



**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Escuela de Ingeniería en Alimentos

**Producción continua de bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* a escala pre-piloto y estudio de su efecto antagónico en contra de *Listeria monocytogenes***

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ingeniería en Alimentos.

**Andrea Loreto Zúñiga Febré**

Valdivia Chile 2002

## **PROFESOR PATROCINANTE**

Renate Schöbitz Twele  
Tecnólogo Médico, MSc.  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Ciencia Agrarias

---

## **PROFESORES INFORMANTES**

Marcia Costa Lobo  
Ingeniero Civil Bioquímico  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Ciencia Agrarias

---

Luigi Ciampi Panno  
Ingeniero Agrónomo, MSc, Ph.D.  
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal  
Facultad de Ciencias Agrarias

---

*A mis padres...*

## AGRADECIMIENTOS

*Deseo agradecer de todo corazón a mi familia, Nana, Heri, Pablito y Ceci, por el amor, apoyo y confianza incondicional. A mis verdaderos amigos y amigas, Taty, Lore, que me brindaron en todo momento una palabra. A mis profesores más cercanos, profe Sade y profe Renate, quienes estuvieron siempre cerca de mí, más que como profesoras como amigas, escuchándome y ayudándome en los momentos más difíciles.*

*Deseo agradecer además muy sinceramente a quien me eligió para este proyecto, a mi profesora patrocinante, Sra. Renate Schöbitz T., y a quienes también aportaron un granito para que esto fuera posible, mis profesores informantes Sra. Marcia Costa L. y Sr. Luigi Ciampi P., quienes creyeron en mí ofreciéndome toda su paciencia y comprensión.*

*Sin duda no puedo dejar de nombrar a quienes me asesoraron en toda la parte técnica y experimental, trabajando codo a codo conmigo, Oscar Wenzel Ubilla y Alex Caro Biott.*

*Además quiero agradecer a Cultivos Marinos Chiloé S.A. por haberme facilitado parte de las herramientas de trabajo de este estudio, como lo fue el salmón ahumado.*

*A todos ellos.....Muchas Gracias.*

## ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	2
1.1.1 Objetivo general	2
1.1.2 Objetivos específicos	2
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Cultivo de microorganismos	3
2.1.1 Cultivo batch	3
2.1.2 Cultivo continuo	6
2.2 Bacterias ácido lácticas	9
2.3 Bacteriocinas	12
2.4 Presencia en salmón ahumado de <i>Listeria</i> spp.	15
2.4.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	15
2.4.2 Salmón ahumado	17
2.5 Proteasas en el salmón	20
3 MATERIAL Y MÉTODO	22
3.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo	22
3.2 Producción de la bacteriocina de <i>Carnobacterium piscicola</i> L103	22
3.2.1 Propagación de la cepa de <i>C. piscicola</i> L103	22
3.2.2 Cultivo batch	23
3.2.3 Cultivo continuo	25
3.3 Determinación de la actividad de la bacteriocina	25

3.4	Purificación parcial de la bacteriocina	27
3.5	Estudio de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina en contra de <i>L. monocytogenes</i> inoculada sobre filetes de salmón ahumado	29
3.5.1	Sustrato para la inoculación	29
3.5.2	Inóculo de la cepa de <i>L. monocytogenes</i> Lm 82	29
3.5.3	Inoculación de la bacteriocina parcialmente purificada	29
3.5.4	Condiciones de almacenamiento	30
3.5.5	Tratamientos	30
3.5.6	Muestras y análisis microbiológicos	31
3.5.7	Análisis estadístico	32
3.6	Estudio del efecto de las proteasas del salmón sobre la actividad de la bacteriocina de <i>C. piscicola</i> L103 a $5 \pm 2^\circ\text{C}$	32
3.6.1	Ensayo de la actividad proteásica	32
3.6.2	Sustrato a inocular	33
3.6.3	Tratamientos	34
3.6.4	Análisis de actividad	35
3.6.5	Análisis estadístico	36
4	PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	37
4.1	Producción de la bacteriocina de <i>C. piscicola</i> L103	37
4.2	Purificación parcial de la bacteriocina	41
4.3	Inoculación de la bacteriocina parcialmente purificada sobre filetes de salmón ahumado	41
4.4	Estudio del efecto de las proteasas nativas del salmón sobre la bacteriocina	43

5	DISCUSIÓN	47
6	CONCLUSIONES	54
7	RESUMEN	55
	SUMMARY	56
8	BIBLIOGRAFÍA	57
	ANEXOS	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Curva de crecimiento característica de un cultivo batch	5
2	Modos de diseminación de <i>L. monocytogenes</i> en el medio ambiente, animales, alimentos y personas	19
3	Esquema general de propagación de la cepa láctica <i>C. piscicola</i> L103	24
4	Equipo de fermentación (Microferm Fermentor, New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J., USA)	26
5	Esquema general de la prueba de la “gota sobre césped” utilizada para la determinación de la actividad de la bacteriocina	28
6	Filete de salmón ahumado envasado al vacío junto a pié de metro utilizado para la medición del tamaño de la muestra	30
7	Esquema general del ensayo de actividad proteásica	34
8	Esquema de los tratamientos utilizados en el estudio de las proteasas del salmón	35
9	Recuento microbiano y densidad óptica ( $DO_{578 \text{ nm}}$ ) del cultivo de <i>C. piscicola</i> L103 en caldo D-MRS, en un sistema batch y continuo.	38
10	Actividad de la bacteriocina (UA/mL) y recuentos (ufc/mL) durante el cultivo batch y continuo de <i>C. piscicola</i> L103.	39
11	Actividad de la bacteriocina (UA/mL) y curva de la densidad óptica ( $D.O._{578 \text{ nm}}$ ) durante el cultivo batch y	

	continuo de <i>C. piscicola</i> L103	40
12	Halos de inhibición durante la producción de la bacteriocina, correspondientes a 4, 6 y 8 horas de cultivo.	40
13	Recuentos de <i>L. monocytogenes</i> inoculada sobre filetes de salmón ahumado con dos niveles de actividad de bacteriocina, almacenados a $5 \pm 2$ °C.	42
14	Efecto de las proteasas nativas del salmón sobre la actividad de la bacteriocina, después de 48 horas a $5 \pm 2$ °C.	44
15	Efecto de las proteasas nativas del salmón sobre la bacteriocina (1.600 UA/mL) de <i>C. piscicola</i> L103.	45

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1 Composición del medio de cultivo D-MRS utilizado para la producción de la bacteriocina	67
2 Cálculo del flujo de entrada y salida para el cultivo continuo de <i>C. piscicola</i> L103	68
3 Resultados del cultivo de <i>C. piscicola</i> L103 a nivel pre-piloto	69
3.1 Valores de densidad óptica (578 nm)	69
3.2 Valores de recuento bacteriano de <i>C. piscicola</i> L103 (ufc/mL)	69
3.3 Valores de actividad de la bacteriocina durante el cultivo de <i>C. piscicola</i> L103	70
4 Cálculo del tiempo de duplicación ( $t_D$ ) del cultivo de <i>C. piscicola</i> L103 para la producción pre-piloto	71
5 Resultados obtenidos en el estudio de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina en contra de <i>L. monocytogenes</i> inoculada sobre filetes de salmón ahumado	73
5.1 Recuento de <i>L. monocytogenes</i> (ufc/cm <sup>2</sup> )	73
5.2 Gráficos obtenidos de la inoculación de dos niveles de bacteriocina sobre filetes de salmón ahumado para dos repeticiones	74
5.2.1 Experimento N°1	74
5.2.2 Experimento N°2	74
5.3 Análisis estadísticos del recuento de <i>L. monocytogenes</i>	75

