>2</sub> combinado con el CO<sub>2</sub> en el envasado de la carne fresca, permite mantener el color rojo brillante característico de la carne, mientras que el CO<sub>2</sub> interfiere en el crecimiento de los microorganismos aerobios (Luño y col., 2000; Belcher, 2006; Leo y Toldrá, 2006; Zhou y col., 2010).

#### 1.1.5.5. Materiales de envasado

Los materiales más empleados para la fabricación, tanto de bolsas como *films*, son: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliamida (PA), poliestireno (PS), policloruro de vinilo (PVC), policloruro de vinilideno (PVDC), copolímero etilenoacetato de vinilo (EVA), polietileno ionómeros y combinación de ellos para un aprovechamiento de cada una de las propiedades individuales (Gómez y col., 2001).

El polietileno (PE) se puede clasificar, de acuerdo a su densidad, en polietileno de baja densidad (LDPE), lineal de baja densidad (LDPE) y de alta densidad (HDPE). La diferencia principal con respecto al LDPE radica en su mayor resistencia, rigidez y la buena integridad de sellado en caliente. Los principales inconvenientes en relación al LDPE son: requiere una mayor temperatura de soldadura, menor brillo y transparencia, mayor dificultad para incorporar aditivos y más costoso. Por último, el HDPE que comparado con el LDPE, es más consistente, más rígido, muy resistente a los impactos, al frotamiento y al desgaste. Su principal ventaja frente a los otros PE es una mayor barrera a la humedad y a los gases. El polipropileno (PP) es un polímero de propileno que habitualmente se presenta de forma lineal y con estructuras semicristalinas. Su principal propiedad es una alta resistencia térmica, siendo posible su esterilización por calor (121-135 °C), aunque para efectuar tratamientos a 135 °C es recomendable emplear homopolímeros con un punto de fusión de 145 °C.

Las poliamidas se designan por una o varias cifras (PA-6, PA-6,6). Una sola cifra corresponde a PA obtenidas a partir de una molécula con un grupo ácido y otro amina. Dicha cifra indica el número de átomos de carbono del monómero empleado. Dos cifras separadas por una coma, son PA obtenidas por policondensación de un diácido y una diamina e indican el número de átomos de carbono del ácido y de la amina, respectivamente.

El poliestireno (PS) se obtiene por polimerización del estireno (vinilbenceno) resultando un polímero amorfo.

El Policloruro de vinilo (PVC) se obtiene por polimerización del cloruro de vinilo, dando como resultado un material muy rígido, por lo que generalmente se formula con plastificantes. Este

---

presenta buenas propiedades ópticas, es termoformable y termosellable. El cloruro de vinilo se puede copolimerizar con cloruro de vinilideno para dar el policloruro de vinilideno (PVDC), que junto con plastificantes se utiliza en la fabricación de envases. Su principal desventaja es su elevada cristalinidad (rigidez y fragilidad) y las dificultades para su procesado por su baja resistencia térmica (punto de fusión próximo a su temperatura de descomposición).

El copolímero de etil-vinil-acetato (EVA) se obtiene por copolimerización de etileno y acetato de vinilo (VA). Sus propiedades dependen fundamentalmente del peso molecular del polímero y del contenido de acetato de vinilo. Se emplea como sustituto del LDPE cuando se requieren características especiales de adaptabilidad y soldabilidad. En porcentajes bajos de VA (2-5%), se utiliza en envases para productos congelados y para películas retráctiles o estirables. Por hidrólisis del grupo acetyl se obtiene el copolímero etileno-alcohol vinílico (EVOH), el cual es transparente y muy duro siendo una alta barrera al O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, en condiciones de humedad baja. Por esta razón, se emplea en la coextrusión, nunca siendo una de las caras externas. Para evitar el contacto con la humedad, hecho que puede afectar a su permeabilidad, se lamina en ambas caras con materiales resistentes al agua, como PP o PE.

El polietileno ionómero se trata de un copolímero de etileno y ácido acrílico, neutralizado en todo o en parte con sales de sodio y zinc, donde intervienen también enlaces de carácter iónico. Sus propiedades son similares al LDPE, pero mejoradas. Su principal uso es en coextrusiones y laminados complejos en los que se requiere gran poder de adhesión y un termosellado efectivo, por ejemplo, envases para productos pulverulentos y para productos grasos o con salsas, ya que es capaz de termosoldar a través de la suciedad.

Por último, el polietileno-tereftalato (PET) es el poliéster más difundido dentro de los materiales de envase y se emplea en la fabricación de complejos obtenidos por extrusión plana y posterior biorientación. También es posible encontrar copoliésteres por modificaciones en sus unidades estructurales, aunque siempre utilizando como base el PET. Estas modificaciones aportan una importante disminución de la cristalinidad del material por lo que se mejoran sus propiedades mecánicas. El más empleado es el PETG (poliéster glicol modificado) en el que un porcentaje de glicol se sustituye por ciclohexil-demetanoglicol. Sus propiedades pueden ser mejoradas durante la fabricación mediante procesos de biorientación.

#### **1.1.5.6. Nuevo método de envasado de carne fresca refrigerada: el sistema *Darfresh*.**

El método "Darfresh" (Cryovac)<sup>®</sup>, conjuga ventajas del sistema de envasado a vacío tradicional con la particularidad de realizar un tratamiento térmico superficial de la carne a envasar, aspecto no considerado hasta muy recientemente, dicho tratamiento térmico superficial es

---

consecuencia de la disposición de la película multicapa sobre la superficie de la carne a una temperatura próxima a los 220 °C.

Parte de los efectos de este sistema de envasado revolucionario sobre los mecanismos de maduración y alteración de la carne han sido estudiados en nuestro laboratorio (Barros-Velázquez y col. 2003; Vázquez y col. 2004) consecuencia de este proceso es el eficiente control microbiológico durante el almacenamiento del producto envasado (Barros-Velázquez y col. 2003), lo que probablemente repercute sobre la viabilidad y desarrollo tanto de la microbiota madurativa, básicamente bacterias ácido lácticas, como sobre los microorganismos alterantes y/o patógenos.

El envase utilizado para este sistema de envasado, consta de dos partes a mencionar:

1 - **Film inferior Darfresh Caryovac PS**: son fibras termoformables rígidas y semirígidas. Estas láminas aseguran una excelente presentación del producto y en combinación con el film superior, alargan la conservación del producto. Los films inferiores rígidos incorporan propiedades especiales de barrera a los gases y al vapor de agua; permiten también una fácil impresión sobre ellos y como resultado un etiquetado más sencillo.

2 - **Film Superior TS201 Darfresh Cryovac**: es un film multicapa coextruido altamente flexible y resistente a la manipulación, es adecuado para el envasado de productos de distintos tamaños, formas y superficies irregulares. Es un film altamente impermeable al oxígeno y al vapor que junto con el envasado a vacío asegura una vida prolongada del producto.

## 1.2. Las bacterias lácticas

El término bacterias del ácido láctico refiriéndose a un grupo heterogéneo de microorganismos Gram+ cuya característica común es la producción de ácido láctico por fermentación de azúcares, surgió a principios del siglo XX, precedido de los enormes avances en tecnología de los alimentos y conocimientos científicos alcanzados a finales del siglo XIX. Las interacciones existentes entre las bacterias lácticas y los alimentos llamaron pronto la atención de los científicos, lo que resultó de la contribución significativa de Pasteur quien en 1857 demostró que los procesos fermentativos están relacionados con el desarrollo de microorganismos y, del mismo modo, que cada tipo de fermentación, definida en función de sus principales productos orgánicos finales (ej. La fermentación láctica, butírica o alcohólica), estaba asociada a un tipo específico de microorganismo. Posteriormente, Lister, en 1873, aisló el primer cultivo puro de un microorganismo al que denominó *Bacterium lactis*. En 1884. Hueppe describió por primera vez la microflora responsable de la acidificación y coagulación de la leche y sus derivados, denominándola "*Milchsauerbacillus*", y Weigmamn (1899) propuso el término "*Bacterium acidilactici*" para estos microorganismos. A principios del siglo XX, el empleo de los Lactobacilos en la dieta humana cobró

---

un enorme interés, a raíz de la propuesta de Elie Metchnikoff del Instituto Pasteur de Paris de promover su utilización en la dieta como agentes bacterioprofilácticos y bacterioterapéuticos (Bibel, 1988).

A partir de los productos lácteos de los que inicialmente fueron aislados estos microorganismos se ha ido determinando sucesivamente su presencia en diversos hábitats, siempre que éstos reúnan las condiciones adecuadas para satisfacer sus necesidades nutritivas. Algunas bacterias lácticas viven asociadas a las plantas y se alimentan de los nutrientes liberados tras la muerte y descomposición de los tejidos vegetales para su crecimiento, por lo que fácilmente son aislados en alimentos y bebidas preparadas a partir de materiales vegetales, tales como el vino, la cerveza y los zumos naturales el pienso, los ensilados,. Otras bacterias de este grupo constituyen parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal y las mucosas, lo que también las convierte en candidatos para estar presentes en la carne y los productos cárnicos. Por último, algunas bacterias lácticas han sido aisladas también del pescado (Nair y Surendran, 2005)

### **1.2.1. Características generales de las bacterias lácticas**

Las bacterias ácido-lácticas ó bacterias lácticas (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos unidos por un conjunto de características morfológicas metabólicas y fisiológicas. Como descripción general se definen como bacterias Gram(+) no esporuladas, con morfología cocoide o bacilar, microaerófilas o anaerobias facultativas, no productoras de enzima catalasa ni oxidasa, (Makarova & Koonin, 2007). Tampoco licuan la gelatina, no producen indol ni ácido sulfhídrico a partir de aminoácidos. Debido a su limitada capacidad biosintética, son muy exigentes nutricionalmente y requieren factores de crecimiento complejos que incluyen aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Dellaglio *et al.*, 1994). Este grupo de bacterias poseen un contenido de guanina y citosina (G+C) inferior a 50% (Stiles y Holzapel 1997, Cintas y col., 2000). Una característica fundamental de estos microorganismos es la de producir mayoritariamente ácido láctico como producto final de la fermentación de hidratos de carbono (Makarova & Koonin, 2007). Estas bacterias se localizan frecuentemente en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno. Su enorme diversidad les permite habitar en una variedad de nichos ecológicos como productos lácteos, carnes, plantas, el pan, el vino y en superficies de mucosas humanas como la cavidad bucal, la vagina, y el tracto gastrointestinal (Aguirre y Collins, 1993; Ehrmann y Vogel, 2005; Klaenhammer y col., 2007, Makarova y Koonin, 2007; Pfeiler y Klaenhammer, 2007).

---

Se pueden distinguir dos vías de fermentación de azúcares, la glucólisis (ruta de Embden-Meyerhof) que conlleva a la formación exclusiva de ácido láctico como producto final, conocida como fermentación homoláctica y la fermentación heteroláctica cuya ruta es la 6-fosfogluconato/fosfocetolasa, que además de ácido láctico produce en cantidades significativas etanol, acetato y CO<sub>2</sub> como productos finales del metabolismo. Estos productos finales resultantes de la fermentación pueden sufrir alteración dependiendo de las condiciones de crecimiento, cambios que pueden atribuirse a alguna alteración del metabolismo del piruvato y/o el uso de un aceptor de electrones externos como es el caso del oxígeno o compuestos orgánicos.

Las características metabólicas de las bacterias lácticas han sido históricamente explotadas para la preservación de los productos alimenticios en casi todas las generaciones y sociedades, incluyendo los alimentos de origen agrícola y bebidas (Miller y Wetterstrom, 2000). Recientemente se ha incrementado la atención hacia las bacterias lácticas por su evidente importancia en la prevención de enfermedades infecciosas y mantenimiento de la salud (Reid y col., 2003, Schroeter y Klaenhammer, 2009).

### 1.2.2. Clasificación de las bacterias lácticas

La clasificación taxonómica de las BAL ha sido siempre controvertida y esta ha cambiado considerablemente durante los últimos años, pero históricamente, los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* ha formado el núcleo principal de su clasificación. Las revisiones taxonómicas efectuadas en los últimos años han sugerido que las bacterias lácticas deben ser clasificadas filogenéticamente en 13 géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Stiles y Holzapfel, 1997, Axelsson, 1998, Cintas y col., 2001, Holzapfel y col., 2001, Dellaglio y col., 2005). Esta clasificación de las bacterias lácticas está basada en la morfología, vía de fermentación de los azúcares (homofermentación o heterofermentación), configuración del ácido láctico producido (L ó D), habilidad para crecer a altas concentraciones de sal, crecimiento a diferentes temperaturas, tolerancia al medio ácido o básico. El género *Bifidobacterium* está generalmente incluido en el mismo contexto como bacteria ácido láctica, aunque las bacterias de este género guardan una pobre relación filogenética con las bacterias lácticas genuinas, además las bifidobacterias tienen un perfil metabólico para la degradación de hexosas diferente a la de las bacterias lácticas (Felis y Dellaglio, 2008).

Actualmente se usan nuevas herramientas para la clasificación e identificación de bacterias lácticas, siendo las más prometedoras el estudio de la genómica y proteómica.

---

### 1.2.3. Cultivos bioprotectores

En los últimos años se ha observado un cambio en la tendencia de los consumidores al demandar un consumo de alimentos naturales. El consumidor actual exige alimentos de gran calidad, poco procesados, seguros, más naturales (sin aditivos químicos) y con garantías de una larga vida útil. Esta tendencia ha hecho que la elaboración de los alimentos sea un gran desafío, lo cual obliga a los fabricantes a afrontar la búsqueda de alternativas a los métodos tradicionales de conservación de los mismos. Como resultado de estas investigaciones ha aparecido en el mercado una amplia variedad de productos de origen biológico denominados bioprotectores o bioconservadores.

#### 1.2.3.1. La bioprotección: definición

La extensión de la vida útil y el incremento de la seguridad de los alimentos usando su microbiota natural y cultivos microbianos controlados y/o sus metabolitos antimicrobianos se ha denominado bioprotección para diferenciarla de la conservación artificial, usando productos químicos (Stiles, 1996). Es decir, aprovechar la capacidad de la microbiota autóctona para inhibir o frenar el crecimiento y la actividad potencial de los microorganismos deteriorantes y/o patógenos. Dentro de este término "bioprotección" se engloban diversos tipos de productos que tienen en común su origen microbiano, procedente fundamentalmente, de bacterias ácido lácticas. Los cultivos antagonistas adicionados a los alimentos para aumentar su seguridad microbiológica y/o extender su vida útil sin modificar sus características sensoriales, se denominan cultivos protectores (Lücke, 2000). En resumen, el papel principal de la bioconservación es el de aumentar los periodos de almacenamiento así como aumentar la seguridad de los alimentos.

No obstante y según Holzapfel y col. (1995), para que un cultivo sea considerado bioprotector, éste debe cumplir una serie de requisitos:

- 1.- No debe representar ningún riesgo para la salud.
    - No debe producir toxinas, aminas biógenas u otros metabolitos que puedan influir negativamente en la salud del consumidor.
    - No debe ser patógeno.
  - 2.- Debe tener efectos beneficiosos para el producto.
    - Debe poder integrarse en el producto.
    - Debe adaptarse con facilidad al producto.
    - Su actividad protectora debe ser estable.
    - Su comportamiento ante una serie de parámetros ambientales debe poderse predecir.
-

- Debe ser competitivo frente a la microbiota endógena.
- Debe tener actividades enzimáticas deseables.

3.- No debe producir efectos sensoriales negativos en un producto elaborado bajo buenas prácticas de fabricación.

4.- Debe ser capaz de funcionar como indicador de contaminación microbiana ante condiciones de abusos de temperatura.

### 1.2.3.2. Las bacterias lácticas como cultivos bioprotectores

Las bacterias lácticas forman parte de la microbiota inicial de muchos alimentos, incluida la carne y durante los periodos de almacenamiento son la microflora natural dominante en la mayor parte de los alimentos, sin que representen un riesgo para la salud del consumidor, siendo así consideradas como GRAS (generalmente reconocidas como seguras) por la Food and Drug Administration de EEUU (FDA; Silva y col., 2002), por lo que estas bacterias son candidatas ideales como cultivos bioprotectores. Estos microorganismos han sido ampliamente utilizados como bioconservadores para inhibir el crecimiento de los microorganismos alterantes y patógenos en los alimentos (Stiles, 1996; Djenane y col., 2006).

El reconocimiento de las bacterias ácido lácticas como beneficiosas para alargar la vida útil de los alimentos se debe a diversos sistemas antimicrobianos desarrollados por éstas. El mecanismo primario ejercido por estas bacterias es la producción de ácido láctico y en consecuencia el descenso del pH (Daeschel, 1989). Por otro lado, las bacterias lácticas producen varios compuestos que pueden ser clasificados como antimicrobianos de bajo peso molecular, tales como el peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, y otros compuestos no caracterizados, y por otro lado, compuestos de alto peso molecular como las bacteriocinas (Jay, 1982; Klaenhammer, 1988; Piard & Desmazeaud, 1991, 1992; Hugas y col.; 2002). Estos mecanismos las hacen tener un efecto antagonista contra el crecimiento de una gran variedad de microorganismos contaminantes patógenos y/o alterantes en los alimentos como *E. coli.*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Listeria* (De Vuyst y Vandamme, 1994; Arlindo y col., 2006; Cocolin y col., 2007; Edward y col., 2008).

Es importante que se haga una distinción entre cultivos iniciadores y cultivos protectores en lo que se refiere a actividad metabólica (producción de ácidos e hidrólisis de proteínas) y lo que constituye la actividad antimicrobiana, el principal objetivo del uso de las bacterias lácticas, respectivamente.

### 1.2.3.3. Compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas.

En la tabla 1 se resumen los compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular producidas por estos microorganismos, los cuales se describen a continuación.

Tabla 1. Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular producidos por bacterias lácticas

<i>Compuestos</i>	<i>Microorganismos productores</i>	<i>Microorganismos sensibles</i>
<i>Ácido láctico</i>	Todas las bacterias lácticas	Todos los microorganismos
<i>Ácido acético</i>	Bacterias lácticas heterofermentativas	Todos los microorganismos; dependientes del pH
<i>Alcoholes</i>	Levaduras, bacterias lácticas heterofermentativas	Todos los microorganismos.
<i>CO<sub>2</sub></i>	Bacterias lácticas heterofermentativas	La mayoría de los microorganismos
<i>Diacetilo</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	Levaduras, bacterias Gram (-) a concentraciones $\geq 200$ ppm, bacterias Gram (+) a concentraciones $\geq 300$ ppm.
<i>Peróxido de hidrógeno</i>	Todas las bacterias lácticas	Todos los microorganismos
<i>Reuterina</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Amplio espectro: bacterias Gram (+), bacterias Gram (-) y hongos.
<i>Sidosporas</i>	Algunas bacterias anaerobias facultativas, la mayoría de las aerobias, incluyendo <i>Pseudomonas</i> spp. y <i>Staphylococcus</i> spp.	Microorganismos dependientes de las moléculas del hierro.
<i>Ácido benzoico, ácido mevalónico, lactona y Metilhidantoina</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Patoea agglomerans</i> (bacteria Gram (-)), <i>Fusarium Avennaceum</i>

Fuente: Adaptada de Helander y col., 1997.

#### *Ácidos orgánicos y otros compuestos orgánicos de bajo peso molecular*

Se trata principalmente del ácido láctico y el ácido acético. Estos ácidos contribuyen al desarrollo del sabor, aroma y textura de los alimentos.

*Ácido láctico*: el ácido láctico es el producto característico de la fermentación de las bacterias lácticas, el cual no es utilizado por las células y se excretan hacia el exterior, pudiendo reducir el pH a un nivel en el que se inhibe el desarrollo de muchas bacterias (Helander y col., 1997). Este ácido puede formar sales naturales como el lactato sódico y potásico. El lactato actúa como agente bacteriostático incrementando la fase de latencia de los microorganismos, cuya acción

específica se atribuye a mecanismos que interfieren en el desarrollo del metabolismo microbiano como la acidificación en el interior de la célula y la interferencia en el transporte de protones a través de la membrana celular. El lactato tiene un espectro de acción amplio, siendo efectivo contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Estudios realizados han demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos como *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Clostridium*. Además este compuesto reduce los valores de  $a_w$  de los alimentos (Rodríguez, 2005). La actividad antimicrobiana de los lactatos añadidos a productos cárnicos ha sido reseñado ya previamente (Hwang y col., 2011).

*Acido acético*: El ácido acético produce una inhibición más potente que el ácido láctico a una determinada concentración molar y pH. Este ácido solo es producido por bacterias lácticas heterofermentativas y suele presentarse en pequeñas concentraciones (Helander y col., 1997). El ácido acético puede formar, diacetato sódico, también acidificante, siendo también un potente agente antimicrobiano. Su actividad antimicrobiana para inhibir *L. monocytogenes* en productos cárnicos ha sido también descrita (Blom y col., 1997). La combinación del lactato y diacetato sódico incrementa el efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes* (Mbandi y Shelef, 2002).

El empleo del lactato sódico (E-325), el lactato potásico (E-326) y el diacetato sódico (E-262-II) como aditivos está permitido para la fabricación de productos cárnicos por la Comunidad Europea (CE, 1995) y también en los Estados Unidos (FSIS/USDA, 2000). El diacetato puede producir alteraciones sensoriales en los productos cárnicos, por lo que se recomienda añadir una cantidad que puede variar entre un 0,10 y el 0,12%. Sin embargo, no se han detectado alteraciones sensoriales negativas derivadas de su aplicación a estos niveles.

Las bacterias lácticas son capaces de sobrevivir y desarrollarse a valores de pH relativamente bajos, debido a que poseen un sistema de transporte de ácido láctico y protones al exterior de la célula, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, genera energía (Tseng, 1993).

*Peróxido de hidrógeno*: Se forma por las bacterias lácticas en presencia de oxígeno, como resultado de la acción de la flavoproteína oxidasa o nicotinamida adenina dinucleotido (NADH) peroxidasa. Estas bacterias no producen la enzima catalasa que elimine el  $H_2O_2$  generado en presencia de oxígeno, por lo que se acumula en el medio. El efecto bactericida de este compuesto ha sido atribuido no solo al poder oxidante hacia la estructura lipídica de la membrana, sino que también produce la destrucción de estructuras moleculares básicas de los ácidos nucleicos y proteínas celulares (Dahl y col., 1989).