5.3.1	Análisis de varianza para el estudio de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina sobre salmón.	75
5.3.2	Análisis de comparación múltiple para el estudio de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina sobre salmón según el tiempo.	76
5.3.3	Análisis de comparación múltiple para el estudio de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina sobre salmón según los tratamientos.	77
5.4	Análisis estadísticos del recuento de <i>L. monocytogenes</i> según tratamientos.	78
5.4.1	Tratamiento A: salmón con bacteriocina 1.600 UA/mL y <i>L. monocytogenes</i> .	78
5.4.2	Tratamiento B: salmón con bacteriocina 800 UA/mL y <i>L. monocytogenes</i> .	79
5.4.3	Tratamiento C: salmón con <i>L. monocytogenes</i> .	80
6	Resultados obtenidos en el estudio del efecto de las proteasas del salmón sobre la actividad de una bacteriocina de <i>C. piscicola</i> L103.	81
6.1	Resultados obtenidos en el ensayo de actividad proteásica para el jugo de salmón.	81
6.2	Diámetros (mm) de halos de inhibición sin considerar el pocillo de 6 mm.	81
6.3	Análisis estadísticos para las zonas de inhibición según tratamiento.	82
6.3.1	Tratamiento A: bacteriocina 1.600 UA/mL y jugo de salmón.	82
6.3.2	Tratamiento B: bacteriocina 1.600 UA/mL.	84

## 1. INTRODUCCION

El interés del consumidor por adquirir alimentos mínimamente procesados y preservados en forma natural, ha proporcionado un incentivo en la búsqueda de sistemas de conservación natural, que sin embargo mantengan al alimento bajo elevados estándares de calidad. Por otra parte, hay que tener presente que los alimentos pueden ser un vehículo potencial de propagación de enfermedades, debido su posible contaminación al estar en contacto con el medio ambiente, por lo que estas tecnologías de preservación se orientan básicamente a inhibir e inactivar el crecimiento de microorganismos indeseados. De esta forma, la biopreservación, es un sistema natural, que utiliza microorganismos inocuos o sus compuestos metabólicos que presentan acción antagónica frente a microorganismos no deseados.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo de microorganismos estudiados en profundidad por su capacidad para producir sustancias antimicrobianas. Entre estas sustancias destacan las bacteriocinas, cuyas aplicaciones en alimentos han proporcionado resultados positivos, eliminando la población microbiana patógena, constituyendo un sistema natural como factor de seguridad y biopreservantes para alimentos. De acuerdo con esto, se han desarrollado estudios de laboratorio para el cultivo de BAL con la consecuente producción de bacteriocina, las cuales son finalmente inoculadas en un alimento. Por lo anteriormente expuesto, se propone en este estudio la producción continua a escala pre-piloto de una cepa de BAL, *Carnobacterium piscicola* L103, que produce un compuesto metabólico con características antimicrobianas de tipo bacteriocina, determinando posteriormente su capacidad antagónica hacia *Listeria monocytogenes* en un alimento.

## 1.1 Objetivos

**1.1.1 Objetivo general.** Estudiar el efecto antagónico de una bacteriocina de *Carnobacterium piscicola*, obtenida mediante un sistema de cultivo continuo en un fermentador a escala pre-piloto, en contra de *Listeria monocytogenes*, aplicada sobre salmón ahumado.

**1.1.2 Objetivos específicos.** Para este estudio se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- verificar la posibilidad de producción de la bacteriocina de *C. piscicola* L103 en un cultivo continuo a escala pre-piloto.
- estudiar la actividad antimicrobiana de la bacteriocina obtenida y parcialmente purificada de *C. piscicola* L103 en contra de *L. monocytogenes*, aplicando dos niveles de actividad, sobre filetes de salmón ahumado envasados al vacío y almacenados a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- evaluar el efecto de las proteasas nativas del salmón ahumado sobre la actividad de la bacteriocina de *C. piscicola* L103 a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Cultivo de microorganismos

La microbiología industrial utiliza los microorganismos, generalmente cultivados a gran escala, para obtener productos comerciales de valor o para realizar importantes transformaciones bioquímicas. Todos estos procesos microbiológicos se basan en la potenciación de las reacciones metabólicas de los microorganismos, aumentando así la producción de los compuestos de interés (BROCK, 1999).

Estos procesos de producción de células se pueden clasificar desde el punto de vista industrial, preferentemente según el tipo de cambio que provocan en las propiedades y transporte de las sustancias presentes en el proceso. Según esto, puede distinguirse fundamentalmente entre procesos discontinuos (batch) y de flujo continuos (KUNZ, 1986 y BROWN, 1990).

**2.1.1 Cultivo batch.** El cultivo batch es un proceso donde los reactantes (nutrientes y células) son adicionados al inicio del proceso. Representa un sistema cerrado, excepto por el flujo de gases, puesto que un cultivo presenta generalmente producción de gases los cuales deben ser eliminados para mantener la presión adecuada dentro del fermentador (SAHM, 1993). También es llamado proceso discontinuo, donde es característico que se presenten cambios cualitativos por la acción de procesos internos resultantes del metabolismo de los microorganismos, como acumulación de ácido láctico en la multiplicación de cultivos de bacterias ácido lácticas (BAL) (KUNZ, 1986).

El cultivo batch es llevado a cabo hasta alcanzar las características deseadas del producto, representado por los microorganismos o sustancias metabolizadas por ellos. El tiempo y las condiciones del cultivo para alcanzar estas características dependerán del

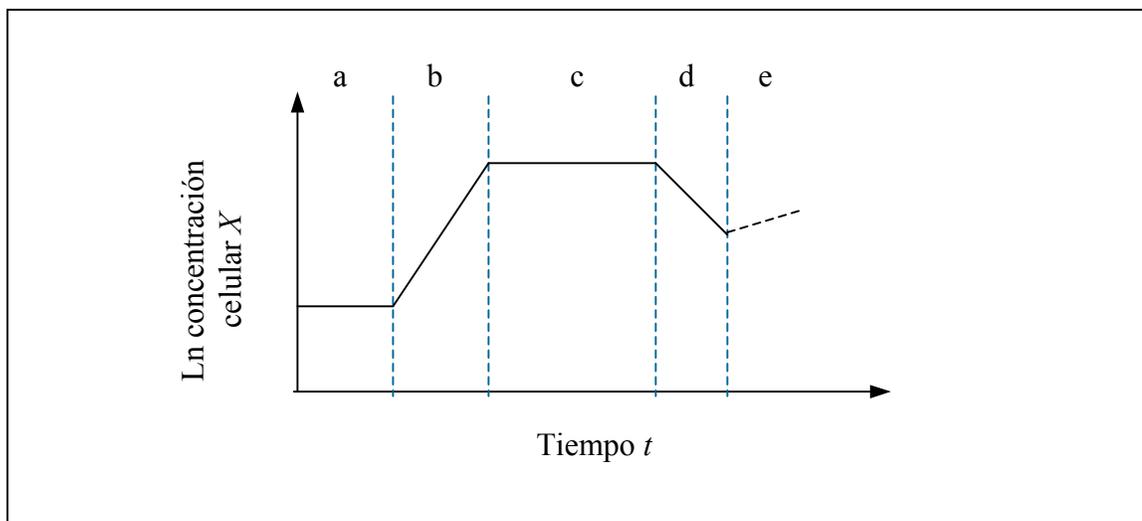
tipo de microorganismo, por lo que un cultivo batch es considerado un proceso transiente donde el tiempo cumple un rol fundamental, ya que las características del cultivo, tales como la etapa o fase de crecimiento del microorganismo, van a cambiar a través del tiempo (BHUGALOO-VIAL *et al.*, 1997). Sin embargo, esta duración va a depender no solo de la fase de latencia y de la velocidad específica de crecimiento, sino también de la concentración de biomasa inicial del cultivo (SAHM, 1993).

Para llevar a cabo un proceso de fermentación o producción celular a gran escala, es necesario primero realizar un cultivo batch de menor dimensión con la misma cepa. Posteriormente se utilizan los datos obtenidos tales como la curva de crecimiento característica del microorganismo con sus respectivas etapas y el tiempo de duplicación ( $t_D$ ) celular. Además se establecen parámetros como la velocidad de agitación del fermentador, medio de cultivo apropiado para la producción de la cepa y su rendimiento, para el caso que se desee obtener productos metabólicos de ellos. Por otra parte, se deben tener en cuenta parámetros como temperatura de cultivo, pH, volumen y concentración del inóculo (SINCLAIR y CANTERO, 1990).