---

*Reuterina*: La reuterina es una sustancia no proteica, de bajo peso molecular, neutra y soluble en agua producida por el *Lactobacillus reuteri* durante la metabolización del glicerol en anaerobiosis (figura 1) y muestra un espectro antimicrobiano amplio, siendo activo contra bacterias Gram(-), Gram (+), levaduras y hongos filamentosos (Helander y col., 1997).

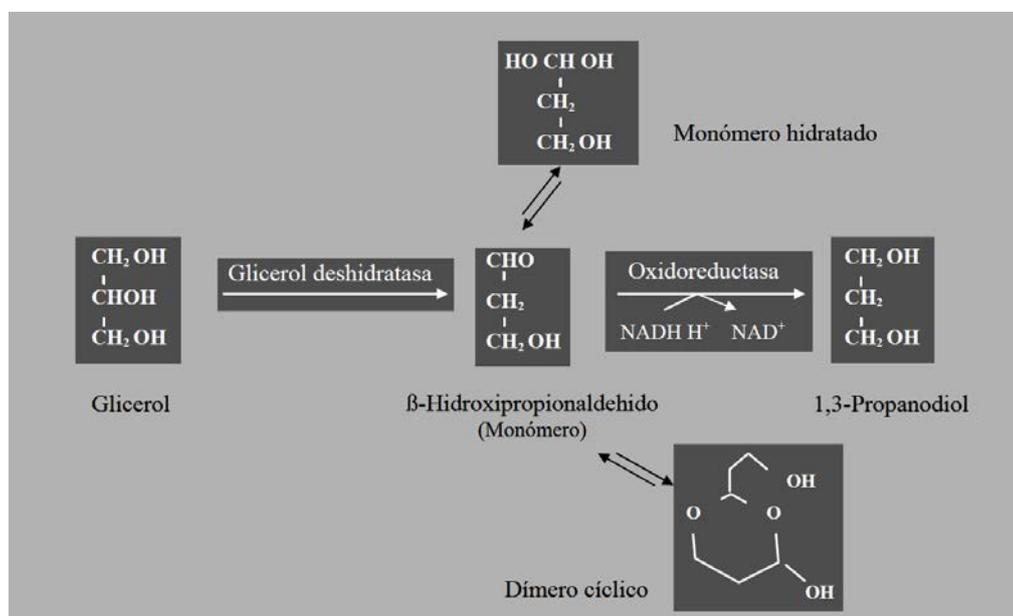


Figura 1. La reuterina como metabolito intermedio en la ruta de degradación del glicerol

*Diacetilo*: El diacetilo es producido por algunas especies de *Lactococcus* y *Leuconostoc* mediante el metabolismo del ácido cítrico. Es un compuesto con aroma intenso, por lo que resulta poco recomendable para la preservación de los alimentos (Holzapfel y col., 1995).

*Dióxido de carbono*: es producido por bacterias lácticas heterofermentativas. El mecanismo antimicrobiano exacto es desconocido. Sin embargo, el CO<sub>2</sub> ejerce un importante papel al crear anaerobiosis en el ambiente, lo cual inhibe la descarboxilación enzimática, la acumulación de CO<sub>2</sub> en la bicapa lipídica de la membrana, lo que causa una disfunción en la permeabilidad (Eklund, 1984).

*Acetaldehído*: es producido por bacterias lácticas heterofermentativas y se forma durante el metabolismo de los hidratos de carbono, es reducido a etanol por la reoxidación de nucleótidos de pirimidina. Su actividad contra los patógenos ha sido descrita en concentraciones entre 10-100 ppm (De Vuyst y Vandamme, 1994).

### 1.3. Probióticos

El tracto gastrointestinal constituye la principal área de contacto entre el organismo humano o animal (hospedador) y el exterior, ejerciendo doble papel, el de impedir el acceso a organismos patógenos, mientras por otro lado permite la absorción de nutrientes. Este se encuentra colonizado por alrededor de  $10^{12}$  -  $10^{14}$  UFC/g, cuya concentración se incrementa desde el estómago a la porción distal del colon (Schroeter y Klaenhammer, 2009). De esta población, solo una pequeña parte (alrededor de 300 – 500) de las especies que componen la microbiota intestinal son cultivables in-Vitro, mientras que la mayoría no es microbiota cultivable. Esta microbiota participa en ambas tareas en el tracto gastrointestinal: unos participan facilitando la absorción de nutrientes que en ausencia de estos microorganismos serían indigeribles por el organismo, como los carbohidratos complejos. Otros participan en el mecanismo de defensa dada la capacidad antagonista contra el desarrollo de microorganismos patógenos potenciales por la producción de sustancias antimicrobianas, compitiendo en posicionamiento (adherencia) y nutrientes y estimulando el sistema inmunitario.

Los probióticos son definidos como organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas influyen positivamente en la salud de los consumidores al mejorar el balance de la microbiota en el intestino, contribuyendo de este modo a fortalecer las defensas (FAO/WHO, 2001, Borchers y col. 2009). Algunos de los efectos beneficiosos potenciales que se pueden mencionar, además de la exclusión de patógenos, contribuye al sistema inmunitario a nivel de las mucosas y también ha sido señalado un efecto benéfico en la reducción de los tumores malignos (Reid y col., 2003)

El concepto de alimento probiótico como parte de un alimento funcional se debe a la exitosa cooperación de la industria alimentaria e investigación en la tecnología de producción de los alimentos así como en la nutrición clínica. Los probióticos se han aplicado principalmente en productos lácteos, tales como yogurt y otros productos derivados de la leche, así como en cereales (Saxelin, 2000). El uso de los probióticos en el mundo se ha venido incrementando debido a los efectos benéficos que tienen en el hospedador humano o animal y para que se observen estos beneficios en la salud, se sugiere una concentración de bacterias prebióticas de  $10^6$  UFC/g (Shah, 2000). En la tabla 2 se señalan los criterios que se tienen en cuenta para considerar a un microorganismo como probiótico y para su uso en humanos:

**Tabla 2. Criterios para el uso de probióticos en humanos****I - Identificación a nivel de género, especie e intraespecie.**

- El método standard para la identificación de la especie tiene que ser la hibridación de ADN o bien la determinación de las secuencias del 16S rARN, particularmente si se usaron las pruebas fenotípicas para la confirmación.

- El tipado de las cepas deberá estar hecho mediante la electroforesis en campo pulsante (estudio del polimorfismo del ADN mediante endonucleasas y electroforesis en campo pulsante).

- Las cepas deberán estar depositadas en una colección internacional de cultivos.

**II - Aspectos de seguridad para los alimentos y para uso clínico.**

- No ser patógeno.

- No ser capaz de degradar la mucosa intestinal.

- No poseer genes de resistencia frente a los antibióticos.

- No ser conjugable con ácidos biliares.

- Ser susceptible a los antibióticos.

**III - Capacidad para sobrevivir en el tracto gastrointestinal.**

- Ser tolerante a los ácidos y a la bilis.

**IV - Adhesión a las células epiteliales intestinales.**

**V - Multiplicación rápida permanente o temporal con colonización del tracto gastrointestinal o vaginal.**

**VI - Supervivencia en alimentos y posibilidad para producción de preparaciones liofilizadas.**

**VII - Estabilización de la microbiota intestinal.**

**VIII - Ser capaz de producir sustancias antagonistas contra patógenos.**

**IX - Poseer efectos beneficiosos para la salud documentados.**

- Al menos 2 estudios, preferiblemente una confirmación independiente de los resultados por otro centro, distinto al inicial.

- Ser estable en las condiciones de procesamiento y almacenaje.

### 1.3.1. Las Bacterias lácticas como probióticos

Sumado a la capacidad de las bacterias lácticas para adaptarse a los alimentos, uno de los aspectos de interés es su facilidad para adaptarse a las mucosas. Algunos datos recientes indican el importante papel que juegan en el mantenimiento de la salud. Tal y como hemos señalado en anteriores capítulos, la actividad antagónica de las BAL resulta de la formación de ácidos y la producción de metabolitos como las bacteriocinas. La producción de ácido láctico y acético como resultado del metabolismo de los hidratos de carbono lleva a la reducción del pH del medio, que en combinación con las sales biliares desfavorece el desarrollo de microorganismos patógenos Gram-negativos (Brul y Coote 1999, Stiles, 1996). Se sabe que las bacterias lácticas usan la glucosa, galactosa y lactosa como principales fuentes de carbono (Sarela y col., 2003). Los principales microorganismos usados como probióticos son: *Lactobacillus acidóphilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* spp, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacteria adolescente*, *B. bifidum*, *B. brevis*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. lactis*, *Sacharomyces boulardii* y *Streptococcus thermóphilus* (Klaenhammer y Kullen, 1999) así como algunas cepas no patógenas de *Escherichia coli* o *Enterococcus* spp., y *Saccharomyces* spp.

Un rasgo importante de las bacterias lácticas relacionadas con el tracto gastrointestinal es su tolerancia a la bilis. Hidrolasas específicas de la bilis y transportadores han sido encontradas en diferentes especies de bacterias probióticas tales como *L. johnsonii*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, y *L. plantarum* (Leer y col., 1993; Pridmore y col., 2004; McAuliffe y col., 2005; Pfeiler y col., 2007; Martoni y col., 2008). Un estudio realizado en *Lactobacillus reuteri* permitió la identificación del operón conteniendo un transportador de resistencia a varios fármacos y un gen con una función desconocida expresado en presencia de bilis. Cuando fue suprimido dicho gen, la cepa demostró poca capacidad para recuperarse en presencia de la bilis, sugiriendo que dicho transporte de sales biliares juega un papel importante en la tolerancia a este compuesto (Whitehead et al., 2008).

### 1.3.2. Mecanismo de acción de los probióticos

El mecanismo exacto por el cual una cepa probiótica interactúa con otra en el tracto gastrointestinal por sí misma es desconocido (von Wright y Salminen, 1999). Sin embargo, estudios recientes han permitido determinar una serie de mecanismos a través de los cuales estos microorganismos actúan en la prevención de infecciones, contribuyendo así a fortalecer el sistema inmunitario e incrementar el valor nutricional de los alimentos. Cada uno de los mecanismos involucrados depende específicamente de cada cepa, por lo tanto antes de hacer la selección de

---

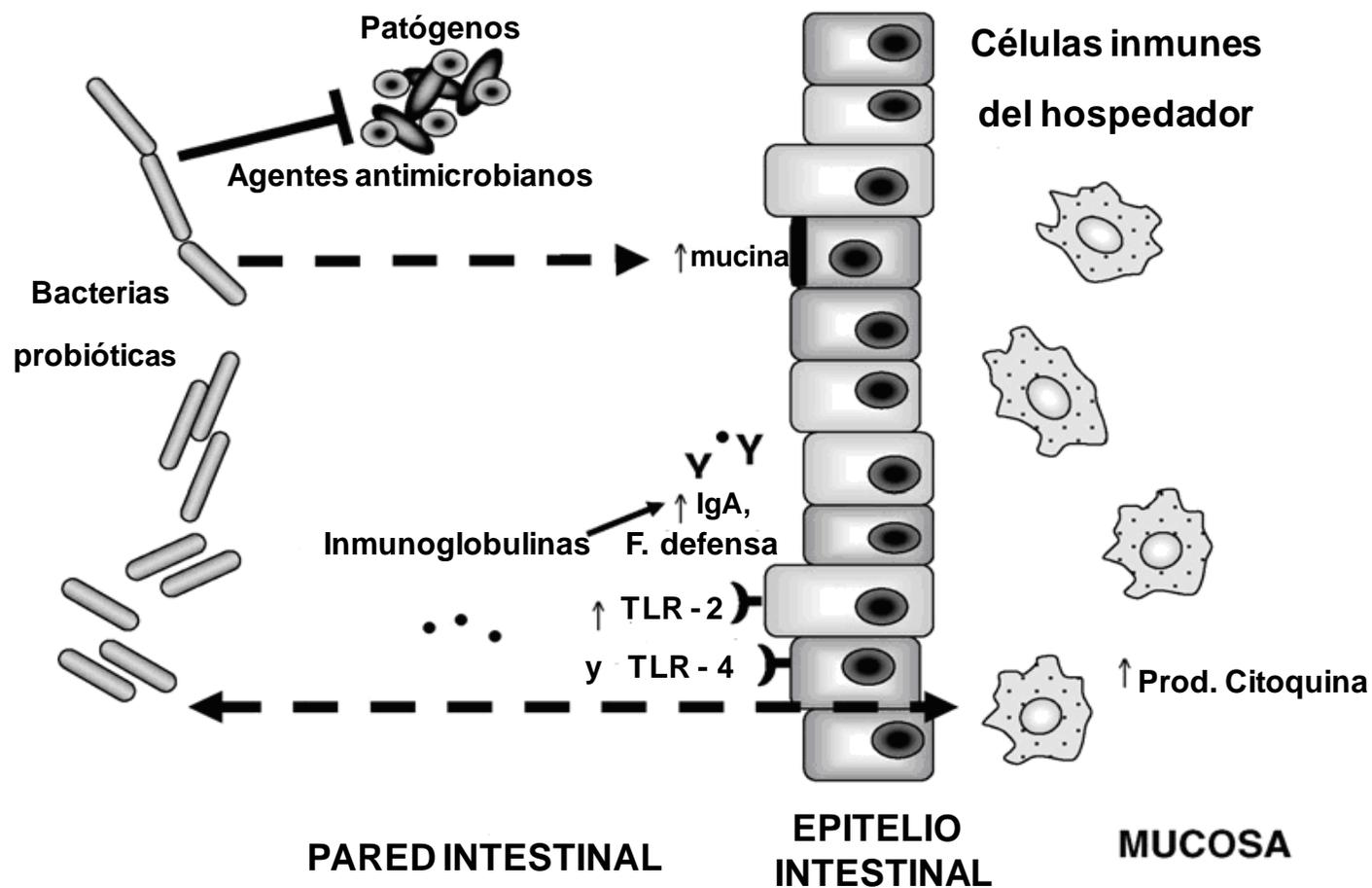
cepas con características probióticas es importante hacer un estudio individual en cada cepa en función del propósito deseado para la misma.

### 1.3.3. Protección probiótica contra organismos patógenos

Las células de la mucosa epitelial constituyen la primera barrera defensiva contra el ataque de agentes patógenos mediante la producción de mucina o reducción de la permeabilidad intestinal (Figura 2). La producción de mucina y la reducción de la permeabilidad intestinal pueden prevenir la penetración de organismos patógenos y sustancias tóxicas. Ciertos factores de los microorganismos probióticos favorecen el incremento en la producción de mucina en las células evitando lesiones en las células epiteliales producidas por patógenos entéricos así como la reducción en la permeabilidad intestinal (Caballero-Franco y col., 2007, Johnson-Henry y col., 2008 y Ewaschuk y col., 2008). Por otro lado, se sabe que ciertas proteínas son importantes ya que permiten que los microorganismos probióticos se adhieran a la superficie de la mucosa intestinal, lo cual permite su persistencia en el tracto intestinal, constituyendo además una forma de exclusión de las bacterias patógenas al impedir que se adhieran a las mismas superficies. Por ejemplo las proteínas presentes en la pared celular de *L. crispatus* y *L. helveticus* son capaces de evitar la adherencia de ciertos microorganismos patógenos de origen alimentario, como es el caso de *Escherichia coli* O157:H7 a las células Hela, HEP-2, y T84 (Chen y col., 2007, Johnson-Henry y col., 2007). Un estudio realizado sobre el *L. johnsonii* usando datos de secuenciación y microarray identificaron un grupo de tres genes específicos involucrados en el incremento de su persistencia en el tracto gastrointestinal durante un largo periodo de tiempo, determinándose 2 genes sin operon transportador específico de manosa y un gen con similitud a la inmunoglobulina A. Una reducción en el tiempo de tránsito intestinal fue observado cuando cada uno de los tres genes fue suprimido por separado (Denou y col., 2008).

Otra línea de defensa probiótica para prevenir infecciones es la producción de una serie de compuestos antimicrobianos con capacidad para inhibir el crecimiento de una serie de patógenos de origen alimentario. En general las bacterias lácticas producen ácidos orgánicos, fundamentalmente el lactato y acetato, los cuales reducen considerablemente el pH del medio ejerciendo un efecto antagonista al crecimiento de patógenos. Por otro lado los probióticos tienen además la capacidad de sintetizar péptidos o proteínas específicas con efecto tóxico hacia microorganismos patógenos de origen alimentario. Estudios recientes revelaron que *L. salivarius* UCC118 fue capaz de proteger a ratones de infecciones por *Listeria monocytogenes*, un patógeno de origen alimentario común. Se ha demostrado que este efecto protector está relacionado con la producción de una bacteriocina específica letal contra *L. monocytogenes* (Corr y col., 2007).

---



IgA: Inmunoglobulina A; TLR, Receptores barreras (Toll-like receptor)

Fuente: adaptado de Saulnier y col. (2009)

Figura 2. Representación del papel beneficioso de las bacterias probióticas en el tracto intestinal de mamíferos

#### 1.3.4. Inmunomodulación ejercida por los probióticos

Varias cepas de probióticos pueden de alguna forma influir en el sistema inmune (Galdeano y col., 2007). Los probióticos pueden estimular la inmunidad incrementando la producción de los anticuerpos en las mucosas, estimulando la expresión de la citosina pro-inflamatoria y, mejorando en general las defensas del hospedador. Los efectos supresores del sistema inmune se manifiestan por la reducción en la expresión de la citosina, inflamación sistémica, proliferación celular e incremento de apoptosis. Las proteínas superficiales han sido señaladas como factor clave implicado en la inmunomodulación. Por ejemplo, el *L. crispatus* modula la expresión de ciertos receptores que intervienen en la inmunidad innata en las superficies de las células epiteliales de la mucosa del colon de ratones (Voltan y col., 2007). Otros ejemplos de influencia en la inmunomodulación por parte de las bacterias probióticas fueron citados por Lyer y col. (2008), en este caso, los factores segregados por *L. reuteri* disminuyen la expresión del factor nuclear involucrado en el control de la proliferación celular, la respuesta inmune, la respuesta inflamatoria y la apoptosis celular.

#### 1.4. Características tecnológicas de las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas juegan un papel importante en la conservación de los alimentos y en los procesos fermentativos de los mismos y son consideradas muy importantes desde el punto de vista tecnológico. Como se ha mencionado en capítulos anteriores, son capaces de producir un descenso en el pH produciendo ácido láctico, producen bacteriocinas para prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes, son capaces de modificar los productos frescos para obtener nuevas características sensoriales, una mejora de la seguridad, estabilización y vida útil de productos cárnicos (Fontana, Coconcelli, & Vignolo, 2005).

Como ya hemos mencionado, la principal función tecnológica de las bacterias lácticas como cultivos iniciadores está basada en su capacidad para producir ácidos orgánicos, principalmente el ácido láctico, como consecuencia del metabolismo de los carbohidratos. Sin embargo, la contribución de estas bacterias a las características finales del producto no se limita al proceso de acidificación, sino que se completa con otras funciones como son la actividad proteolítica, la producción de compuestos aromáticos, la producción de CO<sub>2</sub>, la síntesis de exopolisacáridos o la producción de compuestos inhibidores (Chamba y col., 1994). Los microorganismos utilizados como iniciadores son preferiblemente homofermentativos y descomponen los azúcares por la ruta de Embden-Meyerhof obteniéndose ácido láctico como producto final (Lücke y Hechelmann, 1987). El ácido láctico se acumula en el medio y como consecuencia origina una serie de efectos beneficiosos en la textura, el color, sabor y la larga vida útil de los productos cárnicos fermentados (Aymerich y

---

col., 2003). Algunos autores (Hammes y col., 1990) han atribuido cierta actividad a determinadas especies de bacterias lácticas que también contribuiría en el proceso de enrojecimiento a través de la actividad de la enzima nitrato y nitrito reductasa. Se ha demostrado que *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus* poseen ambas enzimas, mientras que *Pediococcus pentosaceus* sólo presenta actividad nitrito reductasa; otras especies como *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sakei* carecen de ella o lo presenta muy escasamente (Wolf y Hammes, 1988).

Para que una cepa pueda ser considerada un buen cultivo iniciador dependerá del tipo de producto que se desea elaborar y de las condiciones del procesado. Los preparados comerciales suelen incluir especies como: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*. En todo caso para que puedan desarrollar su función tecnológica deben estar presentes en la masa cárnica en un número superior a  $10^6$  ufc/g.

Una cepa seleccionada como iniciadora debe ser capaz de crecer a diferentes temperaturas y predominar durante todo el proceso de elaboración, ser capaz de interactuar con otras bacterias integrantes del cultivo iniciador, en cambio, debe presentar una acción antagónica hacia los microorganismos tecnológicamente indeseables y los patógenos. En este sentido, es importante seleccionar cepas que tengan capacidad para sintetizar bacteriocinas, ya que aunque su actividad sea limitada, pueden participar en la inhibición junto a otros factores como el pH, o la competencia por los nutrientes (Ammor y col., 2007).

Una gran parte de los lactobacilos sintetizan peróxido de hidrógeno en presencia de oxígeno como resultado de la acción de las flavoproteínas oxidasas o nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) peroxidasa. Cuando el  $H_2O_2$  es liberado a la carne puede ejercer actividad inhibitoria sobre microorganismos indeseables tecnológicamente dado el elevado poder oxidante de este compuesto, sin embargo, también actúa negativamente ya que puede ocasionar fenómenos de decoloración, por lo tanto, las cepas elegidas para la industria cárnica no deben producir este metabolito, o bien, deben contener la enzima catalasa capaz de desdoblarlo.

Por último, otro aspecto tecnológico a tener en cuenta en la elección de la cepa es su posible contribución en la formación del aroma.

#### **1.4.1. Proteolisis**

Las bacterias lácticas presentan un complejo sistema proteolítico que ha sido estudiado en profundidad (Kunji y col., 1996; Law y Haandrikman, 1997), no sólo por su importancia fisiológica sino también por sus implicaciones tecnológicas en la textura y el desarrollo del flavor, tanto en productos lácteos (Broome y col., 1990) como en productos cárnicos (Hammes y col., 1990). La

---

mayoría consta de una proteinasa asociada a la pared celular y, al menos, una decena de peptidasas intracelulares de diferente especificidad (Pritchard y Coolbear, 1993; Tan y col., 1993).