Para comenzar un cultivo se debe llevar a cabo en primera instancia la llamada propagación de la cepa, cuyo objetivo es proporcionar al medio la cantidad óptima de cultivo para iniciar su producción en un equipo de fermentación adecuado. La propagación se lleva a cabo inoculando la cepa en un volumen pequeño de medio de cultivo, proporcionándole las condiciones óptimas para su desarrollo, como tiempo, temperatura, pH y agitación adecuada y luego aprovechar este cultivo para inocular un volumen mayor de medio, hasta llegar al volumen y concentración de microorganismos adecuado para su inoculación final en el fermentador, donde se llevará a cabo el cultivo batch (BOURGEOIS y MAFART, 1995).

El crecimiento de microorganismos en este tipo de cultivo por lo general es hasta el agotamiento de un componente esencial del medio nutritivo, siendo este uno de los inconvenientes más importantes de un cultivo batch según describe BROWN (1990) y se

caracteriza por una curva típica llamada curva de crecimiento (véase FIGURA 1) (SAHM, 1993).



**FIGURA 1 Curva de crecimiento característica de un cultivo batch.**  
FUENTE: SAHM, 1993.

Según muestra la FIGURA 1, durante la primera etapa de latencia (a), que se produce inmediatamente después de inoculado el cultivo, las células se adaptan a las nuevas condiciones del medio, por lo que su duración dependerá de la calidad del cultivo, es decir, de las condiciones que presente el medio en el que se van a desarrollar los microorganismos, como temperatura, pH y composición óptima para su crecimiento. En la siguiente fase de crecimiento exponencial o logarítmico (b), las células se encuentran en plena multiplicación a una velocidad que es la máxima para el juego de condiciones existentes, por no existir limitación de nutrientes. Una vez agotado el nutriente esencial se detiene el crecimiento celular, recibiendo esta fase el nombre de fase estacionaria (c). Finalmente las células no pueden mantener la actividad fisiológica y se produce autólisis, es la llamada fase de muerte o decaimiento (d). En algunos casos se produce una quinta etapa denominada fase de crecimiento crítico (e), donde se observa un leve crecimiento de células utilizando como nutriente el contenido citoplasmático de las células lisadas (ACEVEDO, 1988, SAHM 1993 y BROCK, 1999).

La velocidad específica de crecimiento  $\mu$ , es constante durante la fase de crecimiento exponencial y corresponde a la pendiente de este tramo en el gráfico semilogarítmico; la biomasa en tanto, representa la concentración celular en términos de masa (g/L) (ACEVEDO, 1988). Relacionado con  $\mu$  existe otro parámetro, el tiempo de duplicación  $t_d$ , definido como el intervalo de tiempo entre dos duplicaciones sucesivas de la población celular, y puede ser representado por:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

En cuanto a la formación de productos metabólicos, estos se pueden clasificar de dos tipos: aquellos que resultan de la producción de energía por parte de la célula ( $\text{CO}_2$ , etanol, ácido láctico), y los productos que requieren de energía para su síntesis, tales como polisacáridos, antibióticos y exo-enzimas. Estas últimas presenta generalmente una cinética de formación de producto no asociada al crecimiento. Sin embargo, si la tasa de formación de producto es directamente proporcional al crecimiento de la célula, entonces se le denomina como asociado al crecimiento, y proporciona una referencia básica para futuras producciones (SINCLAIR y CANTERO, 1990).

Por otra parte, de acuerdo a la etapa de formación de productos metabólicos, se pueden considerar dos tipos fundamentales: primarios y secundarios. Un metabolito primario es el que se forma durante la fase primaria del crecimiento del microorganismo, mientras que un metabolito secundario es el que se forma cerca del final de la fase de crecimiento, generalmente en la fase estacionaria (BROCK, 1999).

**2.1.2 Cultivo continuo.** El cultivo continuo es un sistema abierto, es decir, los nutrientes son adicionados y el caldo de cultivo es removido en igual cantidad por unidad de tiempo (SAHM, 1993). Es un método de prolongación de la fase de crecimiento exponencial de un organismo en cultivo batch, permitiendo la selección a voluntad de la velocidad específica de crecimiento y mantiene la población en un estado fisiológico definido, constante y seleccionable (BROWN, 1990).

Esta modalidad presenta algunos aspectos negativos en relación al cultivo batch, tal como la mayor complejidad de los equipos, el incompleto aprovechamiento del sustrato y un mayor riesgo de contaminación y mutación debido primordialmente a los mayores tiempos de operación (ACEVEDO y GENTINA, 1988).

De forma contraria al caso de un cultivo batch donde un incremento de la biomasa conduce a una disminución del sustrato con su consecuente agotamiento, en el cultivo continuo, la permanente alimentación de medio fresco estéril hace que se mantenga constante la cantidad de sustrato y de esta forma se mantiene la tasa de crecimiento y de población celular en equilibrio independiente del tiempo (SAHM, 1993), por lo que también es llamado cultivo en estado estacionario (BHUGALOO-VIAL *et al.*, 1997).

En todo cultivo continuo la velocidad específica de crecimiento  $\mu$ , depende del microorganismo en cuestión y de todos los factores que determinan el ambiente en que se desarrolla la población, tales como la composición del medio de cultivo, sus características reológicas, la temperatura y pH. Por consiguiente, la tasa de crecimiento puede regularse a través de la tasa del flujo, es decir los litros de medio de cultivo que ingresan por hora, y la densidad celular mediante la concentración del sustrato.

Para controlar la tasa de flujo de acuerdo al volumen del fermentador, se recurre a la tasa de dilución  $D$ , definida como:

$$D = \frac{F}{V}$$

Donde  $F$  corresponde al flujo del cultivo (mL/h) y  $V$  es el volumen del fermentador (mL). Al aumentar la concentración del sustrato limitante a medida que se incrementa la tasa de dilución, aumenta también el rendimiento del cultivo, hasta poco antes de un punto de descenso denominado dilución crítica ( $D_c$ ). En este punto la concentración celular disminuye de tal forma que sobrepasando esta  $D_c$ , se produce un lavado del cultivo, alcanzando ésta una concentración igual a cero en el interior del fermentador (KUNZ, 1986, ACEVEDO, 1988 y SINCLAIR y CANTERO, 1990).

En la práctica, en un cultivo continuo para mantener las condiciones deseadas se debe lograr un estado constante, que se refiere al punto donde la concentración de biomasa, sustrato y producto son constantes en el tiempo. Teóricamente, esto se logra cuando el cultivo es sometido a por lo menos tres tiempos de residencia o de restitución, siendo el tiempo de residencia ( $T_r$ ) el recíproco de la tasa de dilución (BROWN, 1990).

Estudios realizados por BHUGALOO-VIAL *et al.* (1997), demuestran que un cultivo continuo proporciona lejos una mayor productividad que un cultivo realizado en forma batch, expresándose esta productividad, en el caso de la bacteriocina, como unidades de actividad de la bacteriocina. Esta diferencia entre estos dos sistemas de cultivo puede ser explicada por el hecho de que el efluente removido contiene los desechos del crecimiento, tóxicos entre otros, que al ser eliminados dejan al cultivo y sus productos metabólicos liberados de toda posible inhibición. Además, el péptido o sustrato esencial es limitado por el crecimiento de células y la cantidad de péptidos es directamente proporcional a la biomasa producida, por lo que el suministro continuo de medio de cultivo elimina el problema de limitar el crecimiento por un cultivo no renovado.

Los equipos de fermentación utilizados, deben estar contruidos con ciertas características que le permitan llevar a cabo un buen proceso, de acuerdo a los requerimientos de cada microorganismo. Por ello es necesario tener presente entre otras, las necesidades de oxígeno de la célula. De este modo los fermentadores industriales se clasifican según son utilizados para procesos anaeróbicos o aeróbicos. Estos últimos, requieren un equipamiento mucho más elaborado, para asegurar que se logre el mezclado y la aireación adecuados (BROCK, 1999).

Un equipo de fermentación básicamente consta de un estanque o cilindro en el que son adaptados varios tubos y válvulas. Una parte importante es el sistema de aireación, que incluye un dispositivo llamado difusor y un instrumento para revolver llamado impulsor o agitador; a través del difusor pasa aire esterilizado por filtración al interior del estanque, además de proporcionar oxígeno al cultivo ayudan a limpiarlo de productos

metabólicos volátiles e indeseables. La agitación además, incrementa la velocidad de transferencia de oxígeno, transferencia de nutrientes y productos metabólicos entre el medio y las células.

Por otra parte para el control y vigilancia de los factores ambientales del proceso se requieren sensores para el monitoreo de la temperatura y el pH (BROWN *et al.*, 1989, BOURGEOIS y MAFART, 1995 y BROCK, 1999).

Los cultivos de microorganismos pueden ser utilizados para diversos fines, entre estos podemos citar la producción de compuestos farmacéuticos (antibióticos), aditivos alimentarios (aminoácidos), producción de vinos y cerveza, y la utilización de enzimas para transformaciones bioquímicas llamado proceso de enzimas inmovilizadas. En este último sistema frecuentemente se hace pasar una enzima soluble a un estado en el que de alguna forma quede inmovilizada, pudiendo de ésta forma hacer más fácil la reacción en condiciones a gran escala, además, las propias células ricas en enzima pueden ser inmovilizadas y el proceso industrial funcionar de forma continua (BROCK, 1999).

## **2.2 Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) representan un grupo heterogéneo de microorganismos considerados seguros y beneficiosos para la salud, además poseen una larga tradición como preservantes bacterianos naturales en alimentos (AGUILAR, 1991).

Estas bacterias pueden ser cocos o bacilos de tamaño variable, aerotolerantes, gram positivos, y solo utilizan sus sustratos, predominantemente azúcares, de manera fermentativa con formación de ácido láctico (JAGNOW y DAWID, 1991). Por lo cual una característica importante de este tipo de bacterias es su capacidad de fermentar glucosa, dando como producto final ácido láctico para el caso de las BAL homofermentativas, y además etanol, acetato y CO<sub>2</sub> para las BAL heterofermentativas (LARPENT, 1995).

Otra característica importante de estas bacterias son sus complejas necesidades de factores de crecimiento tales como: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. Esta es una de las razones por las que abundan en medios nutritivamente ricos y además, debido a su metabolismo anaeróbico se encuentran de manera espontánea en tres lugares: leche y productos lácteos, en plantas y en el intestino y mucosas de los animales y del hombre (JAGNOW y DAWID, 1991). Por esta razón es que los medios de cultivo deben ser complejos y ricos tales como el medio de cultivo MRS que tiene entre sus componentes extracto de carne y de levadura, sacarosa, como fuentes de proteína y carbohidratos (LARPENT, 1995).

Las BAL producen una serie de sustancias antimicrobianas responsables de la estabilidad de los alimentos fermentados (REQUENA y PELAEZ, 1995), por lo que son generalmente usadas para la elaboración de una elevada gama de este tipo de productos (AGUILAR, 1991 y BELIAR y THUALT, 1995). Además las bacterias lácticas pueden producir sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica, conocidas como bacteriocinas (REQUENA y PELAEZ, 1995), las cuales han sido aisladas de diversos alimentos como lácteos, pescado, carnes y vegetales fermentados y de carne envasada al vacío (BHUGALOO-VIAL *et al.*, 1997).

*Carnobacterium* es un género perteneciente a las BAL, gram positivo catalasa positiva, que se creó para agrupar algunos microorganismos anteriormente clasificados como lactobacilos con características comunes, tales como su capacidad para crecer en presencia de acetato y ser acidúricas. Al género pertenecen cuatro especies:

- *C. divergens* (previamente *Lactobacillus divergens*)
- *C. piscicola* (previamente *Lactobacillus piscicola*)
- *C. gallinarum*
- *C. mobile*

Estas BAL se aíslan a partir de carnes envasadas al vacío y en alimentos afines, así como también en el pescado y en las carnes de ave (JAY, 1994 y DUFFES *et al.*, 1999a). Según BUCHANAN y BAGI (1997), la actividad antilisteria de las carnobacterias ha

sido estudiada por su capacidad de crecer y producir bacteriocinas a bajas temperaturas y alta concentración de cloruro de sodio. También NILSSON *et al.* (1999), confirmaron la capacidad de *C. piscicola* para crecer rápidamente en salmón ahumado en frío a 5°C, sin embargo, DUFFES *et al.* (1999a) señalan que la eficiencia de la producción de bacteriocina aplicando la cepa en el alimento depende de los niveles iniciales de *L. monocytogenes*, temperatura de almacenamiento del alimento y concentración de la bacteriocina.

Por otra parte, ha sido demostrada la efectividad de *C. piscicola* L103 y su bacteriocina para el control de diferentes especies de *Listeria* en carne envasada al vacío (SCHÖBITZ *et al.*, 1999). Según DUFFES *et al.* (1999a), BAL como *C. piscicola* V1 son capaces de controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en salmón ahumado en frío y almacenado al vacío a 4°C y 8°C, sin embargo, afirman que el uso de la bacteriocina como un factor de seguridad para alimentos será mejorada con un buen método de purificación, facilitando así su aceptación en los futuros procedimientos regulatorios de la FDA<sup>1</sup>.

HUSS (1993) ha desarrollado técnicas para la incorporar un cultivo de cepa láctica en un alimento con el fin de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*, principalmente con el uso de BAL ya que de estas un gran número presentan una actividad antilisteria. En el caso de aplicar una cepa de BAL directamente en el alimento para la producción de bacteriocina como método de biopreservación, se deben tener en cuenta ciertas consideraciones, tales como, la capacidad de la cepa para crecer en las condiciones del producto al que va a ser aplicada, tener la capacidad de producir la bacteriocina bajo esas condiciones, producir una bacteriocina estable y activa, y por último, producir cambios sensoriales limitados, como formación de ácidos o gases (McMULLEN y STILES, 1996).

---

<sup>1</sup> FDA: Food and Drug Administration.

Paludan-Müller *et al.* y Nilsson *et al.*, citados por DUFFES *et al.* (1999a) mostraron que a 5°C la inoculación de *C. piscicola* en  $1,0 \times 10^1$  ufc/g no aceleraba los procesos deteriorativos del salmón ahumado en frío. Por otra parte el género *Carnobacterium* es considerado una especie segura para su uso en alimentos listos para el consumo.

### 2.3 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica, cuyas características responden a los siguientes criterios:

- tienen un estrecho espectro de acción sobre las especies taxonómicamente próximas a la cepa productora,
- poseen una parte proteica necesaria para su actividad,
- son bactericidas,
- para actuar se fijan sobre un receptor específico localizado sobre la célula objetivo,
- la célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra su propia bacteriocina,
- su producción está ligada a un plásmido (AHN y STILES, 1990 y BELIARD y THUAULT, 1995).

TAGG *et al.* (1976), por su parte consideran como bacteriocina compuestos antimicrobianos producidos por microorganismos Gram positivos que posea en su estructura un componente proteico activo biológicamente, presenten un reducido espectro de inhibición, generalmente sobre microorganismos relacionados taxonómicamente, y tengan capacidad bactericida frente a las cepas sensibles.

Mientras que la definición establecida por TAGG *et al.* (1976) es válida para muchas de las bacteriocinas estudiadas, los resultados obtenidos en la caracterización de estos compuestos han demostrado una gran heterogeneidad en cuanto a propiedades bioquímicas, peso molecular, espectro de actividad, mecanismo de acción, sistemas de producción y secreción (REQUENA y PELAEZ, 1995). De acuerdo a estas

características Klaenhammer *et al.*, citado por ENNAHAR *et al.* (2000) definen cuatro tipos de bacteriocinas de BAL, clase I: lantibióticos, péptidos pequeños; clase II: péptidos pequeños termoestables; clase III: proteínas termolábiles, y clase IV: bacteriocinas de estructura compleja. Según esto, la bacteriocina del *C. piscicola* L103 se ubicaría en la clase II de acuerdo con BORQUEZ (2000), quien afirma que esta bacteriocina presenta un PM menor a 10.000 Da, siendo por lo tanto un péptido pequeño, termoestable.