En la carne y productos cárnicos se producen cambios en los compuestos nitrogenados relacionados fundamentalmente con el fenómeno de la proteólisis llevada a cabo gracias a la actividad conjunta de las enzimas proteolíticas de origen tisular y microbiano (Ordóñez y de la Hoz, 2001). Estudios realizados en jamones, atribuyeron también la actividad proteolítica a las levaduras presentes (Simoncini y col., 2007). Sin embargo, otros autores (Kato y col. 1994) concluyen que las responsables de tal proteólisis son las enzimas endógenas de la carne y las bacterias lácticas actúan sólo como coadyuvantes. Los estudios realizados por Johanson y col. (1994) y García de Fernando y Fox, (1991) muestran por otra parte que *Pediococcus* spp., produce enzimas proteolíticas involucradas en la proteólisis de embutidos fermentados. Adicionalmente, las bacterias lácticas, además de las enzimas proteolíticas, producen descenso en los valores del pH, aumentando la actividad de la catepsina D de la carne, lo que contribuye de manera indirecta a la degradación de las proteínas miofibrilares (Ordóñez y de la Hoz, 2001; Molly *et al.*, 1997).

La actividad de las enzimas proteolíticas, tanto de origen tisular así como de origen microbiano, provoca un incremento de compuestos como péptidos y aminoácidos libres, que contribuyen tanto a la textura como al sabor de la carne (Talon y col., 2002). Sin embargo, ésta actividad no es conveniente durante la conservación de las carnes frescas, ya que uno de los objetivos principales es mantener las características originales del alimento.

#### **1.4.2. Lipólisis**

La lipólisis implica la degradación total o parcial de los enlaces éster de los triglicéridos y fosfolípidos. Estos lípidos pueden ser hidrolizados por las lipasas de origen microbiano o tisulares, siendo los ácidos grasos libres los precursores de las moléculas aromáticas (Talon y col., 2002). De este modo, una oxidación lipídica moderada contribuye a la formación del aroma y sabor típico en productos cárnicos, tal es el caso de los embutidos. Sin embargo, el principal problema de la oxidación está relacionado con la formación de compuestos volátiles que, superados determinados valores, proporcionan un aroma y sabor rancio, desagradables para el consumidor (Ordóñez y col., 1999).

### **1.5. Aspectos de seguridad de las bacterias lácticas**

#### **1.5.1. Producción de aminas biógenas**

Las aminas biógenas (AB) son compuestos orgánicos (bases nitrogenadas) de bajo peso molecular, frecuentemente halladas en alimentos fermentados como los derivados de la carne, el

---

queso, vino, etc. Estos compuestos son formados a partir de aminoácidos precursores, por la acción de enzimas de origen microbiano (Silla, 1996). Según las características químicas las aminas biógenas pueden tener estructura aromática: histamina, tiramina, feniletilamina y triptamina, resultantes de la descarboxilación de la histidina, tirosina, fenilalanina y triptófano, respectivamente; y aminas de estructura alifática: Putrescina, cadaverina y agmatina, provenientes de la descarboxilación de la lisina, ornitina y arginina, respectivamente. Entre los microorganismos capaces de producir la descarboxilación de los aminoácidos y generar AB se encuentran las del género *Enterobacteriaceae* a los que se asocia la producción de cadaverina y/o histamina y las BAL, en especial los microorganismos del género *enterococcus* que pueden generar la tiramina (Bover-Cid y col., 2005; Pircher y col., 2007). Sin embargo, esta capacidad de generar una o varias aminas, así como la intensidad de estas puede variar según las especies e incluso en cepas de la misma especie (Boyer-Cid y col., 2001).

Las AB pueden tener efectos beneficiosos así como perjudiciales en la salud de los seres humanos. Así, algunas aminas como la putrescina, parecen ser esenciales para el crecimiento y la regeneración celular en organismos vivos, otros participan en la regulación de la temperatura corporal, volumen estomacal, en la regulación del pH estomacal y la actividad del corazón (ten Brink y col., 1990; Halász y col., 1994; Pircher y col., 2007). Sin embargo, el consumo de elevadas tasas de aminas biógenas, tales como histamina y tiramina pueden causar efectos tóxicos en las personas. Se han observado crisis hipertensivas graves provocadas por interacción de las aminas biógenas con los medicamentos inhibidores de la mono-aminoxidasa (MAO), usados como antidepresivos. Un riesgo adicional a la formación de algunas aminas biógenas es que estas contribuyen a la formación de nitrosaminas, compuestos potencialmente cancerígenos, especialmente en los productos cárnicos con nitratos y nitritos añadidos. Aunque en carnes y productos cárnicos, con excepción de algún producto concreto como la panceta, las concentraciones de nitrosaminas suelen ser bajas (Scanlan, 1995).

Hay que destacar que la carne fresca y productos frescos no deberían de tener aminas biógenas. La presencia de diaminas (cadaverina y putresina) e histidina en estos productos está relacionada con su alteración, ya que son generalmente producidas por enterobacterias y las pseudomonas, siendo estas las principales responsables del deterioro de la carne. Como consecuencia la formación de aminas biógenas puede ser un indicador para valorar el estado higiénico de los productos cárnicos (Hernández-Jover y col., 1996). Sin embargo, en los productos cárnicos crudos curados, la fermentación favorece el desarrollo de una gran variedad de microorganismos potencialmente aminogénicos, que sumado a la proteólisis que genera un incremento en la disponibilidad de aminoácidos precursores, favorece la formación de aminas

---

biógenas en estos productos. La presencia de aminas biógenas en productos cárnicos ha sido demostrada por varios autores (Parente y col., 2001; Bover-Cid y col., 2005). Los microbiota fermentativa endógena puede jugar un papel importante en la acumulación de aminas biógenas en los productos cárnicos fermentados (Bover-Cid y col., 2001; Pircher y col., 2007). Por lo que un estudio previo a la selección de microorganismos iniciadores no aminogénicos es crucial para prevenir acumulación de aminas biógenas en los productos cárnicos (Bover-Cid y col., 2000)

## 1.6. Las bacteriocinas.

### 1.6.1. Definición y clasificación

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y constituyen un grupo amplio y heterogéneo de antimicrobianos (Kotelnikova y Gelfand, 2002; Cotter y col., 2005b; Gordon y col., 2007; Heng y col., 2007). La síntesis de estos péptidos contribuye a los mecanismos de defensa innatos y tienen en común su naturaleza catiónica, anfipática, o en algunos casos hidrofóbica, además de su capacidad para desestabilizar las membranas citoplasmáticas de las células sensibles (Riley y Wertz, 2002a; Sit y Vederas, 2008). Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas, como las colicinas de *Escherichia coli*, son, generalmente, de un mayor peso molecular (29 a 90 kDa) y un espectro de acción reducido, mientras que las bacteriocinas de las bacterias Gram-positivas son, en su mayoría, pequeños péptidos de un tamaño molecular inferior a 6 kDa, termoestables y con variaciones en su espectro de acción (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Kotelnikova. y Gelfand, 2002).

A pesar de la heterogeneidad de su tamaño molecular, propiedades bioquímicas y espectro de acción, las bacteriocinas de las bacterias lácticas poseen características comunes que permiten agruparlas en cinco clases (Klaenhammer, 1993; Sablon y col., 2000; Cintas y col, 2001a; McAuliffe y col., 2001; Diep y Nes, 2002; Kemperman y col., 2003a, b; Franz y col., 2007) que son:

- (1) Clase I. Lantibióticos
- (2) Clase II. Bacteriocinas lineales y no modificadas posttraduccionalmente.
- (3) Clase III. Bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles.
- (4) Clase IV. Bacteriocinas complejas.
- (5) Clase V. Bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente.

(1) Clase I. Bacteriocinas o lantibióticos (lantibionina, péptidos con actividad antibiótica). Son bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<5 kDa), termoestables y se diferencian de otras bacteriocinas por la presencia de aminoácidos inusuales y modificados posttraduccionalmente, como lo son la deshidroalanina (DHA) y la deshidrobutirina (DHB), originados por deshidratación de

---

la serina y la treonina, respectivamente. La condensación de los estos residuos (DHA y DHB) con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas de la molécula origina los aminoácidos lantionina y la  $\beta$ -metillantionina respectivamente, (Chatterjee y col., 2005; Cotter y col., 2005b; Li y Van der Donk, 2007; You y Van der Donk, 2007). Esta clase de bacteriocinas tiene como ejemplo característico la nisina, la bacteriocina más estudiada hasta el momento.

Los lantibióticos, a su vez, deteniendo en cuenta su estructura y modo de acción, se subdividen en 2 grupos, A y B:

**(a) Grupo IA.** Péptidos más largos que los del grupo B, de un tamaño de entre 21 a 38 aminoácidos los cuales contienen una región catiónica hidrofílica que actúan a nivel de membrana bacteriana formando poros por despolarización y engloban a los lantibióticos de un sólo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para desarrollar su actividad antimicrobiana en células sensibles (Nagao y col., 2006).

**(b) Grupo IB.** Péptidos pequeños (19 aminoácidos como máximo) aniónicos o sin carga, globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores de enzimas específicos. Los péptidos líderes se anclan a través del sistema transportador de proteínas ABC (del inglés "*Adenosin triphosphate Binding Cassette*"). De esta forma, estos péptidos como la mersacidina (Twomey y col., 2002) actúan interfiriendo en la biosíntesis de la pared celular (Pag y Sahl 2002).

**(2) Clase II.** Son péptidos (<10 kDa, un tamaño de 30 a 60 aminoácidos), lineales y no modificados postraduccionalmente, no lantibióticos y termoestables, que actúan induciendo la permeabilidad de la membrana y la subsecuente pérdida de moléculas de la célula (Drider y col., 2006; Oppegård y col., 2007). El ejemplo característico de este grupo lo representa la pediocina PA-1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina. Entre otras, esta clase incluye a la enterocina P.

**(3) Clase III.** Son bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. En esta clase la bacteriocina más conocida es la helveticina J y lactocina B (Joerger 2003; Dobson y col. 2007).

**(4) Clase IV.** Bacteriocinas complejas. Son péptidos que contienen una porción proteica y una o más fracciones glucídicas o lipídicas necesarias para ejercer su actividad. Por lo que, esta clase incluye bacteriocinas consideradas como glicoproteínas (leuconocina S) o como lipoproteínas (Lactocina 27). Muy poco se conoce sobre la estructura y funciones de las bacteriocinas que forman esta clase (Vermeiren y col., 2006; Heng y col., 2007).

**(5) Clase V.** Son péptidos cíclicos, en esta clase de bacteriocinas los extremos N- y C-terminales están unidos formando una columna de estructura circular y no modificada

---

postraduccionalmente. A esta clase pertenecen las enterocinas AS-48, B, EJ97, RJ11, MR10 A y B, Q, L50A y B, la bacteriocina 32 y la gasicina A. Estas bacteriocinas tienen unas características estructurales y genéticas no comunes, y diferentes de las bacteriocinas citadas anteriormente, lo que no permite agrupar estas bacteriocinas en las cuatro clasificaciones precedentes (Franz y col., 2007).

Resulta importante pasar a describir a las bacteriocinas de la clase I y II, por ser las que han sido estudiadas con mayor profundidad y han sido descritas, en mayor número de investigaciones con más de 20 representantes de los lantibióticos y, alrededor de 100, en el caso de las bacteriocinas de la clase II (Kemperman y col., 2003b).

### 1.6.2. Espectro de actividad

La mayoría de las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas tienen tendencia a ser activas únicamente frente a bacterias Gram-positivas (Riley y wartz 2002a; Sit y Vederas, 2008). La estructura y composición de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, levaduras y mohos impide a las bacteriocinas acceder a las membranas plasmáticas, donde desempeñan su actividad. Sin embargo, sometiendo dichos microorganismos a determinados factores que alteren la permeabilidad de su pared como por ejemplo la congelación, el calentamiento suave, la exposición a ácidos orgánicos, EDTA y otros quelantes, o a presiones hidrostáticas elevadas, se puede inducir la sensibilización de las células bacterianas y favorecer la actividad antimicrobiana (Kalchayanand y col., 1992 y 1998; Arqués y col., 2003).

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas se pueden clasificar en tres grupos de actividad teniendo en cuenta la variación de su espectro de acción antimicrobiano:

- (i). **Espectro de acción antimicrobiano reducido:** las bacteriocinas apenas son capaces de actuar contra cepas de la misma especie o frente a especies del mismo género como es el caso de las lactocinas A, B y M que solo tienen actividad frente a *Lactococcus* (Martínez-Cuesta y col. 2006).
  - (ii). **Espectro de acción antimicrobiano intermedio:** bacteriocinas que inhiben a otras BAL sin incluir al microorganismo productor y a otras bacterias Gram-positivas, incluyendo, ciertos patógenos como *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.
  - (iii). **Espectro de acción antimicrobiano amplio:** bacteriocinas capaces de inhibir otras especies como *Propionibacterium* spp. y *Bacillus* spp, además de las ya mencionadas anteriormente.
-

### 1.6.3. Modo de acción

La acción bactericida o bacteriostática de las bacteriocinas producidas por BAL depende de varios factores, como: (i) la concentración de la bacteriocina; (ii) el estado fisiológico de las células sensibles; y (iii) las condiciones experimentales del ensayo, entre las que destacan la composición de los medios, temperatura, el pH o la presencia de ciertos agentes o compuestos antimicrobianos que desestabilizan la pared o membrana celular de las células sensibles.

En general, la actividad de las bacteriocinas sobre microorganismos sensibles se lleva a cabo mediante la desestabilización funcional de la membrana citoplasmática de éstas, la cual se desarrolla en diferentes fases: en un primer instante, la bacteriocina interactúa con la membrana estableciendo interacciones electroestáticas entre ellas o mediante fijación a una molécula receptora (Figura 3). Las interacciones electroestáticas se establecen entre los residuos de las bacteriocinas cargados positivamente y los grupos de los fosfolípidos de la membrana cargados negativamente que se encuentran abundantemente en las membranas de las células sensibles (Eijsink y col., 2002; Drider y col., 2006), mientras que la formación de los poros se debe a la naturaleza hidrófoba-hidrófila de las bacteriocinas, lo que facilita su distribución a lo largo de la membrana. La formación de poros origina un flujo pasivo de pequeñas moléculas (iones, aminoácidos, ATP), lo que origina la disipación de la fuerza protón motriz (PMF, del inglés "*Proton Motive Force*") o de algunos de sus componentes (potencial de membrana y gradiente de pH). La alteración en la PMF, gradiente electroquímico necesario para el desarrollo de procesos metabólicos dependientes de energía, reduce el transporte de nutrientes y la síntesis de macromoléculas, como proteínas y ácidos nucleicos, originando la consiguiente muerte celular (Drider y col., 2006).

La inserción de las bacteriocinas en la membrana plasmática se debe a su capacidad de adoptar conformaciones espaciales en  $\alpha$  hélice o en  $\beta$  laminar y puede entenderse según los dos modelos descritos por Moll y col. (1999b): (i) el modelo "cuña", aplicable a la nisina y otros lantibióticos; (ii) y el modelo "duela de barril", aplicable a bacteriocinas de la clase II.

Según el modelo "cuña", la molécula se sitúa paralelamente a la membrana, empuja a las cabezas polares de los fosfolípidos hacia los lados, la membrana se adelgaza y el péptido adopta una orientación transmembrana y agrega con otros péptidos, formando un poro por el que pueden fluir iones. Por otro lado, el modelo "duela de barril" explica la inserción de los péptidos en la membrana, su agregación y el posterior "reclutamiento" de péptidos adicionales para formar poros. En estos poros, las caras hidrofílicas se dirigen hacia la luz del poro, mientras que las superficies hidrofóbicas interactúan con el núcleo hidrofóbico de la membrana.

Aunque se sabe que la Nisina requiere la presencia en la membrana del lípido II, precursor del peptidoglucano, para ejercer su actividad antimicrobiana máxima (Brötz y col., 1998), la existencia

de un receptor proteico específico que intervenga en el reconocimiento por la bacteriocinas de la célula sensible es una cuestión controvertida puesto que se ha demostrado que la nisina actúa creando poros en membranas que no contienen ninguna proteína (Eijsink y col., 2002). No obstante, puesto que no todas las células son sensibles a todas las bacteriocinas, debe existir alguna característica que determine su especificidad, aunque la existencia de bacteriocinas capaces de actuar en sistemas liposomales pone en duda la necesidad de receptores o componentes de membrana para desarrollar su actividad bacteriocinogénica.



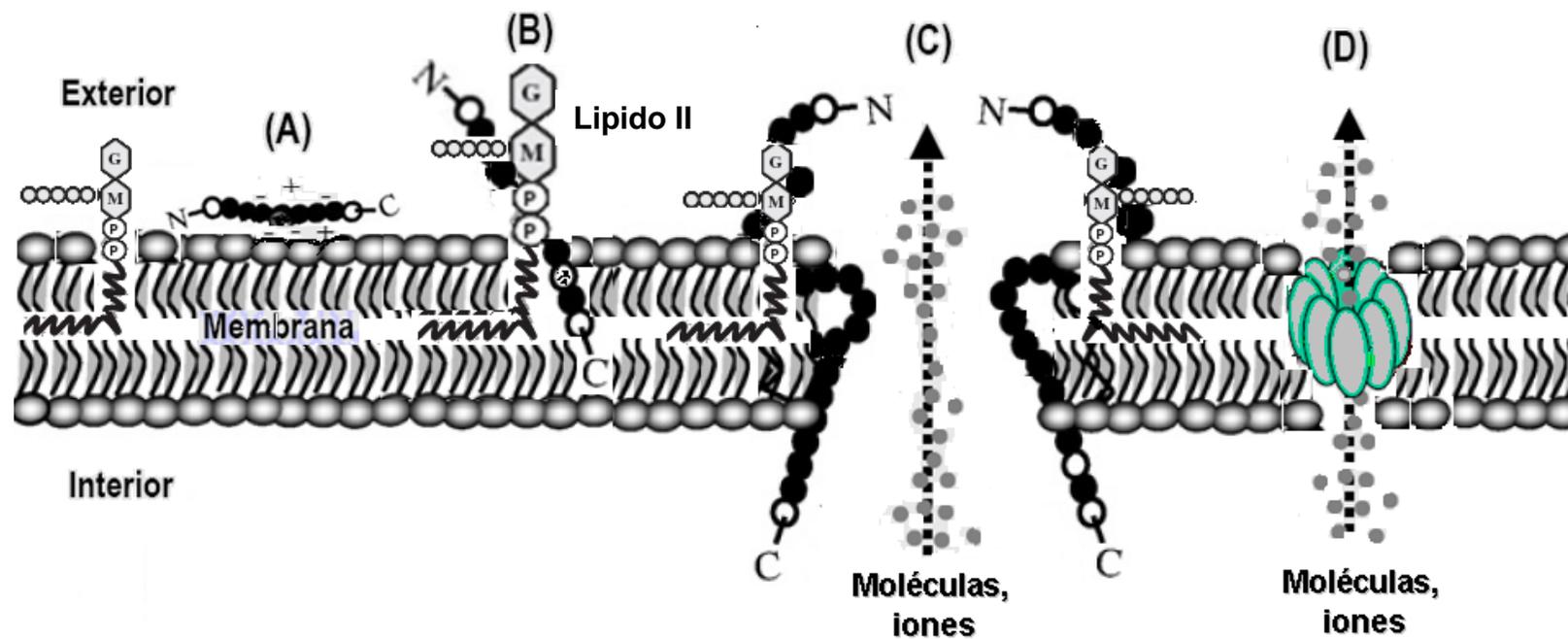


Figura 3. Mecanismo de acción de bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas

El mecanismo de acción de las bacteriocinas consta de tres fases: unión a la membrana (A), inserción en la misma (B) y formación de poros (C ó D). La unión de las bacteriocinas a la membrana se establece a través de interacciones electrostáticas entre los residuos de las bacteriocinas cargados positivamente y los grupos negativos de los fosfolípidos presentes en la membrana. Posteriormente, la naturaleza anfipática de las bacteriocinas facilita su distribución en la membrana, lo que provoca la formación de poros. Finalmente, la formación de poros origina un flujo pasivo de pequeñas moléculas que resulta en la disipación de la fuerza protón motriz. Los poros formados pueden ser de 2 tipos: en forma de duela de barril (D) o en forma de cuña (C)

#### 1.6.4. La Enterocina P, una bacteriocina sec-dependiente de la subclase IIa

##### ***Bacteriocinas de la clase II***

Las bacteriocinas de la clase II son péptidos de pequeño tamaño molecular (<10 KDa) que no contienen aminoácidos modificados (Oppegård y col., 2007), son termoestables, tienen un elevado punto isoeléctrico y un fuerte carácter catiónico hidrofílico. A su vez, teniendo en cuenta el número de residuos de cisteína (van Belkum & Stiles 2000, Eijsink y col., 2002), esta clase de bacteriocinas se organizan en los siguientes subgrupos:

- Subclase IIa
- Subclase IIb
- Subclase IIc

(a) **Subclase IIa** es un grupo muy grande y sus miembros se distinguen por tener una gran actividad contra *Listeria* y una homología en sus secuencias de aminoácidos, especialmente en la región N-terminal donde se encuentra la secuencia consenso **YGNGVXC** (Drider y col., 2006; Gillor y col., 2008). Por su homología, se conocen como bacteriocinas de la familia de las pediocinas, en alusión a la bacteriocina más estudiada de este grupo, tal es el caso de la pediocina PA-1 (Hugas y col., 2002).

(b) **Subclase IIb** se trata de bacteriocinas cuya actividad requiere de la acción complementaria de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana completa. En algunos casos, como es el de la lactococina G (Nissen-Meyer y col., 1992; Garneau y col., 2002) es necesaria la presencia de ambos péptidos para que la bacteriocina sea activa; mientras que en otros casos, aunque uno de los dos péptidos es activo por sí mismo, su actividad se ve aumentada

notablemente en presencia del otro péptido es el caso de la plantaricina S (Jiménez-Díaz y col., 1995) y la lactacina F (Allison y col., 1994),

(c) **Subclase IIc** se trata de bacteriocinas *sec*-dependientes con características peculiares, de las que podemos encontrar, por ejemplo, la acidocina 1B (Han y col., 2007).

Debido a que la enterocina P descrita en este trabajo es una bacteriocina de la subclase IIa, a continuación se describen las características más relevantes de esta subclase.

#### 1.6.5. Bacteriocinas de la subclase IIa

Las bacteriocinas de la subclase IIa son el grupo más amplio de bacteriocinas de la clase II (Gillor O y col., 2008). Todas las bacteriocinas de esta subclase muestran una intensa actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* así como hacia numerosos microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos, (p.e. *Brochotrix*, *Clostridium*, *Bacillus* y *Staphylococcus*) (Ennahar y col., 2000).

#### 1.6.6. Características estructurales

Las bacteriocinas de la subclase IIa contienen entre 37 y 58 aminoácidos y poseen un elevado grado de homología en sus secuencias aminoacídicas (50-70%), sobre todo en el extremo N-terminal (Oppegård y col., 2007; Gillor y col., 2008). Asimismo, todas las bacteriocinas de esta subclase comparten en su región N-terminal la secuencia consenso **KYYGNGVXCXKXXCXVD/NWXXA XXXI** (tabla 3), en la que los aminoácidos marcados en negrita son los más conservados (casi, en un 100%). Otra característica de las bacteriocinas de este grupo, a excepción de lo que sucede con la acidocina A, es la presencia de dos cisteínas que forman un enlace disulfuro en la parte N-terminal de la molécula. Además, las bacteriocinas divercina V41, enterocina A, pediocina PA-1, plantaricina 423 y sakacina G, contienen otros dos residuos cisteína en sus extremos C-terminal (tabla 3), lo que les faculta para formar 2 enlaces disulfuro, el primero, en el extremo N-terminal, y el segundo, en la región C terminal de su molécula.

Tabla 3. Secuencia aminoacidica de bacteriocinas de la subclase IIa producida por bacterias l

Bacteriocina	Secuencias aminoacidicas																																																									
Acidocina A	K	T	Y	Y	G	T	N	G	V	H	C	T	K	R	S	L	W	G	K	V	R	L	K	N	V	I	P	G	T	L	C	R	K	Q	S	L	P	I	K	Q	D	L	K	I	L	L	G	W	A	T	G	A	F	G	K	T	F	H
Bacteriocina 31	A	T	Y	Y	G	N	G	L	Y	C	N	K	Q	K	C	W	V	D	W	N	K	A	S	R	E	I	G	K	I	I	V	N	G	W	V	Q	H	G	P	W	A	P	R															
Bavaricina A	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	G	K	H	S	C	T	V	D	W	G	T	A	I	G	N	I	G	N	N	A	A	A	N	W	A	T	G	G	N	A	G																		
Bavaricina MN	T	K	Y	Y	G	N	G	V	Y	C	N	S	K	K	C	W	V	D	W	G	Q	A	A	G	G	I	G	Q	T	V	V	X	G	W	L	G	G	A	I	P	G	K																
Carnobacteriocina B2	V	N	Y	G	N	G	V	S	C	S	K	T	K	C	S	V	D	W	G	Q	A	F	Q	E	R	Y	T	A	G	I	N	S	F	V	S	G	V	A	S	G	A	G	S	A	G	R	R	P										
Carnobacteriocina BM1	A	I	S	Y	G	N	G	V	Y	C	N	K	E	K	C	W	V	D	K	A	E	N	K	Q	A	I	T	G	I	V	I	G	W	A	S	S	L	A	G	M	G	H																
Divercina V41	T	K	Y	Y	G	N	G	V	Y	C	N	S	K	K	C	W	V	D	W	G	Q	A	S	G	C	I	G	O	T	V	V	G	W	L	G	G	A	I	P	G	K	C																
Enterocina A	T	T	H	S	G	K	Y	Y	G	N	G	V	Y	C	T	K	N	K	C	T	V	D	W	A	K	A	T	T	C	I	A	G	M	S	I	G	G	F	L	G	G	A	I	P	G	K	C											
Enterocina P	A	T	R	S	Y	G	N	G	V	Y	C	N	S	K	C	W	V	N	W	G	E	A	K	E	N	I	A	G	I	V	I	S	G	W	A	S	G	L	A	G	M	G	H															
Lactococina MMFII	T	S	Y	G	N	G	V	H	C	N	K	S	K	C	W	I	D	V	S	E	L	E	T	Y	K	A	G	T	V	S	N	P	K	D	I	L	W																					
Leucocina A	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	T	K	S	G	C	S	V	D	W	G	E	A	F	S	A	G	V	H	R	L	A	N	G	G	N	G	F	W																					
Mesentericina Y105	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	T	K	S	G	C	S	V	D	W	G	E	A	A	S	A	G	I	H	R	L	A	N	G	G	N	G	F	W																					
Mundticina	K	Y	Y	G	N	G	V	S	C	N	K	K	G	C	S	V	D	W	G	K	A	I	G	I	G	N	N	S	A	A	N	L	A	T	G	G	A	A	G	W	S	K																
Pediocina PA-1	K	Y	Y	G	N	G	V	T	C	G	K	H	S	C	S	V	D	W	G	K	A	T	T	C	I	I	N	N	G	A	M	A	W	A	T	G	G	H	O	G	N	H	K	C														
Piscicolina 126	K	Y	Y	G	N	G	V	S	C	N	K	N	G	C	T	V	D	W	S	K	A	I	G	I	G	N	N	A	A	A	N	L	T	T	G	G	A	A	G	W	N	K	G															
Plantaricina 423	K	Y	Y	G	N	G	V	T	C	G	K	H	S	C	S	V	D	W	G	Q	A	F	S	C	S	V	S	H	L	A	N	F	G	H	G	K	C																					
Plantaricina C19	K	Y	Y	G	N	G	L	S	C	S	K	K	G	C	T	V	D	W	G	Q	A	F	S	C	G	V	N	R	V	A	T	A	G	H	G	K																						
Sakacina A	A	R	S	Y	G	N	G	V	Y	C	N	N	K	K	C	W	V	D	R	G	E	A	T	Q	S	I	I	G	G	M	I	S	G	W	A	A	S	G	L	A	G	M																
Sakacina G	K	Y	Y	G	N	G	V	S	C	N	S	H	G	C	S	V	D	W	G	Q	A	W	T	C	G	V	N	H	L	A	N	G	G	H	G	V	C																					
Sakacina P	K	Y	Y	G	N	G	V	H	C	G	K	H	S	C	T	V	D	W	G	T	A	I	G	N	I	G	N	N	A	A	A	N	W	A	T	G	G	N	A	G	W	N																
Sakacina X	K	Y	Y	G	N	G	V	S	C	N	K	S	G	C	S	V	D	W	S	K	A	I	S	I	I	G	N	N	A	V	A	N	L	T	T	G	G	A	A	G	W	K	S															

La secuencia consenso se indica con el sombreado en Azul oscuro, mientras que los residuos más conservados de la secuencia aminoacídica se representan con fuente en negrita. Los residuos cisteína del extremo C-terminal están indicados con el sombreado en azul claro. Fuente: Ennahar y col., 2000; Ferchichi y col., 2001;

Simon y col., 2002; Vaughan y col., 2003

### 1.6.7. Métodos de detección de las Bacteriocinas

Las técnicas empleadas en la detección, identificación, y cuantificación de las bacteriocinas pueden dividirse en dos grandes grupos: (I) pruebas fenotípicas, basadas en la expresión de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas frente a microorganismos diana y (II) pruebas genéticas, que se basan en la detección de secuencias específicas de genes estructurales de bacteriocinas ya caracterizadas, mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección del gen responsable de la producción de la bacteriocina.

#### 1.6.7.1. Pruebas fenotípicas

Las pruebas biológicas constituyen, habitualmente, el primer paso para la detección de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas. Los bioensayos más empleados son la prueba de difusión en agar (ADT, del inglés "*Agar well Difussion Test*") y los métodos de turbidimetría, basados en la inhibición del desarrollo de un microorganismo sensible inoculado en una placa de microtiter (MPA, del inglés "*Microtiter Plate Assay*") (Cintas y col., 2000). La cuantificación de la actividad antimicrobiana se realiza empleando "unidades arbitrarias" (UA), en la prueba de difusión en placas de agar, ó "unidades de bacteriocina" (UB), cuando el bioensayo utilizado es la prueba turbidométrica. Ambos parámetros se definen como la inversa de la mayor dilución de una muestra que produce inhibición del microorganismo indicador inoculado en el agar o que inhibe el crecimiento en un 50% del microorganismo indicador en las placas microtituladoras. Sin embargo, a pesar de ser pruebas útiles y sensibles, ambas pruebas tienen inconvenientes que las convierten en poco fiables y reproducibles (Blom y col., 1997):

1. La cuantificación de la actividad antimicrobiana no es objetiva y depende del grado de sensibilidad de la cepa indicadora.
2. Son pruebas inespecíficas, es decir, no permiten discriminar la participación de otras posibles sustancias con actividad antimicrobiana.

#### 1.6.7.2. Pruebas genéticas

Las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o de hibridación ADN-ADN, (*Southern blotting*) son pruebas genéticas de uso rutinario que permiten determinar si una bacteria posee el gen para codificar la producción de una determinada bacteriocina (Cintas. y col., 1997) Estas pruebas tienen entre sus ventajas la elevada sensibilidad y especificidad, lo que permite determinar fácilmente la presencia del gen estructural de una bacteriocina conocida en un número elevado de cepas, además de la posibilidad para relacionar o comparar este gen con el de otras

---

cepas de la misma especie (figura 4). Sin embargo, la técnica tiene la inconveniente de no permitirnros conocer su producción en el organismo hospedador y cuantificar la misma.

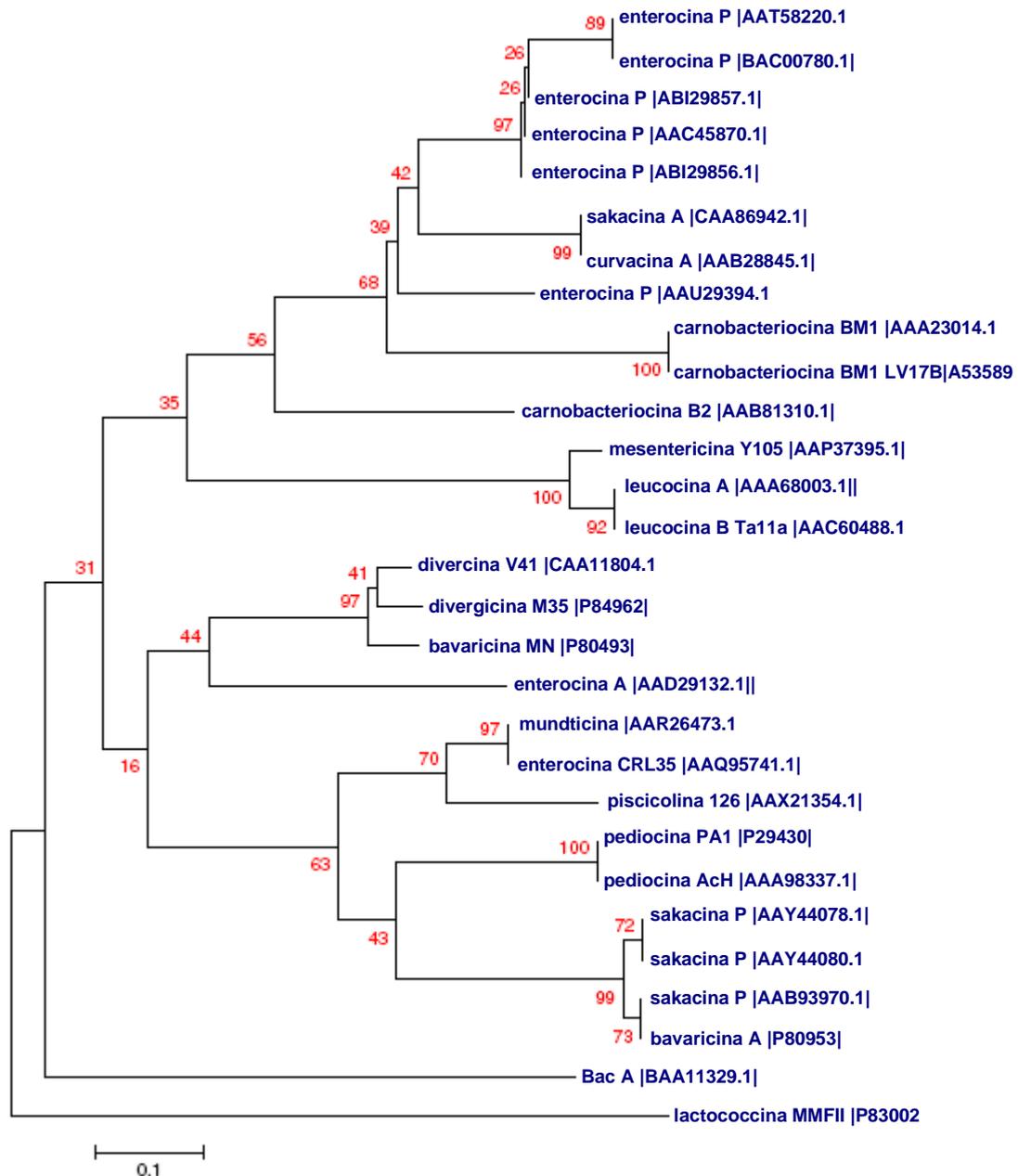


Figura 4. Relación filogenética entre bacteriocinas de la clase IIa obtenida por el método neighbor-joining con el software MEGA 3 después de un alineamiento múltiple de secuencias con el CLUSTAL X (1.82).

La mayoría de las bacteriocinas están agrupadas en dos grandes clusters. Enterocinas P, sakacina A y carnobacteriocinas, mesentericinas, y leucocinas están agrupadas en un mismo cluster. Un

grupo compuesto por Bavaricina A, Divergicina, Bavaricina MN y Enterocina A, y un segundo grupo incluyendo Mundticina, Enterocina CRL35, y Piscicolina 126 por un lado y Pediocinas, Sakacina P y Bavaricina A. A pesar del hecho de pertenecer a las bacteriocinas de la clase IIa, Bac A y Lactococcina MMFII aparecen como bacteriocinas fuera de ambos clusters. Fuente (Calo-Mata y col., 2008).

### 1.7. Métodos rápidos de identificación de microorganismos

Los métodos microbiológicos tradicionales basados en pruebas fenotípicas y bioquímicas son laboriosos, lentos e implican el empleo de una gran variedad de ensayos, siendo los resultados de identificación a nivel de especie no concluyente en ocasiones. Estos métodos son además de una lentitud incompatible con el proceso de elaboración, distribución y comercialización de los alimentos, sobre todo de los muy perecederos. Esto ha provocado el desarrollo de métodos rápidos para detectar, identificar y enumerar los microorganismos presentes en los alimentos (Entis y col. 2001) y así tener una idea, al menos aproximada, de la calidad microbiológica del alimento en un breve espacio de tiempo.

A continuación se describe algunos de estos métodos que se emplea para la identificación de microorganismos:

- Métodos basados en reacciones bioquímicas y enzimáticas.
- Métodos basados en reacciones antígeno-anticuerpo.
- Métodos basados en los ácidos nucleicos.

#### 1.7.1. Métodos basados en reacciones bioquímicas y enzimáticas.

##### 1.7.1.2. Pruebas miniaturizadas de identificación.

Las pruebas bioquímicas y enzimáticas se han utilizado desde el comienzo de la bacteriología para estudiar la actividad metabólica y así poder identificar los diferentes microorganismos. Actualmente existen diversos kits miniaturizados de diagnóstico; de entre ellos pueden entresacarse los siguientes:

- "Enterotube II" (Roche Diagnostics): Galería de 15 pruebas bioquímicas para identificación de enterobacteriaceas.

- "Oxi/Ferm Tube" (Roche diagnostics): Similar al anterior. Se utiliza para la identificación de bacterias gram negativas no fermentadoras.

- API (BioMerieux): Galería con distintas pruebas bioquímicas para la identificación de distintas bacterias (20E, enterobacteriaceas; NFT, gram negativas no enterobacteriaceas; CAMP, *Campylobacter* spp.; Staph-IDENT, estafilococos y micrococos; 20A, anaerobios; 50CH,

*Lactobacillus*; 20C, levaduras; STREP, estreptococos y CORYN, *Corynebacterium*), ver Figura 5 como ejemplo.

- ATB (BioMerieux): Galería con 32 sustratos para la identificación de microorganismos anaerobios, estafilococos, micrococos, levaduras, enterobacterias, estreptococos y bacilos gram negativos.

- Minitek (Becton Dickinson Microbiology): consiste en discos impregnados con diferentes sustratos.

- BBL Crystal (Becton Dickinson Microbiology): consta de 30 pruebas diferentes.

- Micro ID (Organon Teknika): consta de 15 pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias gram (-).

- RapID One System (Remel): galería con 20 pruebas bioquímicas para la identificación de diferentes bacterias.



Figura 5. Galería API CH50 para la caracterización bioquímica de bacterias lácticas

### 1.7.2. Métodos basados en reacciones antígeno-anticuerpo.

El desarrollo de los anticuerpos monoclonales ha permitido un gran auge de las técnicas inmunológicas, de tal forma que éstas pueden aplicarse con cierta facilidad en la detección e identificación de microorganismos. Entre los métodos basados en reacciones antígeno-anticuerpo utilizados en microbiología pueden citarse:

- 1- Inmunofluorescencia,
- 2- Aglutinación en látex,
- 3- Inmunoimmobilización,
- 4- Inmunoprecipitación,

- 5- Separación inmunomagnética o el enzimoimmunoensayo (ELISA), del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*.

Todas estas técnicas tienen una gran especificidad y, algunas de ellas, muy alta sensibilidad, existiendo numerosas referencias en las que se señala su empleo con gran eficacia en la detección e identificación de patógenos en diferentes productos alimentarios (Jance y kokosková, 2009; kokosková y col., 2010; Steinmetzi y col., 1999; Abdel-Hamid y col. 1999).

### 1.7.3. Métodos basados en los ácidos nucleicos

Los métodos fenotípicos son especialmente inapropiados para la identificación de bacterias lácticas debiendo ser complementados con métodos moleculares adecuados para obtener una identificación más fiable. Contrariamente a los métodos fenotípicos, la identificación y caracterización molecular es mucho más consistente, rápida, fiable, reproducible y puede además discriminar entre grupos de especies estrechamente relacionadas, y que de otra manera serían indistinguibles en base a pruebas fenotípicas. La gran ventaja de estas técnicas radica en el gran poder discriminatorio y en su aplicabilidad universal.

Las técnicas moleculares comúnmente empleadas para la identificación de bacterias lácticas se pueden dividir en cuatro grupos: Métodos no basados en la PCR, Métodos basados en la PCR, métodos basados en la combinación de los dos anteriores y secuenciación.

A continuación pasaremos a describir cada una de las técnicas en cuanto a la capacidad discriminatoria de estos métodos cuyos ejemplos de su empleo se resumen en la tabla 4.

#### 1.7.3.1 Métodos no basados en la PCR

##### 1.7.3.2. Hibridación del ADN

La técnica está basada en el uso de sondas u oligonucleótidos sintetizados con secuencias de entre 20-200 nucleótidos para el reconocimiento y unión a una cadena complementaria del ADN o de ARN diana. La sonda más a menudo usada es la diseñada para los genes tanto del 16S como del 23S rARN, pero las sondas basadas en el gen del 16S rARN son más empleadas por ser este gen de pequeño tamaño (1.5 knt) en comparación con los genes del 23 rARN (2.3 knt). Por otro lado, para la identificación precisa de especies de bacterias lácticas de diferentes orígenes se han empleado sondas de oligonucleótidos específicas a la especie en cuestión para discriminarla de otras usando el gen del 16S rARN (Albano y col., 2009).

Las sondas pueden marcarse mediante isótopos radiactivos, sustancias fluorescentes, enzimas o anticuerpos. Dependiendo de la naturaleza del marcaje se establece el sistema de detección (película radiográfica, sustratos específicos o reacciones inmunológicas). Esta técnica

puede ser muy específica dependiendo de la secuencia de ADN diana usada. Sin embargo, ésta requiere de aproximadamente  $10^5$ - $10^6$  copias del ADN diana, por lo que, es importante una determinada cantidad de la muestra.

### 1.7.3.3. Reacción en la cadena de polimerasa (PCR o RCP).

La PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*, consiste en la creación de múltiples copias de un fragmento de ADN o ARN diana utilizando secuencias cortas de nucleótidos (cebadores) complementarios a las secuencias localizadas en los extremos 5' del fragmento mediante el empleo de una ADN polimerasa resistente a la temperatura en una secuencia de reacciones cíclicas hasta obtener una gran cantidad de copias del fragmento de ADN diana.

Esta es una técnica rápida, muy sensible, que permite la detección incluso de una copia de ADN diana, cuya especificidad, al igual que en la hibridación, depende de la secuencia amplificada. Ésta puede ser específica de una bacteria o común a un determinado grupo de especies bacterianas.

La PCR se ha utilizado para la identificación de bacterias lácticas en carne (Audenaert y col., 2010), en queso (Benito y col., 2008), salchichas (Bonomo y col., 2008).

La necesidad del diseño y adquisición de las sondas, que deben ser particularizadas para cada especie o grupo de bacterias a detectar; la presencia en los alimentos de posibles inhibidores; así como la imposibilidad de conocer exactamente si el ADN o ARN amplificado proviene de microorganismos vivos o inactivados por algún tratamiento, pudiendo generar falsos positivos (Fung 1997) son algunos de los inconvenientes que se pueden señalar a este procedimiento.

#### 1.7.3.3.1 *Secuenciación genética del gen 16S ARN*

El análisis de la secuencia genética de fragmentos de ADN es usada para proporcionar información sobre la secuencia nucleotídica del fragmento de ADN. El análisis de la secuencia es también usado para proporcionar una identificación segura del amplicon clonado. Varios son los métodos empleados para determinar las secuencias. Una serie de programas son empleados para comparar la secuencia amplificada con otras secuencias que están disponibles en las bases de datos de internet. Generalmente, estos programas buscan homología proporcionada por el BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La información proporcionada en las secuencias rARN suele ser efectiva para una identificación comparativa de microorganismos, llevando al reconocimiento de muchas especies microbianas, incluidas las especies de bacterias lácticas. Sin embargo, la secuenciación de ADN es generalmente cara y requiere un alto grado de eficiencia técnica para ser realizada. Sin embargo, el gen 16S rARN permite una relativamente buena discriminación de

---

especies bacterianas estrechamente relacionadas. Otros genes diana, presentes en una simple copia en las bacterias, tal como: el factor elongación gen Tu (*tuf*) (Ventura et al., 2003); el gen *recA* (Felis and Dellaglio, 2005); el gen de la subunidad b de la ARN polimerasa (*rpoB*) (Rantsiou et al., 2004); el gen HSP60 (*cpn60*) (Dobson et al., 2004), han sido explorados para diferenciar especies de bacterias lácticas (Ventura et al., 2003). Blaiotta y col. (2008) designó un par de cebadores para una secuenciación directa a partir de secuencias del gen *hsp60* de *Lactobacillus* spp, mostrando que el gen *hsp60* puede ser considerado un excelente marcador molecular para inferir la taxonomía y filogenia de los miembros del género *Lactobacillus*. Muy recientemente, a partir de múltiples muestras de bacterias se ha desarrollado metodología para la identificación de *Lactobacillus* basada en el gen *tuf*. (Poltronieri et al., 2008).