Las bacteriocinas de la clase II son producidas por cepas asociadas a los alimentos, por lo que son aisladas de productos tales como carne, productos lácteos y algunos vegetales (ENNAHAR *et al.*, 2000). La característica más común de esta clase de bacteriocinas es su fuerte acción bactericida en contra de cepas de *Listera*, siendo hasta ahora las más activas en contra de estas cepas, sin embargo también presentan acción bactericida en contra de varias otras bacterias gram positivas, como las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus* o *Leuconostoc mesenteroides*), presentándose inactivas en contra de bacterias gram negativas, como *Shewanella putrefaciens*. Por lo cual su adición a un producto alimenticio podría crear un desequilibrio en la flora de éste, pudiendo favorecer el desarrollo de microorganismos causantes de deterioro y por otro lado permitir que *Listeria* vuelva a desarrollarse a fines del período de almacenamiento (STOFFELS *et al.*, 1992, HANLIN *et al.*, 1993, DUFFES *et al.*, 1999a y ENNAHAR *et al.*, 2000,). Además se ha visto que algunas de estas bacteriocinas previenen el crecimiento de células vegetativas y esporas de *Clostridium* spp, sin embargo su espectro de acción es estrecho en comparación con otro grupo de bacteriocinas (ENNAHAR *et al.*, 2000).

El modo de acción de las bacteriocinas aún no está bien definido, pudiendo estar asociado con el mecanismo de ingreso a la célula, donde se liga a ésta y produce un efecto bactericida por desestabilización de las funciones de la membrana citoplasmática (HANLIN *et al.*, 1993), es decir, las bacteriocinas actúan por permeabilización de la membrana de los microorganismos susceptibles, causando un desbalance iónico y fuga

de fosfato inorgánico, produciendo finalmente un bloqueo de su actividad celular (ENNAHAR *et al.*, 2000).

Las bacteriocinas disponibles en Estados Unidos de Norteamérica se encuentran bajo la jurisdicción de la FDA y son generalmente reconocidas como seguras (GRAS)<sup>1</sup> por expertos calificados de la FFDCA<sup>2</sup>. Sin embargo, dependiendo de su uso pueden caer en la categoría de pesticidas cuando son aplicadas directamente sobre frutas o vegetales enteros, donde son reguladas por la Agencia de Protección del medio ambiente (EPA)<sup>3</sup> de Estados Unidos de Norteamérica (OWEN, 1996). Por otra parte, las bacteriocinas que serían utilizadas en productos cárneos requerirían de la aprobación del Servicio de Inspección y Seguridad en Alimentos (FSIS)<sup>4</sup> del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) (OWEN, 1996 y POST, 1996).

El proceso de aprobación en Estados Unidos de Norte América de una sustancia como la bacteriocina para su uso en alimentos debe seguir ciertos pasos, comenzando por una evaluación por parte del FDA clasificando a esta sustancia como segura (GRAS), luego la FSIS determina la conveniente aplicación de esta sustancia en el alimento y finalmente es notificado el nombre de la sustancia en estudio en un registro federal donde se encuentra una lista de sustancias aprobadas para su uso en carnes (POST, 1996).

Cabe destacar que una bacteriocina aprobada y comercializada es la nisina, cuya utilidad se basa principalmente en su aplicación en queso para prevenir el crecimiento y desarrollo de *Clostridium botulinum* y de sus esporas (MING y DAESCHEL, 1993). Esta bacteriocina fue aprobada en 1969 por la FAO y la Organización Mundial de la Salud (WHO)<sup>5</sup> y por el FDA en 1987, y en 1993 por la Comunidad Europea.

---

<sup>1</sup> GRAS: Generally recognized as safe.

<sup>2</sup> FFDCA: Federal Food, Drug, and Cosmetic Act.

<sup>3</sup> EPA: Environmental Protection Agency.

<sup>4</sup> FSIS: Food Safety and Inspection Service.

<sup>5</sup> WHO: World Health Organisation.

(AYMERICH *et al.*, 1998). Según POST (1996), las bacteriocinas ofrecen una gran compatibilidad con respecto a los requerimientos de la industria, al consumidor y a las regulaciones concernientes (POST, 1996).

Por su parte en Chile, una sustancia de este tipo debe ser evaluada por el Instituto de Salud Pública que depende directamente del Ministerio de Salud, y de acuerdo a la clasificación que presente, la derivan a la autoridad sanitaria competente.<sup>1</sup>

## **2.4 Presencia en salmón ahumado de *Listeria* spp.**

*Listeria* spp. ha sido tema de muchos estudios, especialmente *L. monocytogenes*, reconocida como un patógeno que contamina el alimento y representa un peligro potencial principalmente para mujeres embarazadas (alta mortalidad en recién nacidos) y para personas inmunodeficientes (LOVETT y TWEDT, 1988). Ha sido aislada frecuentemente de pescado ahumado (DUFFES *et al.*, 1999b), pero a pesar de ello no se han detectado casos de enfermedades producidas por esta bacteria relacionados con el consumo de este tipo de productos (FAO, 1999). El género incluye siete especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* y *L. murrayi* (JAY, 1994).

**2.4.1 *Listeria monocytogenes*.** Las listerias son bacilos de cadena corta Gram positivos, catalasa positivos (OMS, 1987 y JAY, 1994), se desarrollan tanto en presencia como en ausencia de aire (en productos empacados en bolsas plásticas permeables al oxígeno, como en productos sellados al vacío en bolsas impermeables al oxígeno) (INTESAL, 2000).

Sus necesidades nutritivas son las típicas de otras especies de bacterias gram positivas, crecen bien en medios como caldo infusión de cerebro y corazón, caldo soya tripticasa y caldo triptosa. Respecto del pH necesario para el crecimiento de estas especies se ha

---

<sup>1</sup> Comunicación personal, Ministerio de Salud Concepción, 2001.

observado que este fluctúa entre pH 6,0 y 8,0, sin embargo, pueden desarrollarse en un rango mucho mayor, entre 4,1 y 9,6. Respecto de la temperatura necesaria para el crecimiento, esta fluctúa entre 1 y 45°C, teniendo un rango óptimo entre 20 y 25°C y un desarrollo acelerado cerca de los 37°C (JAY, 1994 y FAO, 1999). Una característica muy importante es su rápida multiplicación en alimentos almacenados a temperaturas de refrigeración (INTESAL, 2000).

La capacidad de la *L. monocytogenes* para crecer en un rango de temperaturas bastante amplio y soportar concentraciones de sal sobre el 12% (FAO, 1999) y pH aproximados de 4,5 hacen que la bacteria se presente ampliamente distribuida en la naturaleza, pudiendo encontrarse en materia vegetal en descomposición, en los suelos, en las heces de los animales, en aguas servidas, de arroyos y en aguas dulces y marinas (LOVETT y TWEDT, 1988, RORVIK *et al.*, 1991, HUSS, 1993, JAY, 1994 y FAO, 1999), en animales e incluso en el hombre. Ese último puede ser portador de la bacteria sin desarrollar la enfermedad (OMS, 1987). Cabe destacar que entre el 4 y 6% de la población es portadora de la bacteria (LOVETT y TWEDT, 1988 y FAO, 1999).

*L. monocytogenes* es el agente de la listeriosis, tanto en animales como en el hombre, una enfermedad que se caracteriza por no presentar una sucesión única de síntomas, los que dependen del estado del hospedador. En animales, la listeriosis ha sido mencionada como causante de abortos, encefalitis, septicemia y mastitis, afectando una amplia variedad de animales tanto domésticos como silvestres, incluyendo aves y especies ovinas, caprinas y bovinas (OMS, 1987 e INTESAL, 2000). En cuanto al hombre, el grupo más afectado es el de los recién nacidos, personas mayores de 50 años, mujeres embarazadas y aquellas personas que se encuentren con el sistema inmune deprimido. Las principales manifestaciones de la enfermedad son meningitis, abortos y septicemia prenatal (JAY, 1994 y DUFFES *et al.*, 1999a). El aborto listérico en la mujer suele producirse en la segunda mitad del embarazo, sin embargo si no ocurriera, la meningitis neonatal podría producir hidrocefalia como secuela en el recién nacido (OMS, 1987 e

INTESAL, 2000). Por estas razones, JAY (1994) y DUFFES *et al.* (1999a) señalan un porcentaje de muerte de un 25 a 30% de los casos reportados (FAO, 1999).

Basados en la asociación de la bacteria con intoxicaciones que tienen altas tasas de mortalidad, su habilidad para desarrollarse rápidamente en alimentos refrigerados y el hecho de prácticamente desconocerse la cantidad de organismos necesarios para causar la enfermedad, el FDA ha establecido cero tolerancia para la *L. monocytogenes* en aquellos alimentos consumidos por el público sin ningún tratamiento térmico (HUSS, 1993, DUFFES *et al.*, 1999, FAO, 1999 e INTESAL, 2000).