#### **1.7.3.4. Análisis del Polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN.**

Este método consiste en la digestión del ADN genómico con endonucleasas de restricción apropiados, seguida de una separación por electroforesis convencional en geles de agarosa o en campo pulsante (que es tratado en el apartado siguiente) de los fragmentos generados que consisten en perfiles complejos de bandas. La selección de una enzima de restricción apropiada o un par de enzimas de restricción, en su caso, es importante para obtener perfiles verdaderos. El análisis comparativo de estos perfiles se efectuará con un software de interpretación de los perfiles resultantes y que podrán ser usados para diferenciar cepas que estén estrechamente relacionadas. Esta técnica tiene un gran poder de discriminación entre cepas estrechamente relacionadas. La obtención de diferentes perfiles de fragmentos indicará una diferencia entre los organismos, sin embargo la obtención de perfiles similares no necesariamente indicarán que las cepas son iguales. Los fragmentos de ácidos nucleicos compartiendo el mismo tamaño pueden tener una diferencia substancial con respecto a su estructura primaria (González y col., 2005). Esta técnica ha sido aplicada para diferenciar cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* y *L. reuteri* (Ahrné y Molin, 1997; Stahl y Molin, 1994).

#### **1.7.3.5. Macrorrestricción de ADN y Electroforesis en campo pulsante (PFGE)**

Un elemento crucial de esta técnica es la selección de la enzima de corte. El uso de una enzima de restricción poco común para una determinada especie reduce el número de fragmentos de ADN (McCartney, 2002). Para cada especie bacteriana, podemos encontrar enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, o sea, enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y secuencia, se encuentran de forma rara a lo largo del ADN cromosómico de la cepa bacteriana en cuestión (Goering, 1993). El uso de este tipo de enzimas permite la macrorrestricción del ADN de la

---

bacteria, o sea, la división del ADN en 10 y 30 fragmentos, la mayoría de ellos de gran tamaño, más de 40kb, difíciles de separar por electroforesis convencional, en la que no se aplica un campo eléctrico constante ó estático, sino que se requieren técnicas sofisticadas en las que la orientación del campo eléctrico sea variable periódicamente, denominadas técnicas de electroforesis en campo pulsante o *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) para separar los fragmentos largos de ADN (McCartney, 2002).

Estas técnicas combinadas, Macrorrestricción de ADN y separación de los fragmentos por PFGE se aplican con mucha frecuencia en estudios bacteriológicos, obteniéndose fragmentos de restricción sencillos que representan el ADN cromosómico de las bacterias, representadas por unos pocos fragmentos con movilidades electroforéticas diferentes (Zapparoli y col 1998). Sin embargo, las características de estas técnicas determinan una serie de cambios a tener en cuenta en las diferentes fases del proceso de macrorrestricción y PFGE:

- I) El protocolo de extracción de ADN, obliga a inmovilizar las células bacterianas en bloques de agarosa, en los que se llevará a cabo la lisis, de manera que el ADN cromosómico también quede embebido en agarosa, cuyo objetivo es que el ADN permanezca íntegro y no se fraccione accidentalmente (durante el pipeteo, agitación, etc.), lo cual distorsionaría los patrones de restricción y podría afectar a la reproducibilidad de la técnica.
- II) la restricción del ADN debe hacerse directamente en los bloques de agarosa, utilizando enzimas de baja frecuencia de corte.
- III) la técnica de electroforesis usada para la separación de los fragmentos debe ser una PFGE.

Los fragmentos de ADN obtenidos dependen de la especificidad de la enzima de restricción usada y de la secuencia genómica bacteriana y por consiguiente de las características particulares de la especie bacteriana o cepa.

#### *Fundamentos de la técnica*

Al aplicar un campo eléctrico, las moléculas de ADN migran en dirección paralela al campo, a través de los poros de agarosa del gel. Si se aplica un segundo campo eléctrico con una dirección distinta, las moléculas de ADN tienen que cambiar su conformación y reorientarse antes de migrar en la dirección del segundo campo. El tiempo requerido para la reorientación, está en relación con la longitud de la molécula ó su peso molecular, o sea, cuando mayor sea el fragmento, más tiempo requerirá para reorientarse, debido a la barrera física que supone la matriz de agarosa y menos tiempo migrará a través del gel en la nueva dirección. A medida que los intervalos de los campos

van cambiando en función de la intensidad y del voltaje, las moléculas de ADN van migrando a lo largo del gel en forma rectilínea, obteniéndose al final un patrón de separación de los fragmentos que refleja la suma de todos los intervalos de campos que se han aplicado (Birren, 1993).

Estas técnicas de PFGE normalmente requieren altos voltajes durante muchas horas, lo que hace necesaria la recirculación y refrigeración del tampón de electroforesis.

La electroforesis en campo pulsante es una técnica altamente discriminatoria y reproducible, esta técnica ha sido utilizada para diferenciar cepas de bacterias. Este tipo de electroforesis facilita la separación de fragmentos de alto peso molecular generados por restricción del genoma para un número menor de fragmentos.

#### **1.7.3.6. Análisis del polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados con cebador aleatorio/ Random Amplified Polymorphic ADN (RAPD-PCR).**

El análisis, del polimorfismo de los fragmentos de ADN obtenidos mediante cebador aleatorio también conocida como RAPD, ha sido extensamente señalada como un método rápido, sensible y barato para el tipado genético de diferentes cepas de bacterias lácticas (Ben Amor y col., 2007). La PCR se realiza con un solo cebador de secuencia nucleotídica de no más de 10 pb., con un contenido de GC de 50-80 % para la amplificación arbitraria del ácido desoxirribonucleico genómico (ADN), generando perfiles de fragmentos específicos de la cepa, cuyo número de fragmentos de ADN amplificados es dependiente del iniciador y del ADN genómico empleados. Las condiciones de la reacción de PCR limitan el tamaño de los fragmentos obtenidos entre 100-3000 pb.

Esta técnica genera huella genética, sin buscar ningún fragmento específico de ADN ya que el cebador se hibridiza "al azar", es decir, en secuencias complementarias de ubicación desconocida. Esta técnica fue propuesta inicialmente por Williams y col. (1990) al utilizar este procedimiento en el mapeo del genoma en organismos vegetales, asignando el nombre RAPDs a los productos obtenidos. Al mismo tiempo, Welsh y McClelland (1990) desarrollaron esta metodología para aplicaciones de fingerprinting denominándolos AP-PCR (arbitrarily primed PCR), finalmente Caetano-Anolles y col. (1991) los nombraron DAF (DNA amplification fingerprinting). Las diferencias en la denominación de estos marcadores dependen de las condiciones específicas de la reacción de amplificación o de la separación y detección de los productos amplificados.

En la reacción, el cebador es mezclado con el ADN genómico, en presencia de una ADN polimerasa y un tampón buffer adecuado. La técnica requiere alta estandarización de los parámetros experimentales como por ejemplo, la longitud y secuencia del cebador, las condiciones de reacción y del equipamiento empleado (termociclador), parámetros estos que han de ser

---

estrictamente controlados para obtener los patrones de bandas reproducibles (Bartowsky y col., 2003; González y col., 2005).

La concentración del ADN diana es una de las variables más importantes. Durante las extracciones de ADN se obtienen muestras con diferente pureza y concentración de éste, lo que hace necesario optimizar la concentración de ADN en cada amplificación que se realice. Una cantidad elevada da como resultado extensiones de ADN cuyos fragmentos no son definidas, pero una cantidad escasa, hace la técnica poco reproducible (Williams y col., 1993; Randazzo y col., 2009).

Por otro lado, estudios realizados por Zhou y Jiao (2004) demostraron que la concentración de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) es también factor importante ya que pueden afectar el resultado de los perfiles. Estos autores observaron que una variación en la concentración por encima y por debajo de 0,4 mmol/l de dNTPs en la mezcla de la reacción, reducía el perfil de los RAPD, mientras cuando mantenían la concentración de 0,4 mmol/l se obtenían perfiles más claros que los obtenidos con la variación de la concentración tanto por exceso como por defecto.

La concentración de iones magnesio en la reacción y la temperatura de anillamiento son también factores importantes pues, pueden afectar el número y la intensidad de las bandas amplificadas, si se incrementa la temperatura de anillamiento tienden a suprimirse algunos perfiles, debido a que se aumenta la especificidad del sitio de unión del cebador a la cadena diana, desapareciendo las bandas de baja intensidad (Caetano-Anolles & Bassam, 1993; Randazzo y col., 2009). También, los patrones de amplificación serán distintos si se utilizan diferentes polimerasas (Schierwater & Ender, 1993).

Por último, el cebador, elevadas cantidades producen extensiones de ADN en las que resulta difícil hacer una distinción clara de los fragmentos amplificados. Sin embargo, las bajas concentraciones de éste, al igual que la de los nucleótidos trifosfato, dificultan su detección (Munthali y col., 1992, Williams y col., 1993, Randazzo y col., 2009). La longitud de la secuencia al igual que un cambio en la secuencia nucleotídica del cebador hará variar el perfil de los productos amplificados. Cuanto menor sea el número de nucleótidos que conforman el cebador, mayor número de fragmentos amplificados se va a general y vice-versa. Mientras que un cambio en la secuencia de nucleótidos del cebador va a generar perfiles diferentes, aunque el número puede ser idéntico.

Hay que destacar que de la naturaleza de las secuencias de ADN que son amplificadas por la técnica de RAPD poca información se puede obtener acerca de ellas ya que cabe la posibilidad de que algunas secuencias que se obtienen sean repetidas a lo largo del genoma. En teoría, los sitios de unión para la amplificación están relacionados con la complejidad del genoma, estando

---

indistintamente distribuidos a lo largo de éste (Williams y col., 1990, Reiter y col., 1992; Quiros y col., 1995).

Es un método simple, rápido, barato, y se ha hecho popular ya que no requiere un conocimiento previo de la secuencia del genoma a amplificar, es un método universal aplicable a cualquier secuencia genómica, donde los polimorfismos existentes entre las cepas o especies analizadas son detectados mediante una electroforesis, como diferencias entre los patrones de fragmentos de ADN amplificados (Welhs & McClelland, 1990; Williams y col., 1990; Steindel y col., 1994). Este método es práctico para una discriminación de bacterias a nivel intra e inter-especies, permite además hacer un estudio de los cambios en la composición de la microbiota según la variación de las condiciones impuestas (Bonomo y col., 2008).

#### *Fundamentos de amplificación de los RAPD*

El fundamento de esta técnica es similar al de la PCR, con la particularidad de utilizar cebadores o iniciadores aleatorios, sin embargo, dos niveles de modulación para el proceso de los RAPD han sido postulados por Caetano-Anolles y col., en 1992:

1.- La elección de los sitios de amplificación es dependiente de la secuencia del cebador y puede verse influenciada por las condiciones de reacción. En el transcurso de los primeros ciclos, el cebador "busca" los posibles sitios de unión en el ADN y se une a ellos. Una vez unido el cebador se activa la polimerasa con la consecuente extensión de las cadenas de ADN complementarias a la cadena simple. Así, en la primera rueda de amplificación, se selecciona un conjunto de sitios posibles para producir una determinada cantidad de productos de amplificación. Estos productos deberían ser entonces eficientemente amplificados desde la secuencia complementaria a la del cebador.

2.- En el segundo nivel de modulación, los productos de amplificación resultantes poseen una región terminal simétrica de, al menos, la longitud del cebador. Estos fragmentos son repetidamente amplificados en cada uno de los ciclos de la PCR.

Según Andersen y col, 1996, la presencia de bandas muy intensas en el patrón de amplificación se debe a una mayor similitud entre las secuencias del ADN y la del cebador, o a que estas secuencias estén varias veces repetidas a lo largo del genoma.

#### **1.7.3.6. Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados/Amplified fragment-length polymorphism (AFLP).**

Esta técnica fue introducida por primera vez por Vos y col. (1995) para plantas y posteriormente usada para diversificar bacterias de importancia clínica (Valsangiacomo y col.,

---

1995). Esta técnica es de alta reproducibilidad y combina Restricción de ADN y amplificación con PCR y cuenta con tres etapas: (i) digestión celular total del ADN con dos enzimas de restricción y el ligado de adaptadores específicos para los sitios de restricción de todos los fragmentos, (ii) la amplificación selectiva de los fragmentos con dos cebadores para la PCR los cuales tienen un adaptador correspondiente y sitios de restricción de las secuencias, (iii) la separación de los productos de la PCR mediante electroforesis de gel de poliacrilamida (PAGE). La presencia de bases degeneradas en los cebadores influye en el número de fragmentos que se van a obtener así como el poder discriminatorio de los patrones. Esta técnica fue descrita por autores como aplicable para caracterizar especies de bacterias lácticas (Kunene y col., 2000)

#### **1.7.3.7. Estudio de los patrones de restricción de amplicones de ADN**

La combinación de una amplificación específica de una región concreta con un análisis del polimorfismo de los fragmentos de dicha región normalmente da como resultado perfiles de baja complejidad. En principio esta aproximación puede ser empleada para un análisis comparativo de cualquier región de ADN genómico que presente secuencias diana comunes para los microorganismos de elección.

El hecho de que el rADN está altamente conservado facilita el diseño general de los cebadores, sin embargo juega en contra de que exista una amplia variedad de patrones. De este modo, el poder discriminatorio está limitado en muchos casos para esta técnica, empleando como diana espacios intergénicos de genes del rARN lo cual permite la diferenciación de cepas muy próximas genéticamente. Esta metodología es popular para la diferenciación de bacterias productoras de ácido acético (Kretova y Grones, 2005; Yukphan et al., 2006; Gullo et al., 2006; Malimas et al., 2006). En cualquier caso los patrones de las cepas obtenidos mediante esta técnica son frecuentemente sobrevalorados e interpretados de forma errónea con respecto a su relevancia filogenética. De este modo la potencial relevancia filogenética no puede ser postulada sin la asignación previa del microorganismo a un grupo filogenético dado. Estos patrones de restricción en sí mismos sólo dan pues información para la diferenciación de cepas. De cualquier forma esta metodología ha sido superada por los modernos métodos de secuenciación de rADN, que dan mucha más información a efectos de identificación y asignación filogenética.

Tabla 4: Métodos moleculares usados en la discriminación de especies

Especies identificadas	Origen	Método usado	Resultado	Referencias
Grupo <i>L. casei</i> ( <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. zeae</i> )	Queso	PCR con oligonucleotidos específicos para las especies (16S rRNA region V1), RAPD	Buena discriminación en ambas técnicas	Ward y Timmins (1999)
<i>L. sakei</i> , <i>B. thermosphacta</i> , <i>Leuc. lactis</i> , <i>Lc. Lactis</i> , <i>Leuc. Mesenteroides</i> , <i>Enterococcus sp. Ped. Acidilactici</i> , <i>L. brevis</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>Lc. lactis</i> BMG, <i>L. curvatus</i> ,	Salchichas	DGGE de la PCR con primers del 16S rRNA	Discriminatorio para todas cepas según producto y procesado	Albano y col. (2008)
<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> (ambas subespecies), <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. zeae</i> ,	Probiót. de productos comerciales, cultivos tipo y cepas de referencia	Análisis y comparación de secuencias de 318 pb. del gen rec A	Satisfactorio, una discriminación clara de todas las cepas en diferentes ramas; identificación de <i>L. casei</i> ATCC 393 y <i>L. casei</i> ATCC 334 como <i>L. zeae</i> y <i>L. paracasei</i> , respectivamente	Felis y col. (2001)
<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. zeae</i> , <i>L. rhamnosus</i>	Cepas de referencia Mucosas e intestinosl intestinal humana	TTGE de amplicones del 16S rRNA región (U1-U2) (Posición 8-357 <i>E. coli</i> )	Buena discriminación con excepción de <i>L. casei</i> ATCC 393 y <i>L. casei</i> NCFB 173; no fue posible discriminar entre <i>L. casei</i> y <i>L. paracasei</i>	Chavagnat et al. (2002)



## CAPITULO 2

### Objetivos





---

## OBJETIVOS

Durante 2001 y 2002 se realizó en el Laboratorio de Higiene, Inspección y Control Alimentario de la Facultad de Veterinaria de Lugo un proyecto de investigación aplicada que involucró el estudio de la vida útil de carne de ganado vacuno envasada mediante un nuevo método de envasado al vacío en "segunda piel" (*Darfresh*<sup>®</sup>). Se realizaron diversos ensayos tras lo cual se puso de manifiesto la extensión de la vida útil de la carne empleando este procedimiento en relación a la carne envasada al vacío mediante una metodología tradicional. Esta metodología de envasado incluía la deposición de láminas de film plástico sobre el producto a temperaturas por encima de 100 °C, lo cual fue considerado el origen de dicha extensión de la vida útil de la carne. Sin embargo la magnitud de dicha extensión así como otras características del producto no quedaban totalmente explicadas por ese hecho.

Al tiempo que se había realizado este proyecto, se había realizado el aislamiento de un gran número de Bacterias Acido Lácticas que fueron mantenidas en congelación y que fueron aisladas siguiendo una sistemática de ambos tipos de producto (envasado al vacío tradicional y en *Darfresh*<sup>®</sup>) de las cuales se pudo recuperar alrededor de 100, siendo la mitad aproximadamente de cada método de envasado.

Con todo lo anterior se planteó en su momento la investigación de dichos aislados con el objetivo de clarificar algunos de los resultados que habían sido puestos de manifiesto durante los estudios de envasado empleando *Darfresh*<sup>®</sup> y envasado clásico al vacío. Es decir, la caracterización de dicha colección de cepas para ver características que pudieran ser de interés al objeto de un posible empleo posterior, al mismo tiempo que explicaban lo observado en el envasado *Darfresh*<sup>®</sup>. Durante este proceso, una vez que se ponían a punto diversas metodologías para la caracterización de dichas cepas, estas metodologías eran aplicadas a otras cepas procedentes de otros estudios que también se llevaban a cabo paralelamente en el Laboratorio de Higiene Inspección y Control Alimentario.



## CAPITULO 3

### Resultados





---

## RESULTADOS

### 3.1. Análisis de los polimorfismos de un solo nucleótido en el gen estructural de la enterocina P en cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de alimentos de origen animal no fermentados

Durante la realización de este trabajo han sido caracterizadas bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas aisladas a partir de muestras de carne y pescado frescos no fermentados. En concreto, para la realización de este trabajo fueron elegidas dos cepas productoras de bacteriocinas (una de origen cárnico y otra obtenida a partir de pescado) con alta actividad frente a *Listeria monocytogenes*.

Dichas cepas productoras de bacteriocinas fueron identificadas en ambos casos como *Enterococcus faecium*, y la máxima producción de bacteriocinas por parte de estas cepas se detectó durante la fase estacionaria de crecimiento.

La actividad de las bacteriocinas producidas por dichas cepas de *E. faecium* frente a *L. monocytogenes* se mantuvo estable dentro de un rango de pH entre 3-7 y se mantuvo asimismo estable en ambas cepas después de calentar a 100° C, e incluso tras calentarlas a 121 °C durante 15 minutos. Se detectaron en ambas cepas los genes que codifican la producción de enterocina P, se aisló dicho gen, y se secuenciaron dichos genes en ambas cepas de *E. faecium*. En estos genes aislados a partir de *E. faecium* se encontró una homología ADN/ADN de entre un 87,1% y un 97,2% con respecto a otros genes P de cuatro enterocinas que habían sido encontradas y publicadas previamente por otros autores.

Asimismo, se detectaron en una de las cepas de *E. faecium* investigadas (LHICA 28-4) tres polimorfismos de un único nucleótido. En concreto, fueron detectados dichos polimorfismos en las posiciones 45 (G / A), 75 (A / T), y 90 (T / C). Este hecho puede significar que los genes detectados durante el desarrollo de este trabajo sean diferentes a los anteriormente encontrados por otros autores. Además, según nuestro conocimiento, mediante este trabajo, se ha descrito por primera vez la producción de enterocina P por parte de *E. faecium* en productos alimenticios no fermentados. Cabe señalar también como hecho destacado que en el caso de la cepa *E. faecium* LHICA 51, hemos demostrado el primer caso de producción de enterocina P producida por una bacteria ácido-láctica aislada a partir de productos de la pesca.

Link para acceder al artículo: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.200600178/pdf>

---



### 3.2. Caracterización molecular y estudio probiótico de cepas de *Enterococcus faecium* productoras de bacteriocinas aisladas de alimentos de origen animal no fermentados

El objetivo del presente trabajo consistió en la caracterización de cuatro nuevas cepas de enterococos productoras de bacteriocinas, aislado a partir de alimentos de origen animal no fermentados, con el fin de que una vez aisladas dichas cepas, pudiésemos evaluar su potencial aplicación como probióticos en los alimentos crudos y elaborados.

Para este objetivo se llevó a cabo la secuenciación del gen 16S rRNA, así como el análisis de polimorfismos de fragmentos de ADN amplificados aleatoriamente, mediante la técnica comúnmente conocida como RAPD-PCR. Dicho análisis permitió la identificación y agrupación intraespecífica de cepas de *Enterococcus faecium*, que producen bacteriocinas que inhiben el crecimiento de cuatro especies bacterianas patógenas de origen alimentario y alterantes de dichos los alimentos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *Carnobacterium maltaromaticum*). Además, dichas cepas de *E. faecium* mostraron una capacidad probiótica importante, dado que demostraron ser capaces de sobrevivir a pHs extremos (en torno a 3), así como a la presencia de sustancias potencialmente inhibitoras del crecimiento bacteriano con las que puede tener en contacto dentro del tracto gastrointestinal, como son las sales biliares, la pancreatina y la pepsina, así como una excelente capacidad de adhesión a las superficies, tales como las metales inoxidables.

Las cepas de *E. faecium* evaluadas no mostraron ser productoras de hidrolasas capaces de deteriorar las sales biliares, ni mostraron actividad hemolítica alguna. No obstante, si mostraron sensibilidad a los agentes antimicrobianos clínicamente relevantes, por lo que además de sus efectos beneficiosos, no jugarán papel alguno en la transmisión de genes de resistencia a antimicrobianos a otros microorganismos presentes en la microbiota intestinal.

En conclusión, la secuencia de ADN del gen 16S rRNA y análisis mediante la metodología RAPD-PCR fueron igualmente discriminatorias para la tipificación de cepas de *E. faecium*. Este trabajo también confirmó la tolerancia potencial y la supervivencia de las cepas de *E. faecium* aisladas de alimentos de origen animal no fermentados en el tracto gastrointestinal, y supone el primer informe sobre posibles cepas probióticas de *E. faecium* aislados a partir de carne no fermentada y productos de la pesca. Su resistencia al calor moderado abre el camino para su posible uso como probióticos en los alimentos mínimamente procesados sometidos a un tratamiento térmico moderado.

Link para acceder al artículo:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2009.04327.x/full>



### 3.3. Caracterización molecular de bacterias ácido-lácticas aisladas a partir de carne de ternera envasada al vacío de modo tradicional y mediante un sistema avanzado

Para este trabajo se aislaron un total de 91 cepas de bacterias ácido-lácticas (LAB) a partir de 50 muestras de carne de ternera, de las cuales 25 fueron envasadas al vacío de modo tradicional y 25 fueron envasadas mediante un sistema de vacío avanzado. Los aislamientos fueron identificados a través de la secuenciación del ADN ribosomal 16S, mientras que la caracterización de las LAB se realizó mediante la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD-PCR) y su posterior análisis cluster.

Fueron identificadas cepas pertenecientes a diez especies bacterianas diferentes, en concreto: *Enterococcus gilvus* (22 aislamientos), *E. faecium* (9 aislamientos), *E. casseliflavus* (8 aislamientos), *E. faecalis* (4 aislamientos), *E. malodoratus* (3 aislamientos), *E. devriessei* (3 aislamientos), *Lactobacillus sakei* (15 aislamientos), *Carnobacterium divergens* (12 aislamientos), *C. maltaromaticum* (5 aislamientos) y *Leuconostoc mesenteroides* (8 aislamientos).

Los perfiles de bandas de ADN obtenidas no revelaron diferencias significativas, con las excepciones de *E. casseliflavus*, *E. faecalis* y *E. faecium*, sugiriendo que el tipo de envasado no tiene un efecto específico en la selección de la mayor parte de la microbiota presente en la carne envasada. Por lo tanto, las diferencias observadas en trabajos anteriormente realizados por nuestro grupo investigador referentes a las diferencias en las cualidades sensoriales y en la vida útil de la carne de ternera envasada y conservada en los dos sistemas empelados, no puede imputarse a la selección de una microbiota diferente en ambos tipos de carne. Dichas diferencias deben ser estudiadas más en profundidad y atribuidas a otros factores en trabajos posteriores.

**Link para acceder al artículo:**

<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19476337.2011.604136#.VG9CL8t0zIU>



### 3.4. Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Beef Stored on Vacuum-Packaged and Advanced Vacuum Skin Packaged System

Un total de 91 bacterias ácido lácticas que fueron aisladas de carne empaquetada empleando vacío tradicional (42 cepas) o bien un sistema avanzado de envasado a vacío "segunda piel" (49 cepas) fueron caracterizadas tecnológicamente en base a los siguientes parámetros: producción de gas, actividad proteolítica, actividad lipolítica, producción de peróxido de hidrógeno, producción de histamina, producción de bacteriocinas, actividad hemolítica y resistencia térmica.

No se encontraron diferencias significativas de la mayoría de los parámetros analizados, con la excepción de un número significativo de cepas productoras de bacteriocinas que fueron detectadas en la colección de aislados obtenidos mediante el sistema avanzado de envasado al vacío "segunda piel". Sin embargo no se encontraron cepas productoras de dichas sustancias en la colección de cepas obtenidas de carne envasada mediante el sistema tradicional de envasado al vacío.

Las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de carne envasada mediante el sistema de envasado "segunda piel" también mostraron una mayor resistencia térmica que las bacterias ácido lácticas aisladas de la carne empaquetada mediante el sistema de vacío tradicional. De este modo, en ensayos de determinación del valor D, o tiempo de reducción decimal, a 55 °C, las cepas aisladas del sistema de envasado "segunda piel" arrojaron un valor D medio de 14,09 minutos frente a los 11,17 minutos determinados para el caso de las cepas aisladas de la carne empaquetada al vacío con el sistema tradicional. Análogamente a 60 °C el valor fue de 6,87 minutos para el caso del sistema avanzado "segunda piel" frente a 4,69 minutos para las cepas obtenidas de la carne empaquetada mediante el tradicional de vacío.

Este estudio ha comparado las características tecnológicas de las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de carne empaquetada mediante estos dos tipos de sistemas de empaquetado tradicional al vacío y "segunda piel". Estudios previos han puesto de manifiesto el hecho de que la carne envasada mediante este último sistema tiene una mayor vida útil. Aunque la mayoría de los parámetros tecnológicos determinados en las bacterias ácido lácticas aisladas de la carne empaquetada mediante estos dos métodos no muestran diferencias significativas, la existencia de un cierto número de cepas productoras de bacteriocinas así como la mayor resistencia térmica dentro de la colección de cepas obtenidas de la carne envasada mediante el sistema avanzado de envasado al vacío "segunda piel" podrían explicar la mayor vida útil de la carne empaquetada mediante este sistema.

Link para acceder al artículo:

<http://omicsonline.org/open-access/technological-characterization-of-lactic-acid-bacteria-isolated-from-beef-stored-on-vacuumpackaged-and-advanced-vacuum-skin-packaged-system-2157-7110.1000338.php?aid=27478>





## CAPITULO 4

### Discusión





---

## DISCUSIÓN GLOBAL

En trabajos precedentes desarrollados por nuestro grupo de Investigación se ha podido determinar la mayor vida media de productos envasados mediante sistemas avanzados de envasado al vacío en "segunda piel" empleando *Darfresh* tanto para el caso del envasado de carne fresca (Barros-Velázquez, et al 2003, Vázquez, et al 2004), como para el caso del envasado de alguna especie de pescado (Pérez-Alonso, F. et al 2004). Otros autores también han corroborado las bondades relacionadas con este sistema de envasado (Lagersted et al 2011). Sin embargo a pesar de poder establecer con cierta claridad la mayor extensión de la vida útil de estos productos mediante el empleo de este sistema avanzado de envasado, el origen preciso de esta mayor extensión de la vida útil no está del todo clarificado.

A partir de los trabajos de Barros-Velázquez y Vázquez se obtuvieron un total de 91 cepas de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) aisladas de carne envasada al vacío tradicional y envasada con el sistema *Darfresh*<sup>®</sup>. La principal idea que parecía interesante investigar entonces, era buscar qué aspectos caracterizaban a la microbiota que de una u otra forma se había seleccionado a partir de las condiciones creadas por el sistema de envasado *Darfresh*<sup>®</sup>, y ver cuáles de sus propiedades nos guiaban cara a entender la mayor durabilidad de la carne envasada mediante este avanzado método de envasado.

Se iniciaron entonces una serie de pruebas que en las últimas décadas han sido puestas de manifiesto como de vital importancia para justificar la protección que las BAL ofrecen a los alimentos fermentados en los que con frecuencia se encuentran: una de estas pruebas es la determinación de la producción de bacteriocinas o sustancias con un efecto antagonico frente a patógenos como pueden ser *Listeria monocytogenes* o *Staphylococcus aureus*. Pronto se pudo constatar la existencia de cepas de enterococos aisladas de carne envasada mediante el sistema *Darfresh*<sup>®</sup> productoras de estas sustancias, siendo en un primer momento el método de determinación de carácter fenotípico. También paralelamente otras cepas de enterococos obtenidas de pescado fresco manipulado en nuestro laboratorio fueron halladas como productoras de bacteriocinas. Un aspecto básico lo supuso el hecho de no ser cepas que se encontraron en alimentos fermentados (Arlindo et al 2006), sino aisladas a partir de alimentos conservados, y sin las características típicas de los productos fermentados. Dado el interés suscitado ya en un primer momento al respecto de este hallazgo, se aborda la identificación más precisa de estas cepas y también la identificación a nivel molecular del tipo de bacteriocina que se trataba. Dado que se trataba de enterococos, ya se pensó inicialmente en la producción de las bacteriocinas típicas de *Enterococcus* como son las enterocinas. Se llevó a cabo esta identificación mediante el empleo de la reacción en cadena de la

---

polimerasa con el uso de cebadores específicos para determinar la producción de estas sustancias como son: EntA, EntB, EntL50, EntL50 (2), EntQ, ORF, y mun1. El uso de estos cebadores permitió en su momento descartar la presencia de la enterocina A, enterocina B, enterocina L50A, enterocina L50B, enterocina Q, mundticina KS, y enterocina CRL35. Sin embargo, el empleo de los cebadores EntP y EntP2 permitieron la visualización de productos de amplificación de 120 y 132 pares de base (pb), confirmando la presencia de la estructura del gen de la enterocina P en cepas obtenidas de carne y pescado.

Un análisis pormenorizado de estas secuencias identificadas, ha permitido profundizar en la caracterización molecular del mecanismo genético de producción de enterocina P por estas cepas, al identificarse la presencia de tres SNPs (Single Nucleotide Polimorphism) o polimorfismos de un único nucleótido, que no se traducen en un cambio de la secuencia de los aminoácidos, encontrándose dichos SNPs en las posiciones 45 (G/A), 75 (A/G), y 90 (T/C). La coexistencia de dos nucleótidos en dicho loci encontrados en este estudio para el gen estructural de la enterocina P de la cepa de *Enterococcus faecium* LHICA 28-4, puede explicar la coexistencia de dos genes codificantes de la enterocina P en la misma cepa, probablemente asociados a diferentes plásmidos. De hecho, Abriouel *et al* (2006) detectaron también la existencia de plásmidos que codifican para la enterocina P. Además, estos autores descubrieron que estas dos copias del gen estructural de la enterocina P, pueden coexistir en dos plásmidos diferentes de ca. 26 y 35–38 kb en cepas de *E. faecium* UJA6, UJA8, UJA9 y cepa UJA13. Sin embargo, estos autores no aportaron secuencias para verificar qué partes de dichos genes codificantes para la producción de enterocinas P son similares y qué partes no lo son.

El aislamiento y caracterización de cepas de BAL productoras de bacteriocinas puede constituir un interesante avance para el descubrimiento de nuevas cepas de *Enterococcus* que pueden ser empleadas como probióticos. Por esto, se procedió a realizar otros estudios para evidenciar el potencial como probióticos de las cepas productoras de enterocinas aisladas de carne envasada mediante el sistema *Darfresh*<sup>®</sup> y de pescado conservado, cuyas secuencias genéticas fueron caracterizadas en el trabajo precedente de **Arlindo et al (2006)**. Para elucidar el potencial de una cepa, al objeto de ser empleada como probiótico, es necesario llevar a cabo estudios suplementarios de caracterización. En este sentido, hay que tener en cuenta la acidez del estómago y la acción de la pepsina, ya que son conocidas como barreras efectivas contra la entrada y supervivencia de bacterias en el tracto intestinal (Huang y Adams 2004). En general el pH del estómago varía de 2,5 a 3,5 (Huang y Adams 2004), por lo que encontrar cepas capaces de soportar dichas condiciones de acidez sigue siendo un desafío a día de hoy. En este sentido, valores de pH comprendidos en los rangos de 1 a 5 han sido considerados para evaluar *in-vitro* la

tolerancia al ácido de ciertas especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* con efecto probiótico (Huang y Adams 2004). Los resultados obtenidos en nuestro estudio (Hosseini et al 2009) indican que todas las cepas estudiadas resisten un pH de 4.0, sufren una ligera reducción a pH 3.0 y no se observa supervivencia a pH 2.0. Dichos resultados son similares a los obtenidos por otros autores, los cuales no observaron células viables en otras bacterias probióticas a pH 2.0 (Zarate y col. 2000; Huang y Adams 2004; Klingberg y col. 2005; Paramithiotis y col. 2006). Sin embargo, la combinación de los probióticos con ciertos ingredientes de los alimentos puede mejorar la viabilidad de estos microorganismos a su paso por el estomago, puesto que ejercen un efecto protector a modo de escudo, incluso contra el ataque de la pepsina-(Charteris y col. 1998; Wang y col. 1999; Zarate y col. 2000; Huang y Adams 2004).

Las bacterias que hayan superado la barrera gástrica tienen que resistir también en su tránsito por el intestino, que constituye una segunda barrera para los probióticos. Dado que el pH del intestino delgado está en un rango de entre 7.0 a 8.5 (Thomson y col. 2003), aunque es favorable para la supervivencia de los probióticos, se debe de tener en cuenta en este tránsito la presencia de pancreatina y sales biliares que pueden tener un efecto negativo sobre los probióticos. Por eso, para la selección de bacterias como probióticos para las personas, varios autores recomiendan testar su resistencia a varias concentraciones de estas sustancias así como a diferentes pHs (Gilliland y col. 1984). En nuestro estudio, las 4 cepas empleadas resultaron ser resistentes al efecto de las sales biliares. Además, todas demostraron ser muy resistentes al efecto de la pancreatina a pH 3.0, aunque una pequeña reducción en la viabilidad se observó tras 4 horas de exposición. Resultados similares habían sido observados también para la pepsina a pH 3.0. Estos resultados indican que las cuatro cepas pueden resistir a la acción de la pepsina y pancreatina durante su tránsito por el tracto gastrointestinal. Estos resultados son considerablemente destacables, pues son los primeros que aparecen en la literatura científica. Avalan un muy prometedor uso de estas cepas de *Enterococos* como probióticos.

La capacidad de las bacterias probióticas para adherirse a las superficies es un factor importante y requerido para la colonización del sustrato (Alander y col. 1997) y constituye también una condición para la exclusión competitiva de los entero-patógenos (Alander y col. 1997; Forestier y col. 2001; Lee y col. 2003), además de brindar inmunidad al hospedador (Ouweland y col. 1999; Plant y Conway 2002). Por lo tanto, hemos examinado *in-vitro* la capacidad de las 4 cepas reseñadas para adherirse a la superficie de un metal inoxidable (Giaouris y col. 2005; Paramithiotis y col. 2006). Los resultados obtenidos en nuestro estudio (Hosseini et al 2009) demuestran que las 4 cepas poseen una capacidad de adhesión *moderada*, lo que en la escala indica su capacidad para

---

adherirse a la mucosa del tracto gastro-intestinal, resultando beneficioso el poder desplazar por competencia la microbiota indeseable.

Paralelamente, (junto con el estudio de las cepas productoras de bacteriocinas que han arrojado características muy reseñables y han sido objeto de las dos primeras publicaciones de esta tesis) se ha trabajado en la caracterización de las 91 cepas aisladas de la carne. Para ello, y de forma tradicional en microbiología, se llevó a cabo una caracterización bioquímica mediante kits miniaturizados. Sin embargo el empleo de métodos fenotípicos, como el estudio de características como por ejemplo la fermentación de los azúcares, han sido acusados por algunos autores de ser métodos poco fiables y que puede dar lugar en ocasiones a resultados erróneos (Albano y col., 2009). Por eso a continuación se realizó también la identificación mediante la secuenciación del gen del 16SrRNA, mediante el empleo de los cebadores universales propuestos por Mc Cabe *et al* (1999). Igualmente, para estudiar los distintos genotipos y elucidar la posible presencia de clones de bacterias específicas de un sistema de envasado concreto, se estudiaron los distintos genotipos mediante el empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa empleando un cebador aleatorio (RAPD-PCR), el cual se ha reconocido como un método viable para la identificación de especies de BAL (Kostinek et al 2005, Catzeddu et al 2006). En nuestro caso el cebador empleado M13 había sido propuesto por Andrighetto *et al* (2001). Los géneros *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* representaron la microbiota existente aislada tanto de muestras de carne envasada en vacío tradicional como envasada mediante el sistema *Darfresh*<sup>®</sup> (Samuel et al 2011), siendo *Enterococcus* el género dominante en ambos tipos de envasado. Este predominio en la carne fresca ya había sido observada por otros autores (Yost y Natress, 2002, Jones, 2004, Chenoll, 2006). Sin embargo, a pesar de que se ha podido caracterizar toda la microbiota, el análisis de los *clusters* de cepas caracterizadas mediante RAPD-PCR y agrupadas usando el método de media aritmética no ponderada, o bien el análisis filogenético a partir de las secuencias obtenidas del gen 16SrRNA, no ha permitido arrojar suficiente luz sobre el hecho de que a nivel molecular o genético se pueda determinar la presencia de ciertos Géneros bacterianos, especies, clones o grupos de bacterias más adaptados a alguno de los dos sistemas de envasado de carne de los que se han aislado las cepas originalmente. Si bien unas pocas cepas de *Enterococcus gilvus* han mostrado idénticos perfiles de RAPD-PCR en el mismo sistema de envasado, esto no es suficiente para sugerir una selección de un tipo de microbiota específica, puesto que también algunas cepas de *E. gilvus*, *C. divergens* y *L. mesenteroides* mostraron genotipos idénticos para ambos tipos de envasado. Por todo esto, la caracterización genética de las cepas con las sistemáticas empleadas, no permite justificar que el envasado seleccione un tipo de microbiota específica que sea

---

---

responsable de características como la mayor vida útil de la carne envasada mediante el sistema *Darfresh*<sup>®</sup>.

Dadas las especiales características del sistema de envasado *Darfresh*<sup>®</sup>, en donde el empaquetado se hace mediante un film plástico que es precalentado a temperaturas por encima de los 100 °C (Barros-Velazquez et al 2003), y que inmediatamente se deposita suavemente sobre la superficie de la carne, conlleva un tratamiento térmico en la superficie de la carne que sin duda debería de incidir en la microbiota presente allí. Por eso también se consideró, dentro de la caracterización fenotípica de las cepas BAL estudiadas en la presente tesis Doctoral, el hacer otras pruebas adicionales como es la estimación de la resistencia térmica (Miranda et al 2014), conjuntamente con otras típicas pruebas de determinación del carácter homo o heterofermentativo, actividad proteolítica, y lipolítica, y producción de peróxido de hidrógeno. Se hipotetizó que alguna de estas pruebas quizás podrían arrojar datos que ayudasen a responsabilizar a la microbiota de la mayor durabilidad de la carne empaquetada mediante el sistema *Darfresh*<sup>®</sup>. Los datos obtenidos para el carácter proteolítico o lipolítico de las cepas, no arrojaron resultados concluyentes que pudieran diferir entre las cepas aisladas a partir de uno u otro tipo de empaquetado. Sin embargo, caso aparte lo supuso la resistencia térmica, medida como el valor D a 60 °C y a 55 °C, en donde se apreciaron diferencias significativas entre las cepas obtenidas a partir de cada uno de los métodos de empaquetado. La mayor resistencia térmica se obtuvo con las cepas aisladas de carne empaquetada mediante el sistema *Darfresh*<sup>®</sup>: 14,09 minutos frente a 11,17 minutos a 55 °C y 6,87 minutos frente a 4,64 minutos a 60 °C.

Probablemente acompañando a la mayor resistencia térmica que muestran las cepas aisladas de carne envasada en *Darfresh*<sup>®</sup>, vayan otras características como muy bien pudiera ser la producción de bacteriocinas lo cual de algún modo podría justificar la mayor conservabilidad de la carne envasada mediante este sistema. De hecho estas dos características (mayor resistencia térmica y mayor número de cepas productoras de bacteriocinas) son las que diferencian ambos grupos de cepas.



## CAPITULO 5

### Conclusiones





---

## CONCLUSIONES

1) Se ha conseguido identificar por primera vez cepas de enterococos productores de bacteriocinas (Enterocina P) procedentes de productos no fermentados de origen animal, carne y pescado. El estudio molecular de los mecanismos de producción de estas bacteriocinas permitió determinar la existencia de polimorfismos de un único nucleótido, así como establecer la coexistencia de varios genes productores de bacteriocinas en una misma cepa bacteriana.

2) Las cepas productoras de bacteriocinas aisladas de muestras de carne y pescado no fermentados mostraron unas características de resistencia a sales biliares, pepsina, pancreatina, pH ácido, así como una tolerancia al calor, y capacidad de adhesión y resistencia a antimicrobianos que permiten considerarlas como potenciales candidatos para su posible empleo como probióticos.

3) Se han caracterizado a nivel molecular colecciones de cepas de Bacterias Acido Lácticas procedentes o bien de carne fresca envasada al vacío mediante un método tradicional o bien mediante un sistema avanzado de envasado al vacío en segunda piel, empleando secuenciación del gen 16S RNA, así como mediante amplificación polimórfica al azar empleando cebador aleatorio (M13). La amplificación polimórfica al azar empleando el cebador M13 permitió la caracterización de los diferentes clones de los distintos géneros aislados, no permitiendo discernir ningún clon característico de ninguno de los dos sistemas de envasado. El género predominante entre los identificados en ambas colecciones de cepas fue *Enterococcus*, seguido de *Lactobacillus*, *Carnobacterium* y *Leuconostoc*.

4) La caracterización tecnológica de las cepas de Bacterias Acido Lácticas obtenidas de carne envasada ha arrojado diferencias significativas en el número de cepas productoras de bacteriocinas que siempre fueron identificadas a partir de carne fresca envasada mediante un sistema avanzado de envasado al vacío en segunda piel. Asimismo se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de Bacterias Acido Lácticas en relación a su resistencia térmica, siendo significativamente más altos los valores medios de los tiempos de reducción decimal en la colección de bacterias aisladas de la carne envasada mediante un sistema avanzado de envasado al vacío en segunda piel tanto a 55 como a 60 °C. Estos resultados podrían en parte explicar la mayor durabilidad observada en la carne envasada en mediante el sistema avanzado de envasado en segunda piel puesta de manifiesto en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación.