**2.4.2 Salmón ahumado.** El cultivo de salmón ha permitido una disminución en el costo del producto, haciendo más accesible el consumo de salmón ahumado, convirtiéndose en un producto de importación y exportación muy importante. De este modo, las exigencias en normas de calidad son variadas y muy severas para el caso de algunos países, como el requisito por parte de Estados Unidos, Austria, Nueva Zelanda, Italia y Australia (FAO, 1999) de “tolerancia cero” de *L. monocytogenes* en 25 g de salmón. Normas como estas han obligado a las empresas a mejorar la calidad higiénica de sus plantas y crear conciencia respecto a la importancia de este producto (DUFFES *et al.*, 1999b).

El salmón ahumado en frío es un producto ligeramente preservado, muy apreciado por la comodidad que ofrece para ser consumido. Sin embargo el cuidado en la manipulación y medidas de control durante el procesamiento y almacenamiento son esenciales para evitar alguna enfermedad debido a este producto (HUSS *et al.*, 1995).

Según el Comité Asesor Nacional sobre Criterios Microbiológicos de Alimentos de Dinamarca, citado por HUSS *et al.* (1995), es evidente el alto riesgo que presenta el pescado ahumado en frío, por las siguientes razones: hay una gran evidencia epidemiológica de este producto asociado a enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA); el producto está sujeto a una nociva potencial recontaminación después del

procesamiento y antes del empaque; además es sometido a mucha manipulación durante la distribución y consumo, lo cual contribuye a su contaminación. Por otra parte, un riesgo adicional lo constituye el que sea un alimento que se presenta listo para el consumo, sin tratamientos posteriores al envasado o en el hogar.

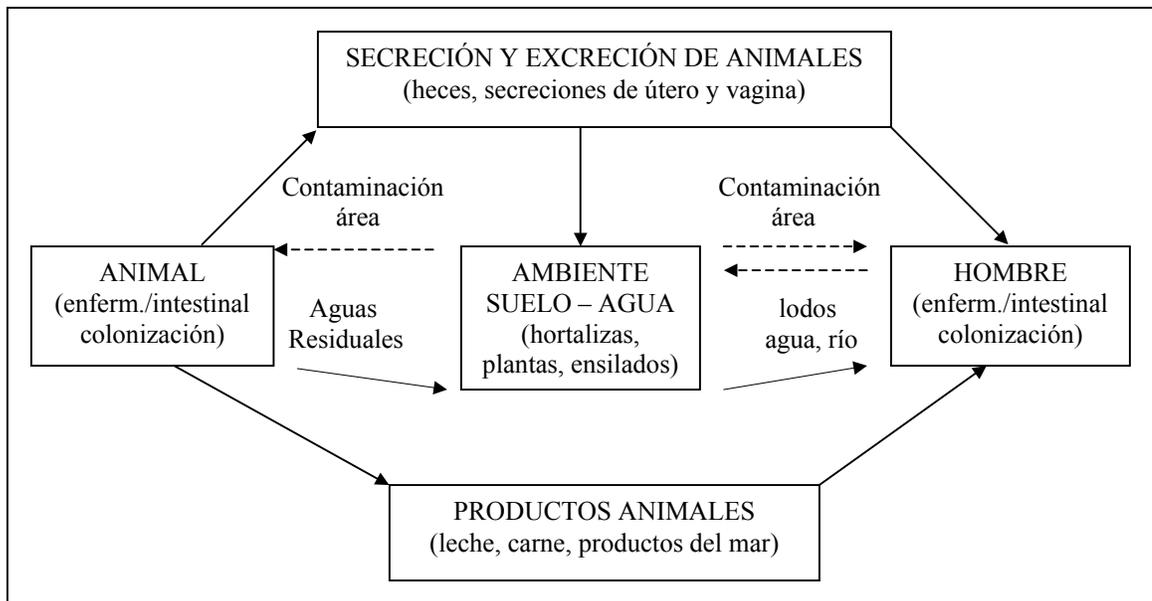
El salmón ahumado en frío está contaminado frecuentemente con *L. monocytogenes* (GUYER y JEMMI, 1991, EKLUND *et al.*, 1995, HUSS *et al.*, 1995, DUFFES *et al.*, 1999a y NILSSON *et al.*, 1999), estudios reportados por la FAO revelan que entre el 10 y 60% del salmón fresco para ahumar está contaminado con *L. monocytogenes*, con niveles usualmente  $\leq 100$  ufc/g (FAO, 1999).

Este patógeno es capaz de multiplicarse en considerable número durante 3 a 6 semanas de almacenamiento a 4 ó 5°C, sin embargo, la microflora del salmón puede jugar un papel importante en el control de la *L. monocytogenes* (BUCHANAN y BAGI, 1997 y NILSSON *et al.*, 1999). Rorvik *et al.* y Huss *et al.* citados por NILSSON *et al.* (1999) han reportado que el crecimiento de *L. monocytogenes* es inhibido en el salmón ahumado en frío por la presencia de altos niveles de bacterias ácido lácticas, sugiriendo de esta forma que la presencia de flora competitiva inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* por agotamiento de nutrientes (BUCHANAN y BAGI, 1997 y NILSSON *et al.*, 1999).

La contaminación de *Listeria* puede provenir del agua de mar o de la manipulación durante el proceso (EKLUND *et al.*, 1995 y DUFFES *et al.*, 1999b). El NaCl, el envasado, el humo y la temperatura de ahumado no tienen gran efecto sobre el crecimiento de *Listeria* cuando son considerados en forma separada (PETERSON *et al.*, 1993) pero en combinación estos parámetros pueden inhibir su crecimiento.

Existe aún cierta controversia en el modo de transmisión de este patógeno hacia los alimentos. En la FIGURA 2 se representa algunos de los modos de diseminación del

microorganismo en el ambiente, junto con las diversas fuentes de esta bacteria para las personas.



**FIGURA 2 Modos de diseminación de *L. monocytogenes* en el medio ambiente, animales, alimentos y personas**  
FUENTE: JAY, 1994.

La presencia de *L. monocytogenes* en el producto final no puede ser completamente controlada, así como su crecimiento en el salmón ahumado en frío no puede ser identificado *in situ* (HUSS, 1993), sin embargo, los primeros esfuerzos deben tender a eliminar la bacteria de la piel del pescado antes de que sea fileteado, por lo que se recomienda:

- idealmente inactivar la bacteria en la materia prima,
- reducir a un mínimo la presencia de *L. monocytogenes* en el producto final con buenas prácticas de manufactura durante el proceso y aplicación de sistemas HACCP y POS, ya que estudios realizados por HUSS *et al.* (1995) muestran que la contaminación se produce en línea, por lo que buenas prácticas de manufactura reducirían al patógeno en el producto final,

- por las características de preservación de este alimento se recomienda una vida útil a 5°C de 3 semanas como máximo.

Estas condiciones garantizan una seguridad en el alimento (HUSS *et al.*, 1995, FAO, 1999 e INTESAL, 2000).

Listeria puede ser inhibida por compuestos químicos como nitrito de sodio, lactato de sodio y diferentes ácidos, así como sanitizantes de amonio cuaternario, cloro entre otros, sin embargo el uso de estas sustancias pueden afectar sensorialmente al producto, por lo que el uso de bacteriocinas como método de biopreservación se ha vuelto más atractivo ya que no afecta sensorialmente al producto final (McMULLEN y STILES, 1996 y DUFFES *et al.*, 1999b).

A pesar de todos los esfuerzos realizados durante la elaboración del producto, uno de los mayores problemas del salmón ahumado en frío es la prevención de la multiplicación de *L. monocytogenes* en el producto final y la falta del conocimiento sobre el número exacto de células que representa un peligro para el ser humano. Según ICMSF (1994) citado por HUSS *et al.* (1995) cantidades menores e iguales a 100 ufc/g no representa un alto riesgo para una persona con su estado inmune normal, por lo que actualmente Alemania, Francia y Holanda (FAO, 1999) aceptan el ingreso de salmón ahumado en frío con estos recuentos.