---



## CAPITULO 6

### Bibliografía





---

**BIBLIOGRAFIA**

- **Abdel-Hamid, I., Ivnitski, D., Atanasov, P. y Wilkins, E.** 1999. Highly sensitive flow-injection immunoassay system for rapid detection of bacteria. *Analytica Chimica Acta*. 399, 99–108.
- **Aguirre, M. y Collins, M. D.** 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*. 75, 95-107.
- **Ahrné, S. y Molin, G.** 1997. Restriction endonuclease analysis of total chromosomal DNA of *Lactobacillus*. *Microecology and Therapy*. 26, 27–30.
- **Albano, H., Henriques, I., Correia, A., Hogg, T. y Teixeira, P.** 2008. Characterization of microbial population of 'Alheira' (a traditional Portuguese fermented sausage) by PCR-DGGE and traditional cultural microbiological methods. *Journal of Applied Microbiology*. 105, 2187–2194.
- **Allison, G. E., Fremaux, C. y Klaenhammer, T.R.** 1994. Expansion of the bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *Journal of Bacteriology*. 176, 2235-2241.
- **Ammor, S. M. y Mayo, B.** 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*. 76, 138–146.
- **Andersen, B, Thrane, U, Svendsen, A. y Rasmussen, I.A.** 1996. Associated field mycobiota on malt barley. *Canadian Journal of Botany*. 74, 854–8.
- **Arlindo, S., Calo, P., Franco, C., Prado, M., Cepeda, A. y Barros-Velazquez, J.** 2006. Single nucleotide polymorphism analysis of the enterocin P structural gene of *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Molecular Nutrition and Food Research*. 50, 1229–1238.
- **Arqués, J. L., Rodríguez, E., Tomillo, J., Gaya, P., Nuñez, M. y Medina, M.** 2003. Tratamientos combinados de altas presiones y bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en la inactivación de patógenos. En: Bacteriocinas de bacterias lácticas en la mejora de la calidad de los alimentos. Pag: 181-192. Medina M., M. Nuñez. INIA, Madrid.
- **Audenaert, K, D'Haene, K., Messens, K., Ruysen, T., Vandamme, P. y Huys, G.** 2010. Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*. 27, 12–18.

- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjöberg, A., Aamisalo, K., Björkroth, J., Mattila-Sandholm, T., y Korkeala, H. 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Applied Environmental Microbiology*. 65, 150–155.
- Awaisheh, S.S. y Ibrahim, S.A. 2009. Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria against different pathogens found in vacuum-packaged meat products. 6, 1125-1132.
- Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. En "Lactic Acid Bacteria". Pag: 1-72. Salminen, S. y A. Von Wright. Eds. Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J. y Lindgren, S.E. 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2, 131-136.
- Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M. y Hugas, M. 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and non-pathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 4583–4594.
- Aymerich, T., Picouet, P.A. y Monfort, J.M. 2008. Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*. 78, 114–129.
- Barkocy-Gallagher, G.A., Arthur, T.M., Rivera-Betancourt, M., Nou, X., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L. y M. Koochmariaie. 2003. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. *Journal of Food Protection*. 66, 1978–1986.
- Barros-Velázquez, J., Carreira, L., Franco, C. M., Fente, C. A., Vázquez, B. I. y Cepeda, A. 2003. Microbiological and physico-chemical properties of fresh retail cuts of beef packaged under an advanced vacuum skin system and stored at 4°C. *Journal of Food Protection*. 66, 2085–2092.
- Bartowsky, E. J., Xia, D., Gibson, R. L., Fleet, G. H. y Henschke, P.A. 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 36, 307–314.
- Beaufort, A., Cardinal, M., Le-Bail, A. y Midelet-Bourdin, G. 2009. The effects of superchilled storage at -2 degrees C on the microbiological and organoleptic properties of cold-smoked salmon before retail display. *International Journal of Refrigeration*. 32, 1850–1857.

- Belcher, J. N. 2006. Industrial packaging developments for the global meat market. *Meat Science*. 74, 143–148.
- Ben Amor, K., Vaughan, E. E. y De Vos, W. M. 2007. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *The Journal of Nutrition*. 137, 741S–747S.
- Benito, J. M., Serradilla, J. M., Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Pérez-Nevado, F. y Córdoba, G. M. 2008. Rapid differentiation of lactic acid bacteria from autochthonous fermentation of Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*. 80, 656–661.
- Bibel, D.J. 1988. Elie Metchnikoff's bacillus of long life. *American Society for Microbiology News*. 54, 661-665.
- Birren, B. y Lai, E. 1993. Pulsed-field gel electrophoresis: a practical guide. Academic press. Inc., San Diego, California.
- Blaiotta, G., Fusco, V., Ercolini, D., Aponte, M., Pepe, O. y Villani, F. 2008. Lactobacillus strains diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 208–215.
- Blom, H., Katla T., Hagen, B. F. y Axelsson, L. 1997. A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*. 38, 103-109.
- Blom, H., Nerbrink, E., Danty, R., Hagtvedt, T., Borch, E., Nissen, H.Y. y Nesbakken, T. 1997. Addition of 2.5% lactate and 0,25% acetate controls growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged, sensory-acceptable servelat sausage and cooked ham stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*. 38, 71-76.
- Bodwell, C.E. y Anderson, B.A. 1986. Nutritional composition and value of meat and meat products. En: *Muscle as Food. Food Science and Technology* (eds.). P.J. Bechtel. Series ed. B.S. Schweigert. *Academic Press, Inc. New York*.
- Boerema, J.A., Broda, D.M. y Bell, R.G. 2003. Abattoir sources of psychrophilic clostridia causing blown pack spoilage of vacuum-packed chilled meats determined by culture-based and molecular detection procedures. *Letter in Applied Microbiology*. 36, 406-411.
- Bonomo, M.G., Ricciardi, A., Zotta, T., Parente, E. y Salzano, G. 2008 Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy) *Meat Science*. 80, 1238–1248.
- Borchers, T.A., Selmi, C., Meyers, J.F., Keen, L. C. y Gershwin, E. M. 2009. Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*. 44, 26–46

- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 66, 185-189.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. 2000. Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of fuet sausage. *Journal of Food Protection*. 63, 237-243.
- Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla M.L., Garriga, M. y Vidal-Carou, M.C. 2005. Aminas biogénicas en productos cárnicos: un repaso a su origen, importancia y control. *Eurocarne*, 141.
- Brody, A. L. 1996. Integrating aseptic and modified atmosphere packaging to fulfill a vision tomorrow. *Food Technology*. 50, 56-66.
- Brody, A. L., Bugusu, B., Han, J. H., Koelsch, C. y McHugh, T. H. 2008. Innovative food packaging solutions. *Journal of Food Science*. 73, 107-116.
- Broome, M.C.; Krause, D.A. y Hickey, M.W. 1990. The use of non-starter lactobacilli in Cheddar cheese manufacture. *Australian Journal of Dairy Technology*. 45, 67-73.
- Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G. y Sahl, H-G. 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular Microbiology*. 30, 317-327
- Brul, S., y Coote, P. 1999. Preservative agents in foods—Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. 50, 1-17.
- Caballero-Franco C, Keller K, De Simone C, y Chadee K. 2007. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*. 292, G315-G322.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., y Gresshoff, P.M. 1992. Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. *Molecular and General Genetics*. 235, 157-165.
- Caetano-Anolles, G., y Bassam, B.J. 1993. DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. *Applied Biochemical and Biotechnology*. 42, 189-200.
- Calo-Mata P., Samuel A., Boehme K., Trinidad de Miguel, Pascoal A. y Barros-Velazquez J. 2008. Current Applications and Future Trends of Lactic Acid Bacteria and their Bacteriocins for the Biopreservation of Aquatic Food Products. *Food Bioprocess Technology*. 1, 43-63.

- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda S., y Vignolo G. 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*. 79, 483–499.
- CE. 1995. European Directive 95/2/CE relative to food additives other than colors and sweeteners. *Official Journal* L61, 1-40.
- Chamba, J. F., Duong, C., Fazel, A., y Prost, F. 1994. Sélection des souches de bactéries lactiques. En: *Bactéries lactiques*. H. de Roissart y F. M. Luquet (eds.) Loriga, France. Pag: 499-521.
- Chang, V. P., Mills, E. W., y Cutter, C. N. 2003. Reduction of bacteria on pork carcasses associated with chilling method. *Journal of Food Protection*. 66, 1019–1024.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. y van der Donk, W.A. 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Review*. 105, 633–684.
- Chavagnat, F., Haueter, M., Jimeno, J., y Casey, M. G. 2002. Comparison of partial tuf gene sequences for the identification of lactobacilli. *FEMS Microbiology Letters*. 217, 177–183.
- Chen, G. y Xiong, Y.L. 2008. Shelf-stability enhancement of precooked red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) tails by modified CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> gas packaging. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, disponible online.
- Chen, X., Xu, J., Shuai, J., Chen, J., Zhang, Z. y Fang W. 2007. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*. 115, 307-312.
- Chen, Y., Ross, W., Scott, V. y Gombas, D. 2003. *Listeria monocytogenes*: Low levels equal low risk. *Journal of Food Protection*. 66, 570–577.
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F. y Hernández, P. E. 2001a. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*. 7, 281-305.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Håvarstein, L. S., Hernández, P. E. y Nes, I. F. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel secdependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 4321–4330.
- Cintas, L.M., Casaus P. y Hernández P.E. 2000. Bacterias lácticas de origen alimentario: consideraciones taxonómicas y filogenéticas. *Alimentaria*. Diciembre. Pag: 61-70.

- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. y Hernández P.E. 2001. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Revisión *Food Science and Technology International*. 7, 281–305.
- Cocolin, L., Foschino, R., Comi, G. y Fortina, M. G. 2007. Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiology*. 24, 752–758.
- Cornforth, D. y Hunt, M. 2008. Low-oxygen packaging of fresh meat with carbon monoxide. Meat quality, microbiology, and safety. AMSA White Paper Series, Number 2. Pag: 1-10. *American Meat Science Association, Savoy, Illinois, USA*.
- Corr, S.C., Li, Y., Riedel, C.U., O'Toole, P.W., Hill, C. y Gahan, C.G.M. 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA*. 104, 7617–7621.
- Cotter, P.D., Hill, C., y Ross, P.R. 2005b. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3, 777 – 788.
- Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*. 43, 164–167.
- Dahl, TA, Midden, WR y Hartman, PE. 1989. Comparison of killing of Gram negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *Journal of Bacteriology*. 171, 2188-2194.
- Dainty, R. H., Shaw, B. G., y Roberts T. A. 1983. Microbial and chemical changes in chill stored red meats, Pag: 151–178. In T. A. Roberts and F. A. Skinner (eds.), *Food microbiology: advances and prospects*. Academic Press, London, England.
- Dainty, R. H., y Mackey, B. M. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology*. 73, 103S–114S.
- De Vuyst, L. y Vandamme, E. J., 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. Pag: 91 – 141. En: De Vuyst, L. y Vandamme, E. J. (eds.) *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Blackie Academic & Professional, U.K. Pag: 221
- Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C. y Janssens, D. 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En: *Bactéries lactiques*. (de Roissart, H. y Luquet, F. M. Eds.) Loriga, France. Pag: 25-116.
- Dellaglio, F., Felis, G. y Torriani S. 2005. *Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacterio*. Norfolk, UK: Caster Academic Press.
- Denou, E., Pridmore, R.D., Berger, B., Panoff, J-M., Arigoni, F y Brussow, H. 2008. Identification of genes associated with the long-gut-persistence phenotype of the probiotic

- Lactobacillus johnsonii* strain NCC533 using a combination of genomics and transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*. 190, 3161–3168.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Bernaert, H., Van Impe, J.F. y Debevere 2000. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products addition of Na-lactate as fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *International Journal of Food Microbiology*. 58, 93-106.
  - Diep, D. B., y Nes, I. F. 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria. *Current Drug Targets*. 3, 107-122.
  - Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases (DFBMD), Centers for Disease Control and Prevention. Listeriosis. Atlanta: CDC; 2008. Pag: 4. Fecha de consulta: 20 de noviembre de 2010. Disponible en: [http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease\\_listing/listeriosis\\_gi.html](http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/listeriosis_gi.html).
  - Djenane D., Martíne L., Sánchez-Escalante A., Montañés L., Blanco D., Yangüela J., Beltrán A. y Roncalés P. 2006. Effect of Lactic Acid Bacteria on Beef Steak Microbial Flora Stored Under Modified Atmosphere and on *Listeria Monocytogenes* in Broth Cultures. *Food Science and Technology International*. 12, 287 – 295.
  - Dobson, A. E., Sanosky-Dawes, R. B. y Klaenhammer, T. R. 2007. Identification of an operon and inducing peptide involved in the production of lactacin B by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Microbiology*. 103, 1766 – 1778.
  - Dobson, C.M., Chaban, B., Deneer, H. y Ziola, B.R. 2004. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Lactobacillus zeae* isolates identified by sequence signature and immunoblot phenotype. *Canadian Journal of Microbiology*. 50, 482–488.
  - Drider, D., Finland, G., Héchard, Y., McMullen, M. L y Frévoist H. 2006. The Continuing Story of Class IIa Bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70, 564 – 582.
  - Duizer, L. M., Robertson, T., y Han, J. 2009. Requirements for packaging from an ageing consumer's perspective. *Packaging Technology and Science*. 22, 187–197.
  - Edward, A. Svetoch, Boris, V. Eruslanov, Vladimir, V. Perelygin, Evgeni, V. Mitsevich, Irina P. Mitsevich, Valery N. Borzenkov, Vladimir P. Levchuk, Olga E. Svetoch, Yuri N. Kovalev, Yuri G. Stepanshin, Gregory, R., Siragusa, Bruce, S. Seal, y Norman, J. Stern. 2008. Diverse Antimicrobial Killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 Bacteriocin. *Journal of Agriculture and Food Chemical*. 56, 1942–1948.
  - Ehrmann, A. M. y Vogel, F. R. 2005. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology*. 16, 31–42.

- Eijsink, G. H. V., Axelson, L., Diep, B. D., Håvarstein, S. L., Holo, H. Y Nes F. I. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81, 639 – 654.
- Eklund, T. 1984. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology*. 1, 179–185.
- Ennahar, S., Sashihara T., Sonomoto K. y Ishizaki A. 2000. Class Ila bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Review*. 24, 85-106.
- Entis, P., Fung, D. Y. C., Griffiths, M. W., McIntre, L., Russell, S., Sharpe, A. N. y Tortorello, M. L. 2001. Rapid Methods for Detection, Identification, and Enumeration. En: *Compendium of Methods for the Microbial Examination of Foods 4ª Ed.* (eds. Pouch, F. e Ito, K.). American Public Health Association. Washington. Pag: 89-126.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P. y Villani, F. 2009. Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential in Vitro and in Beef. *Applied Environmental Microbiology*. 75, 1990–2001.
- Ewaschuk, J.B., Diaz, H, Meddings, L., Diederichs, B, Dmytrash, A., Backer, J., Looijer-van Langen M, y Madsen, K. L. 2008. Secreted bioactive factors from Bifidobacterium infantis enhance epithelial cell barrier function. *American Journal of Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology*. 295, 1025-1034.
- Fegan, N., Vanderlinde, P., Higgs, G., y Desmarchelier, P. 2004. The prevalence and concentration of Escherichia coli O157 in feces of cattle from different production systems at slaughter. *Journal of Applied Microbiology*. 97, 362–370.
- Felis G. E. y Dellaglio F. 2005. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr. Issues Intestinal Microbiology*. 8, 44–61. Online journal at [www.ciim.net](http://www.ciim.net).
- Felis, G. E., Dellaglio, F., Mizzi, L., y Torriani, S. 2001. Comparative sequence analysis of a rec A gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the Lactobacillus casei group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, 2113–2117.
- Felis, G.E. y Dellaglio, F. 2005. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. In: Tannok, G.W. (eds.), *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects*. Caster Academic Press, Norfolk, UK.
- Ferchichi, M., Frère, J., Mabrouk, K. y Manai, M. 2001. Lactococcin MMFII, a novel class Ila bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product. *FEMS Microbiology. Letters*. 205, 49-55.

- Fike, K., y Spire, M. F. 2006. Transportation of cattle. *Veterinarian Clinical North American Food Animal Practices*. 22, 305–320.
- Fontana, C., Cocconcelli, P. S., y Vignolo, G. 2005. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 103, 131–142.
- Fontana, C., Cocconcelli, P. S., y Vignolo, G. 2006. Direct molecular approach to monitoring bacterial colonization on vacuum-packaged beef. *Applied Environmental Microbiology*. 72, 5618–5622.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Guidelines for evaluation of probiotics in food. London, Ontario: Canada; 2002. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>, Fecha de acceso: 25 de Junio de 2009.
- Fox, P.F. Y Mcsweeney, P.L.H. 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*. 12, 457-509.
- Franz, M. A. P. Charles, van Belkum J. M., Holzapel H. W., Abriouel, H. y Gálvez Antonio 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Review*. 31, 293–310.
- FSIS/USDA. 2000. 9 CFR part 424: Food additives for use in meat and poultry products: sodium diacetate, sodium acetate, sodium lactate and potassium lactate. Federal Register. 65, 3121-3123.
- Fung, D. W. C., Edwards, J. y Crozier-Dodson, B. A. 2008. At-line methods for controlling spoilage, Pag: 289–318. In F. Toldra` (eds.), *Meat biotechnology*. Springer, New York, NY.
- Fung, D. Y. C. 1997. Overview of Rapid Methods of Microbiological Analysis. En: *Food Microbiological Analysis New Technologies*. (eds. Tortorello, M.L. y Gendel, S.M.) Ed.: Marcel Dekker, Inc. New York. Pag: 1-25.
- Galdeano, C. M., de Moreno de LeBlanc A., Vinderola, G., Bonet, M. E. y Perdigon, G. 2007. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical Vaccine Immunology*. 14, 485-492.
- García de Fernando, G.D. y Fox, P. F. 1991. Study of proteolysis during the processing of dry fermented pork sausages. *Meat Science*. 30, 367-383.
- García-Iglesias, E., Gago-Cabezas, L. y Fernández-Nuevo, J.L. 2006. Tecnologías de envasado en atmósfera protectora. *Informe de vigilancia tecnológica*. <http://www.madrimasd.org>.

- Garneau, S., Martin, N. I. y Vederas, J. C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*. 84, 577–592.
- Ghafir, Y., China, B., Korsak, N., Dierik, K., Collard, J., Godard, C., y col. 2005. Belgian surveillance plans to assess changes in Salmonella prevalence in meat at different production stages. *Journal of Food Protection*. 68, 2269–2277.
- Gill, C. O. y McGinnis, J. C. 2000. Contamination of beef trimmings with *Escherichia coli* during a carcass breaking process. *Food Reserch International*. 33, 125–130.
- Gill, C. O. y Landers, C. 2004. Proximate sources of bacteria on boneless loins prepared from routinely processed and detained carcasses at a pork packing plant. *International journal of Food Microbiology*. 97, 171–178.
- Gillor, O., Etzion, A. y Riley, A. 2008. The dual role of bacteriocins as anti and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81, 591–606.
- Gobantes, I. y Gómez, R. 2007. Envasado de alimentos: Aspectos técnicos del envasado al vacío y bajo atmósfera protectora. *AlimenPack*, enero-febrero, 9-15.
- Godber, J. S. 9994. Nutritional value of muscle foods. In: Kinsman DM, Kotula Aw, Breiddenstein BC, editors. Muscle foods. Meat, poultry and seafoods technology. New York: Chapman & Hall. Pag: 430 – 455.
- Goering, R. V. 1993. Molecular epidemiology of nosocomial infection: Analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infection Control Hospital Epidemiology*. 14, 595-600.
- Gómez, R., Choubert, G. y Gobantes, I. 2001. Envasado de alimentos. Aspectos técnicos del envasado al vacío y bajo atmósfera protectora. *Alimentación, equipos y tecnología*. 1, 75-84.
- Gonzalez, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. y Guillamon, J. M. 2005. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology*. 102, 295–304.
- Gordon, D. M., Oliver, E. y Littlefield-Wyer, J. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria. In: Riley M.A., Chavan M. (eds.) Bacteriocins: ecology and evolution. Springer, Berlin. Pag: 5 – 18.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L. y Giudici, P. 2006. Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". *International Journal of Food Microbiology*. 106, 209–212.

- Halász, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L. y Holzapfel, W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*. 5, 42–49.
- Hammes, W.P.A.; Bantleon, A. Y Min, S. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Letters*. 87, 165-174.
- Han, J. H. 2005. New technologies in food packaging: Overview. Innovations in food packaging. Amsterdam: Elsevier Academic. Press. Pag: 3–11
- Han, K. S., Kim, Y., Kim, S. H., Oh S. 2007. Characterization and purification of acidocin 1B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* GP1B. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17, 774–783.
- Hassan, Z., Purwati, E., Radu, S., Rahim, R. A., y Rusul, G. 2001. Prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in meat and fermented fish in Malaysia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health*. 32, 402–407.
- Helander, I. M., von Wright, A. y Mattila-Sandholm, T-M. 1997 Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*. 8, 146 – 150.
- Heng, N. C. K., Wescombe, P.A., Burton, J.P., Jack, R. W. y Tagg J. R. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: Riley M.A., Chavan M. (eds.) *Bacteriocins: ecology and evolution*. Springer, Berlin. Pag: 5 – 18.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T. y Vidal-Carou, M.C. 1995. Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 44, 2710-2715.
- Holzapfel, WH, Geisen, R. Y Schillinger U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*. 24, 343 – 362.
- Holzapfel, WH, Haberer, P, Geisen, R, Björkroth, J, y Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *American Journal of Clinical and Nutrition*. 73, 365S–73S.
- Hopkins, D.L. 1981. Protein quality in humans: Assessment and *in vitro* estimation. (eds.). C.E. Bodwell, J.S. Adkins y D.T. Hopkins. Avi Publ. Co. Pag: 169-194. Westport, Connecticut.
- Hosseini, S.V., Arlindo S., Böhme K., Fernández-No, C., Calo-Mata, P. y Barros-Velázquez J. 2009. Molecular and probiotic characterization of bacteriocinproducing

- Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of Applied Microbiology*. 107, 1392–1403
- Hueppe, F. 1884. Milchsäurebacillus syn. Bacterium Acidi Lactici. *Zepf. Mitt. Kaiserl. Gesundheitsamt*. 2: 337-340.
  - Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. y Monfort, J.M. 2002. Bacterial cultures and metabolites for the enhancement of safety and quality in meat products. En Toldrà, F. (eds.), *Research Advances in the Quality of Meat products*. Research Signpost, Triyandrum, Kerala, India. Pag: 225–247.
  - Hwang C-A., Sheen, S., Juneja, V. 2011. Effects of Sodium Lactate on the Survival of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia Coli* O157:H7, and *Salmonella* spp. in Cooked Ham at Refrigerated and Abuse Temperatures. *Food and Nutrition Sciences*. 2, 464-470.
  - ILSI Research Foundation, Risk Science Institute, 2005. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis-a riskbased approach. *Journal of Food Protection*. 68, 1932–1994.
  - Janse, J. D., and B. Kokoskova. 2009. Indirect Immunofluorescence Microscopy for the detection and identification of plant pathogenic bacteria (In particular for *Ralstonia solanacearum*). *Plant Pathology: Techniques and Protocols*. 508:89-99. doi: 10.1007/978-1-59745-062-1\_8.
  - Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 525–532.
  - Jiménez-Díaz, R., J. L. Ruiz-Barba, D. P. Cathcart, H. Holo, I. F. Nes, K. H. Sletten y P. J. Warner. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPC010, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 4459 - 4463.
  - Joerger R. D. 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science*. 82, 640 – 647.
  - Johanson, G., Berdagué, J.L., Larsson, M., Tran, N. y Borch, E. 1994. Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during the ripening of a fermented meat sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosum* as starter cultures. *Meat Science*. 38, 203-218.