## **2.5 Proteasas en el salmón**

Las bacteriocinas, poseen en su estructura un componente proteico biológicamente activo (TAGG *et al.*, 1976) por lo que son sensibles a enzimas proteolíticas, presentando por lo tanto un gran interés el conocer el efecto de las proteasas nativas del salmón frente a la actividad de estas sustancias antagónicas (DUFFES *et al.*, 1999a).

Las enzimas son catalizadores de sistemas biológicos, es decir, tienen la propiedad de acercar a los sustratos con una orientación química óptima para establecer o romper los

enlaces químicos. Una de sus grandes características son el poder catalítico y especificidad (STRYER, 1995).

Estudios realizados por AHN y STILES (1990) demuestran que una serie de enzimas proteolíticas, como proteasas tipo I, IV y X, presentan una inactivación total de la sustancia antagónica, analizadas mediante actividad de la bacteriocina a través del tiempo, sin embargo, las enzimas no proteolíticas no causaron inactivación de la sustancia antagónica, comprobando de esta forma su composición proteica y facilitando teóricamente su uso en alimentos con gran actividad lipídica, como es el caso de los salmonídeos.

Para poder utilizar la bacteriocina sobre el salmón ahumado se debe verificar el efecto de las proteasas naturales sobre esta sustancia. Estudios se han realizado con el uso del jugo de salmón ahumado en frío aplicando directamente un tipo de bacteriocina llamada divercina V41, manteniendo las muestras a temperatura ambiente durante una semana. Para analizar el efecto enzima - bacteriocina se realizaron análisis de actividad de la bacteriocina cada día, no presentando inactivación durante este período de tiempo (DUFFES *et al.*, 1999a).

### 3. MATERIAL Y METODO

#### 3.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo

La cepa bacteriana utilizada para la producción de la bacteriocina fue *C. piscicola* L103, aislada a partir de carne envasada al vacío, y productora de una sustancia antagónica en contra de *L. monocytogenes* establecido por SCHÖBITZ (1989)<sup>1</sup>. El medio de cultivo utilizado fue caldo D-MRS (SCHILLINGER *et al.*, 1993) (ANEXO 1) con el pH ajustado a 6,5 con NaOH 1 N o HCl 1 N.

Como cepa indicadora de la actividad de la bacteriocina se trabajó con *L. monocytogenes* Lm82 (Food & Drug Administration, Washington DC, EE.UU.NA) conservada en Caldo de Carne Cocida (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI) a 4°C, y repicada en Caldo Soya Trypticasa (Caldo ST) (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI) para su uso. Los medios de cultivo fueron esterilizados a 121°C durante 15 minutos (Autoclave Selecta Autotester E75L. España).

#### 3.2 Producción de la bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* L 103

Para la producción de bacteriocina se realizó un cultivo de la cepa productora, el cual se trabajó bajo condiciones de cultivo continuo utilizando un fermentador (Microferm Fermentor, New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J., USA) de 10 L de capacidad, bajo condiciones controladas de laboratorio. En primera instancia se realizó la propagación de la cepa (3.2.1), luego un cultivo batch (3.2.2) y finalmente el cultivo continuo (3.2.3).

**3.2.1 Propagación de la cepa de *C. piscicola* L103.** Para realizar la propagación de *C. piscicola* L103 ésta se inoculó en una concentración final del 1% desde un cultivo de 24

---

<sup>1</sup> Schöbitz, R., 1989. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Datos no publicados.

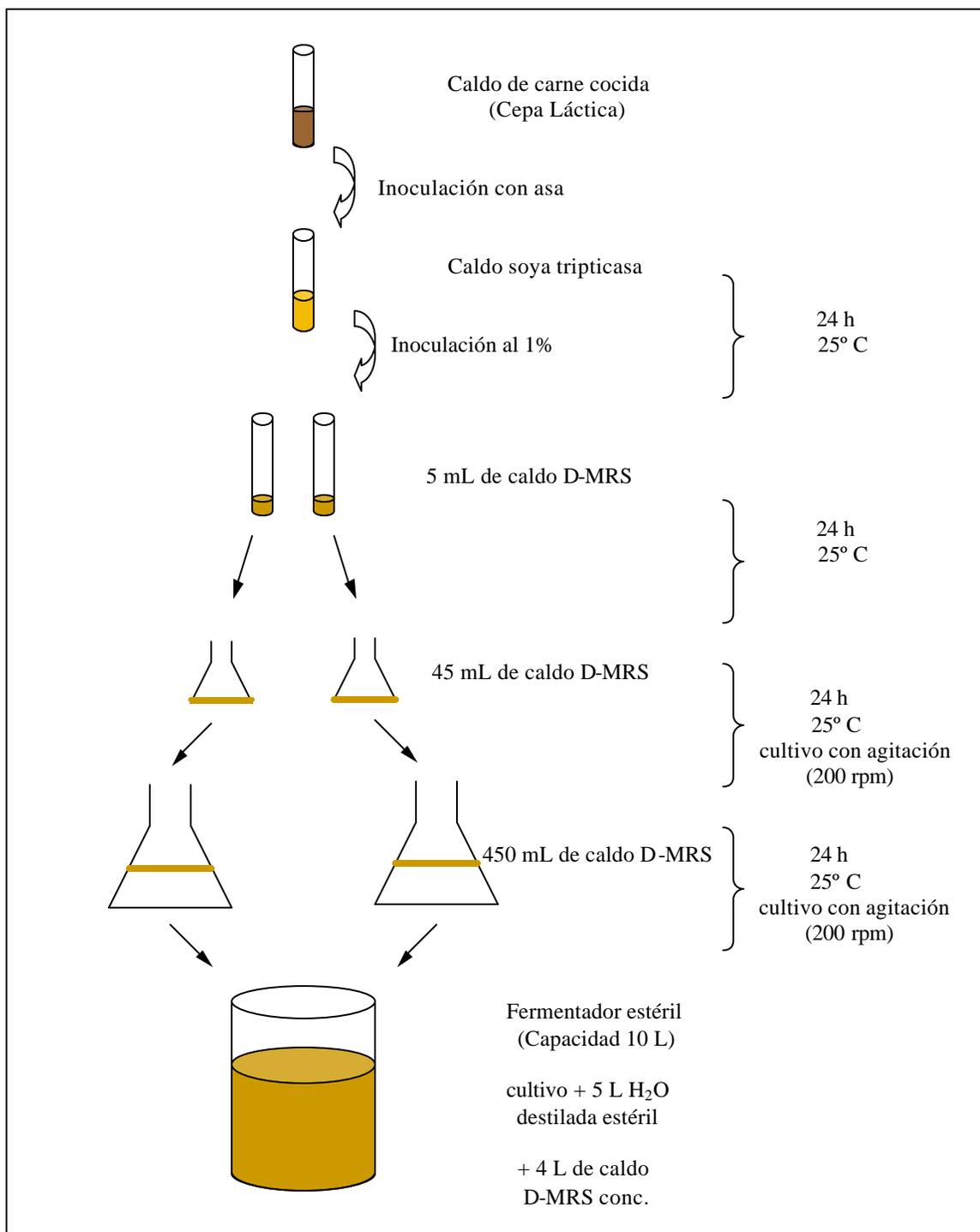
horas en caldo soya tripticasa (ST), a dos tubos con 5 mL de caldo D-MRS, los que fueron incubados a 25°C por 24 h. Posteriormente los dos tubos se inocularon en dos matraces con 45 mL de caldo D-MRS, los cuales fueron llevados a un Shaker (Lab-Line Environ-Shaker. Lab-Line Instruments Inc. Melrose, ILL.) con agitación (200 rpm) a 25°C durante 24 h. Cumplido el tiempo, el contenido de ambos matraces, se inoculó en dos matraces de 500 mL, cada uno con 450 mL de caldo D-MRS, incubándolos bajo las condiciones anteriormente descritas, por 24 h. En la FIGURA 3 se muestra esquemáticamente la propagación realizada para la BAL.

**3.2.2 Cultivo batch.** El estanque de fermentación fue esterilizado con 5 L de agua destilada durante 30 minutos a 121°C. Una vez fría el agua se le agregaron en forma aséptica, bajo una campana de flujo laminar (Pure aire. Corporation of American, Van Nuys. California) 4 L de caldo D-MRS estéril concentrado, equivalente en su composición a la preparación de 10 L de medio de cultivo.