- Johnson-Henry, K.C., Donato, K.A., Shen-Tu, G., Gordanpour, M., Sherman, PM. 2008. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infection Immunology*. 76, 1340-1348.
- Johnson-Henry, K.C., Hagen KE, Gordonpour M, Tompkins TA, Sherman PM. 2007. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cellular Microbiology*. 9, 356-367.
- Jones, R. 2004. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill stored vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Microbiology*. 90, 273–282.
- Kalchayanand, N., M. B. Hanlin y B. Ray. 1992. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Letters in Applied Microbiology*. 15, 239-243.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P., Ray, B. 1998. Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*. 61, 377-501
- Kato, T., Matsuda, T., Tahara, T., Sugimoto, M., y Nakamura, R. 1994. Effects of meat conditioning and lactic fermentation on pork muscle proteins degradation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 58, 408-410.
- Kemperman, R., A. Kuipers, H. Karsens, A. Nauta, O. P. Kuipers y J. Kok. 2003b. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 1589-1597.
- Kemperman, R., M. Jonker, A. Nauta, O. P. Kuipers y Kok, J.. 2003a. Functional analysis of the gene cluster involved in production of the bacteriocin circularin A by *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 5839-5848.
- Keskinen L.A., Todd E.C.D., Ryser. E., 2008. Transfer of Surface Dried *Listeria monocytogenes* from Stainless Steel Knife Blades to Roast Turkey Breast. *Journal of Food Protection*. 71, 176 181
- Klaenhammer T. R., Azcarate-Peril M. A., Altermann E., R Barrangou. 2007. Influence of the Dairy Environment on Gene Expression and Substrate Utilization in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Nutrition*. 137, 748S-750.
- Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70, 337–349.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Revisión*. 12, 39-86.

- Kokosková, B., Mráz, I., y Fousek, J. 2010. Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Folia Microbiol.* 55, 239-244.
- Kotelnikova E. A. y Gelfand M. S. 2002. Bacteriocin Production by Gram-Positive Bacteria and the Mechanisms of Transcriptional Regulation. *Russian Journal of Genetics.* 38, 628–641.
- Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P. y Nychas, J-G. 2006. Development of microbial model of temperature and pH on spoilage of ground beef, and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Applied and Environmental Microbiology.* 72, 124–134.
- Kretova, M., Grones, J. 2005. Molecular analysis of 16S–23S spacer regions of *Acetobacter* species. *Folia Microbiologica.* 50, 288–292.
- Kunene F. N. , Geornaras I, von Holy, y Hastings W J. 2000. Characterization and Determination of Origin of Lactic Acid Bacteria from a Sorghum-Based Fermented Weaning Food by Analysis of Soluble Proteins and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology.* 66, 1084-1092.
- Kunji, E.R.S.; Mireau, I.; Hagting, A.; Poolman, B. Y Konings, W.N. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Proceedings of the 5th symposium on Lactic Acid Bacteria. Genetics, Metabolism and Applications, eds. G. Venema, j.h.l. Huis in't Veld y J. Hugenholtz. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands. Pag: 187-221.
- Labadie, J. 1999. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science.* 52, 299-305.
- Lagerstedt, A., K. Lundstrom, and G. Lidahl. 2011. Influence of vacuum or high-oxygen modified atmosphere packaging on quality of beef *M. longissimus dorsi* steaks after different aging times. *Meat Science.* 87, 101-106.
- Law, J. Y Haandrikman, A. 1997. Artículo de Review: proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal.* 7, 1-11.
- Lawrie, R. A. y Ledward, D. A. 2006. Lawrie's meat science (7th ed.). Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.
- LAWRIE, R.A. 1998. *Ciencia de la carne* (4ª ed.) Acribia. Zaragoza
- Lee, D. S., Yam, K. L. y Piergiovanni, L. 2008. Food packaging science and technology. Boca Raton: CRC Press. Pag: 79–108.

- Leer, R.J., Christiaens, H., Verstraete, W., Peters, L., Posno, M. y Pouwels, P. H. 1993. Gene disruption in *Lactobacillus plantarum* strain 80 by site specific recombination: isolation of a mutant strain deficient in conjugated bile salt hydrolase activity. *Molecular and General Genetics*. 239, 269–272.
- Lenoir-Wijnkoop, I., Sanders, M.E., Cabana, M.D., Caglar, E., Corthier, G., Rayes, N., Sherman, P.M., Timmerman, H.M., Vanechoutte, M., Van Loo, J. y col. 2007. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. *Nutrition Reviews* 2007, 65:469-489.
- Leo, M.L. Nolle, Fidel Toldrá. 2006. Processing options when curing meats. Advanced Technologies For *Meat Processing*. Taylor & Francis (CRC eds.). Pag: 311 – 433.
- Li y Van der Donk. 2007. Identification of essential catalytic residues of the cyclase NisC involved in the biosynthesis of Nisin. *Biology and Chemistry*. 282, 21169–21175
- Lister, J. 1873. A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. *Quart. Journal of Microbiol. Science*. 13, 380-408.
- Looper, M. L., Edrington, T. S., Flores, R., Rosenkrans, C. F., Nihsen, M. E. y Aiken, G. E. 2006. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and Salmonella in beef steers consuming different forage diets. *Letters in Applied Microbiology*. 42, 583–588.
- Lücke, F.K. y Hechelmann, H. 1987. Starter cultures for dry sausages and raw ham. Composition and effect. *Fleischwirtschaft*. 67, 307-314.
- Luño, M., Roncales, P., Djenane, D. y Beltran, J.A. 2000. Beef shelf life in low O<sub>2</sub> and high CO<sub>2</sub> atmospheres containing different low CO concentrations. *Meat Science*. 55, 413-419.
- Luücke, F-K. 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*. 56, 105–115.
- Makarova, K.S. y Koonin, E.V. 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. 189, 1199–1208.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. 2006. Heterogeneity of strains assigned to *Gluconobacter frateurii* based on restriction analysis of 16S–23S rDNA internal transcribed spacer regions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 70, 684–690.
- Martínez-Cuesta, M. C., Requena, T. Peláez, C. 2006. Cell membrane damage induced by lactacinio 3147 enhances aldehyde formation in *Lactococcus lactis* IFPL730. *International Journal of Food Microbiology*. 109, 198 – 204.

- Martoni, C.B.J., Urbanska, A.M. y Prakash, S. 2008. Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral targeted delivery in the gastrointestinal tract. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81, 225–233.
- Mbandi, E. y Shelef, L.A. 2002. Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef bologna. *International Journal of Food Microbiology*. 76, 191-198.
- McAuliffe, O., Cano, R.J. y Klaenhammer, T.R. 2005. Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 4925–4929.
- McAuliffe, O., Ross, R.P. y Hill, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology*. Revisión. 25, 285–308.
- McCartney, A.L. 2002. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*. 88, S29–S37.
- McMillin, K. W. 2008. Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*. 80, 43–65.
- Mead, P., Dunne, E., Graves, L., Wiedmann, M., Patrick, M., Hunter, S. y col. 2005. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiology and Infection*. 134, 744–751.
- Medline Plus. Listeriosis: infecciones por *Listeria*. Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. 2010. Fecha de consulta: 31 de mayo de 2010. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/listeriainfections.html>.
- Miller, N. y Wetterstrom, W. 2000. *The Cambridge World History of Food*, (eds.) Kiple K, Ornelas K (Cambridge Univ Press, Cambridge, UK). Vol 2, Pag: 1123–1139.
- Miranda, J.M., Samuel, A., Nebot, C.G., Cepeda, A., Franco, C.M. y Calo-Mata, M.P. 2014. Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Beef Stored on Vacuum-Packaged and Advanced Vacuum Skin Packaged System. *Journal of Food Processing and Technology* 5: 338. doi:10.4172/2157-7110.1000338.
- Moll, G. N., Konings, W. N. y Driessen A. J. M. 1999b. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 76, 185-198.
- Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M. y Geenen, I. 1997. The importance of meat enzymes in ripening and flavor generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chemistry*. 59, 539-545.

- Munthali, M., Ford-Lloyd, B.V. & Newbury, H.J. 1992. The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR Methods and Applications*. In *Genome research*. 1, 274-276.
- Nagao, J. I., Asaduzzaman, S.M., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J., Sonomoto, K. 2006. Lantibiotics: Insight and foresight for new paradigm. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 102, 139– 149.
- Nair, P. S. y Surendran, P. K. 2004-2005. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and Prawn. *Journal of culture collections*. 4, 48-52
- Nissen-Meyer, J. y Nes, I. F. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of Microbiology*. 167, 67-77.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Håvarstein, L. S., Sletten, K., Nes, e I. F.. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology*. 174, 5686-5692.
- Nychas, G-J. E., Skandamis, P., Tassou, C. C., y Koutsoumanis, K. P. 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Science*. 78, 77–89.
- Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S., y Igimi, S. 2004. Nationwide survey of human *Listeria monocytogenes* infection in Japan. *Epidemiology and Infection*. 132, 769–772.
- Oppegård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L. Kristiansen, P. E., Finland, G., Nissen-Meyer, J. 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *Journal of Molecular, Microbiology and Biotechnol.* 13, 210–219.
- Ordóñez, J., Hierro, A., Bruna, J. y Hoz, L. 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Review of Food Science and Nutrition*. 39, 329–367.
- Ordóñez, J.A. y de la Hoz, L. 2001. Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. Alteraciones. En Bejarano, M. (eds.), *Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos*. Ediciones Martín & Macías, Plasencia. Pag: 1063–1090.
- Pag U., Sahl H. G. 2002. Multiple activities in lantibiotics – models for the design of novel antibiotic? *Current pharmaceutical design*. 8, 815–833.
- Parente, E., Martuscelli. M., Gardini, F., Griego, S., Crudele, M.A. y Suzzi, G. 2001. Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 882-891.

- Pasteur, M.L. 1857. Memoire sur la fermentation appelee lactique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 45, 913-916.
- Perez-Alonso, F., Aubourg, S., Rodriguez, O., and Velazques, J., 2004. Shelf life extension of Atlantic pomfret (*Brama brama*) fillets by packaging under vacuum-skin system. *European Food Research and Technology*. Pag: 313-317.
- Pfeiler, E.A. y Klaenhammer, T.R. 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*. 15, 546-553.
- Pfeiler, E.A., Azcarate-Peril, M.A. y Klaenhammer, T.R. 2007. Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Bacteriology*. 189, 4624-4634.
- Piard, J. C. y Desmazeaud, M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*. 72, 113-142.
- Piard, J. C., y Desmazeaud, M. 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism endproducts. *Lait*. 71, 525-541.
- Pircher, A. Bauer, F. Y Paulsen, P. 2007. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Reserch. Technology*. 226, 225-231.
- Poltronieri, P., D'Urso, O.F., Blaiotta, G. y Morea, M. 2008. DNA array and membrane hybridization methods for screening of six *Lactobacillus* species common in food products. *Food Analytical Methods*. 1, 171-180.
- Prändl, O.; Fischer, A.; Schmidhofer, T. y Sinell, H. J. 1994. Fundamentos de la conservación de la carne en Tecnología e Higiene de la Carne. Editorial Acribia.
- Price, J.F. y Schweigert, B.S. 1994. Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. Ed. Acribia, Zaragoza
- Pridmore, R.D., Berger, B, Desiere, F. y col. 2004. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proceedings of the National Academic Science USA*. 101, 2512-2517.
- Pritchard, G.G. Y Coolbear, T. 1993. The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12, 179-206.
- Quiros, C.F.; This, P.; Laudine, M.; Benet, A.; Chevre, A. & Delseny, M. 1995. Analysis of a set of RAPD markers by hybridisation and sequencing in *Brassica*: a note of caution. *Plant Cell Reports*. 14, 630-634.

- Randazzo, C.L., Caggia, C., Neviani, E. 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*. 78, 1–9.
- Rantsiou, K., Comi, G., Cocolin, L. 2004. The rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentation. *Food Microbiology*. 21, 481–487.
- Rault, Amol D., Shashidhar, Ravindranath, Bandekar, Jayan R., Kapadnis y Balu P. 2012. Effectiveness of radiation processing in elimination of *Campylobacter* from poultry meat. *Radiation Physics and Chemistry*. 81, 82-85.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T. y McCormick, J.K. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Review*. 16, 658–672.
- Reid, G., Sanders, M.E., Gaskins, H.R., Gibson, G.R., Mercenier, A., Rastall, R., Roberfroid, M., Rowland, I., Cherbut, C., Klaenhammer, T.R. 2003. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 37, 105-118.
- Reiter, R.S., Williams, J.G., Feldmann, K.A., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. y Scolnik, P.A. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proceedings of the National Academic Science USA*. 89, 1477–1481.
- Riley, M. A., y J. E. Wertz. 2002. Bacteriocins diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*. 84, 357–364.
- Riley, M. A., y J. E. Wertz. 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review Microbiology*. 56, 117-137.
- Rodgers, S. 2007. Innovation in food service technology and its strategic role. *Hospitality Managemnt*. 26, 899-912.
- Saarella, M., Hallamaa, K., Mattila-Sandholm, T. y Matto, J. 2003. The effect of lactulose lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *International Dairy Journal*. 13, 291–302.
- Sablon, E., Contreras B. y Vandamme E. 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 68.
- Saitou, N., & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4, 406–425.

- Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kato, Y., Kaneuchi, C., y Ogawa, M. 2002. Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef. *Journal of Applied Microbiology*. 92, 173–179.
- Salvat, G. y Fravallo, G. 2004. Risk assessment strategies for Europe: integrated safety strategy or final product control: Example of *Listeria monocytogenes* in processed products from pork meat industry. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 111, 331–334.
- Saulnier D. MA, Spinler J. K, Gibson G. R. Y Versalovic J. 2009. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 20, 1–7.
- Saxelin, M. 2000. Clinical documentation, product development and marketing of *Lactobacillus* GG. *Journal of nutrition*. 44, 102.
- Scanlan, R. 1995. Volatile nitrosamines in foods-an update. En Charalambous, G. (eds.) *Food flavors: generation, analysis and process influence*. Elsevier Science Ltd, New York. Pag: 685-704.
- Schierwater, B. y Ender, A. 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic. Acids. Reserch*. 21, 4647-4648
- Schroeter, J. y Klaenhammer, T. 2009. Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology. Letters*. 292, 1–6.
- Sebranek, J. G. y Houser, T. A. 2006. Modified atmosphere packaging. In L.M. L. Nollet, & F. Toldrá (eds.). *Advanced technologies for meat processing*. Boca Raton: Taylor & Francis. Pag: 421–443.
- Shah, N.P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in Dairy foods. *Journal of Dairy Science*. 83, 894–907.
- Silla, M. H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Internat. Journal of. Food Microbiology*. 29, 675–690.
- Silva, J., Carvalho, A. S., Teixeira, P., y Gibbs, P. A. 2002. Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 34, 77–81.
- Simon, L., C. Fremaux, Y. Cenatiempo y J. M. Berjeaud. 2002. Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 6416-6420.
- Simoncini, N., Rotelli, D., Virgili, R. y Quintavalla S. 2007. Dynamics and characterization of yeasts during ripening of typical Italian dry-cured ham. *Food Microbiology*. 24, 577–584.
- Sit, S. Clarissa, y Vederas C. John. 2008. Approaches to the Discovery of new antimicrobial agents' base don bacteriocins. *Biochemistry and Cell Biology*. 86, 116–123.

- Skandamis, P.N. y Nychas, G. J. E. 2002. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 79, 35-45.
- 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. y Manghi, M.A. 2006. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Microbiology*. 100, 123-134.
- Stahl, M. y Molin, G. 1994. Classification of *Lactobacillus reuteri* by restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44, 9-14.
- Steindel, M., Dias-Neto, E., Pinto, C.J., Grisard, E.C., Menezes, C.L, Murta, S.M., Simpson, A.J. y Romanha, A.J. 1994. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 41, 261-267.
- Steinmetzi, R. A., Brenneke B., Häussler S., Simpson A. y White N. J. 1999. Rapid Identification of *Burkholderia pseudomallei* by Latex Agglutination Based on an Exopolysaccharide-Specific Monoclonal Antibody. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 225-228.
- Stiles, E. M., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70, 331-345
- Stiles, M.E. y Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36, 1-29.
- Sun, X. D. y Holley, R. A. 2012. Antimicrobial and Antioxidative Strategies to Reduce Pathogens and Extend the Shelf Life of Fresh Red Meats. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 11, 340-354.
- Talon, R., LeRoy-Setrin, S. y Fadda, S. 2002. Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. En Toldrá, F. (eds.), *Research advances in the quality of meat and meat products*. Research Signpost, Burjassot, Spain. Pag: 175-191.
- Tan, P.S.T.; Poolman, B. Y Konings, W.N. 1993 Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research*. 60, 269-283.
- Taylor, A. A. 1985. Packaging fresh meat. En developments in meat science 3. Achapter 4. Lawrie, R. (eds.) London: Elsevier Applied Science Publishers. Pag: 89 -113.

- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J. and Huis in't Veld, J. H. H. (1990) Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 11, 73-84
- Tseng, C.P. y Montville, T.J. 1993. Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: causes and consequences. *Biotechnology Progress*. 9, 113-121.
- Twomey, D., Ross, R. P., Ryan, M., Meaney, B. y Hill C. 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82, 165–185.
- Vaillant, V., de Valk, H., Baron, E., Ancelle, T., Colin, P., Delmas, M., y col. 2005. Foodborne infections in France. *Foodborne Pathogens Disease*. 2, 221–232.
- Valsangiacomo, C., Baggi, F., Gaia, V., Balmelli, T., Peduzzi, R., & Piffaretti, J. C. 1995. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology*. 33, 1716–1719.
- van Belkum, M.J. y Stiles, M.E. 2000. Nonantibiotic antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Natural Product Report*. 17, 323–365.
- Vaughan, A., V. G. H. Eijsink y van Sinderen D. 2003 Functional Characterization of a Composite Bacteriocin Locus from Malt Isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 7194-7203.
- Vázquez, B.I., Carreira, L., Franco, C.M., Fente, C.A., Cepeda, A., Barros-Velázquez, J. 2004. Shelf life extension of beef retail cuts subjected to an advanced vacuum skin packaging system. *European Food Research Technology*. 218, 118–122
- Ventura, M., Canchaya, C., Meylan, V., Klaenhammer, T.R., Zink, R., 2003. Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 6908–6922.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Vandekinderen, I., Debevere, J. 2006. The interaction of non-bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* 10A and lactacin S producing *Lactobacillus sakei* 148 towards *Listeria monocytogenes* on a model cooked ham. *Food Microbiology*. 23, 511–518.
- Voges, K.L., Mason, C.L., Brooks, J.C., Delmore, R.J., Griffin, D.B., Hale, D.S., Henning, W.R., Johnson, D.D., Lorenzen, C.L., Maddock, R.J., Miller, R.K., Morgan, J.B., Baird, B.E., Gwartney, B.L., Savell, J.W. 2007. National beef tenderness survey –

- 2006: Assessment of Warner–Bratzler shear and sensory panel ratings for beef from US retail and foodservice establishments. *Meat Science*. 77, 357–364
- Voltan, S., Castagliuolo, I., Elli, M., Longo, S., Brun, P., D’Inca, R., Porzionato, A., Macchi, V., Palu, G., Sturniolo, G.C. y col. 2007. Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. *Clinical and Vaccine Immunology*. 14, 1138-1148.
  - Von Wright, A. y Salminen, S. 1999. Probiotics: established effects and open questions. *Journal of Gastroenterology Hepatology*. 11, 1195–1198.
  - Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. 1995. AFLP—a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23, 4407–4414.
  - Ward, L. J. H., y Timmins, M. J. 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*. 29, 90–92.
  - Welsh, J. y McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18, 7213–7218.
  - Whitehead, K., Versalovic, J., Roos, S. y Britton, R.A. 2008 Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 1812–1819.
  - Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Reserch*. 18, 6531-6535.
  - Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. 1993. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology*. 218, 704-740.
  - Wolf, G. and Hammes, W. P. 1988. Effect of hematin on the activities of the nitrite reductase and catalase in lactobacilli. *Archive Microbiology*. 149, 220-224.
  - Xiaohui Zhou, Xinan Jiao. 2004. Investigation of *Listeria monocytogenes* contamination pattern in local Chinese food market and the tracing of two clinical isolates by RAPD analysis. *Food Microbiology*. 21, 695–702.
  - You, Y.O., y Van der Donk, W.A. 2007. Mechanistic investigations of the dehydration reaction of Lacticin 481 synthetase using site-directed mutagenesis. *Biochemistry*. 46, 5991–6000.

- Yukphan, P., Malimas, T., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. 2006. Identification of strains assigned to the genus *Asaia* based on restriction analysis of 16S–23S rDNA internal transcribed spacer regions. *Journal of General and Applied Microbiology*. 52, 55–62.
- Zapparoli, G., Toriani, S., & Dellaglio, F. 1998. Differentiation of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA and pulsed field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*. 166, 325–332.
- Zhou G.H., Xu X.L., Liu Y. 2010. Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science*. 86, 119–128.