Los accesorios utilizados en el sistema de cultivo batch y cultivo continuo (3.2.3), como mangueras y filtros de aire, fueron esterilizados a 121°C durante 15 minutos.

Para iniciar el cultivo se utilizó el inóculo de dos matraces de 500 mL con caldo correspondiente a la cepa *C. piscicola* descrito en 3.2.1, los que fueron introducidos al fermentador bajo condiciones de higiene controlada, comenzando de esta forma el cultivo batch (tiempo 0) (FIGURA 3).

Este cultivo se realizó durante 12 h para llegar a un máximo de actividad de la bacteriocina (BORQUEZ, 2000), bajo condiciones de operación controladas correspondientes a esta etapa. El pH se mantuvo en 6,5 mediante adición automática de NaOH 5N durante la fermentación. La temperatura del cultivo se fijó en  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  con agitación (250 rpm) y un flujo de aire de 12.000 cc por minuto.



**FIGURA 3** Esquema general de propagación de la cepa láctica *C. piscicola* L103.

Cada 2 h se realizaron los siguientes controles:

- determinación de la densidad óptica a 578 nm (Espectrofotómetro Genesys 5. Spectronic Instruments)
- control microscópico para verificar la pureza del cultivo (Leica Mikroskopie und Systeme GMBH 35530 Wetzlar, Germany)
- recuento de *C. piscicola* L103, por la técnica en superficie (ICMSF, 1988) utilizando agar D-MRS como medio para la siembra
- determinación de actividad de la bacteriocina (3.3)

**3.2.3 Cultivo continuo.** Este cultivo se inició después de 12 h de cultivo batch, bajo las mismas condiciones de operación que se señalan en 3.2.2, para lo cual el sistema, se alimentó con caldo D-MRS fresco mediante una tasa de dilución de  $0,28 \text{ h}^{-1}$  (BÓRQUEZ, 2000), que corresponde a un flujo de 2,8 L/h (ANEXO 2) controlado mediante la utilización de una bomba (Fluid Metering, Inc., Oyster Bay., N.Y.). Para el flujo de salida del cultivo se utilizó una bomba peristáltica (Watson Marlow, Inc., 220 Ballardvale street Wilmington, MA 01887, England). Este flujo se mantuvo constante hasta completar 5 tiempos de residencia, obteniendo así la cantidad de cultivo para el sobrenadante requerido. En la FIGURA 4 se presenta una imagen del equipo de fermentación utilizado para la producción de la bacteriocina.

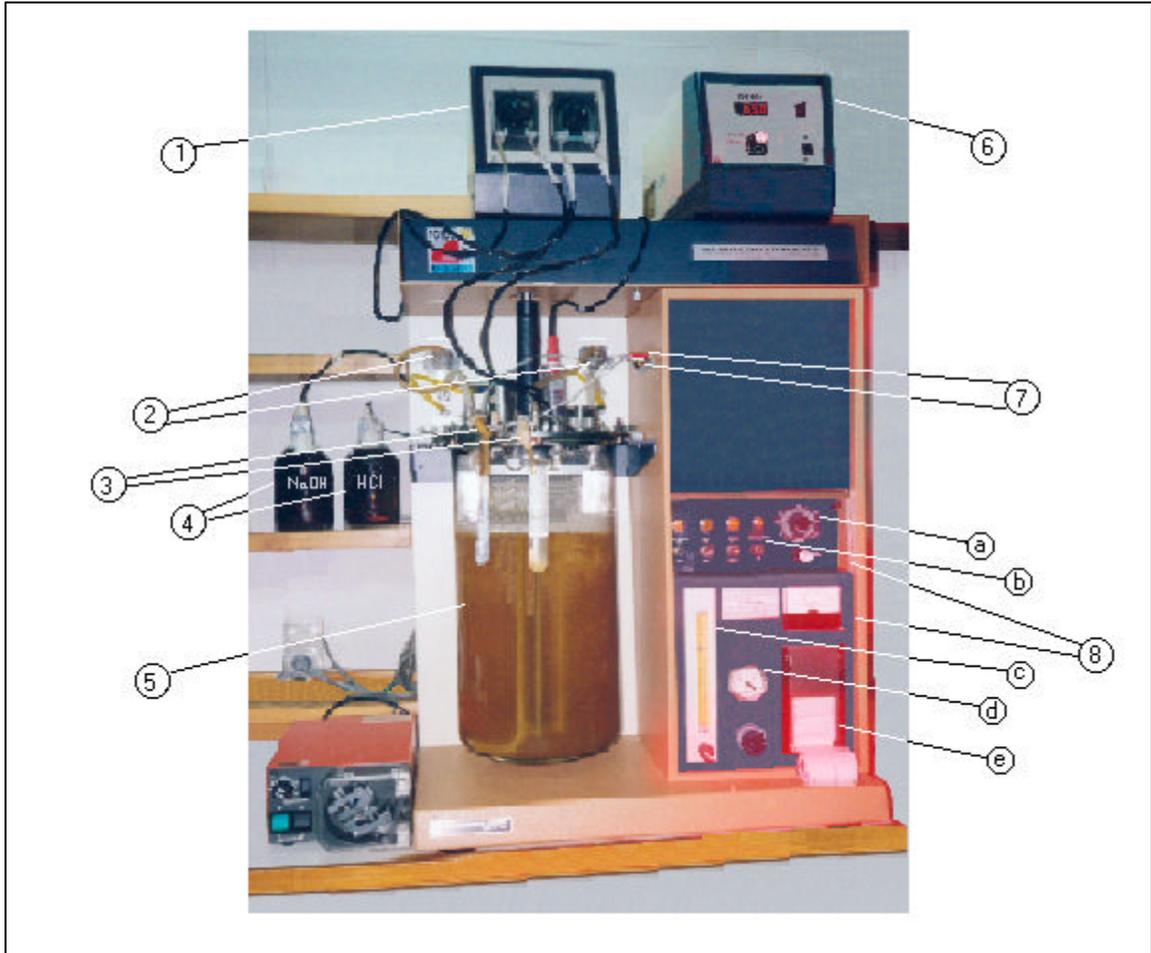
Cada 4 h se determinó la pureza del cultivo, densidad óptica, recuento de la cepa láctica y actividad de la bacteriocina según descrito en (3.2.2).

### 3.3 Determinación de la actividad de la bacteriocina

Para conocer la actividad de la bacteriocina, se utilizó el sobrenadante libre de células del cultivo de *C. piscicola*.

Se tomó una muestra del cultivo cada 2 ó 4 h (3.2.2) la que fue sometida a centrifugación (Centrífuga Beckman J2-HS, Germany) por 15 min a 7.700 g (10.000 rpm) a 4°C. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 6,5 con NaOH 1 N o HCl 1N según

fuese necesario. Posteriormente, para eliminar las células viables que hubieran quedado, éste se pasó a través de un filtro de  $0,22 \mu$  (Gelman Sciences, Supor®-200, 25 mm, Membrane Filter).



**FIGURA 4** **Equipo de fermentación (Microferm Fermentor, New Brunswick Scientific Co. Inc., N.J., USA).** (1) dispensador automático de ácido y base (HCl y NaOH); (2) filtros de aire (entrada y salida); (3) conductos de entrada y salida del medio de cultivo para un sistema continuo; (4) abastecedor de ácido y base (HCL y NaOH); (5) estanque de fermentación con capacidad para 10 L; (6) pH-metro; (7) electrodos de temperatura y pH; (8) panel de control del equipo, incluye: (a) control de la temperatura interna del fermentador; (b) interruptores de encendido y apagado del equipo; (c) control para la entrada de aire; (d) control de la presión interna; (e) registro gráfico de la temperatura a través del proceso.

Se utilizó la técnica de “gota sobre césped” descrita por BAREFOOT y KLAENHAMMER (1983), empleando como cepa indicadora un cultivo de 18 h de *L. monocytogenes* Lm82 diluido 10 veces en buffer fosfato pH 7,2 (APHA, 1992). Con 0,7 mL de esta solución se inoculó un tubo de agar D-MRS semisólido (7 mL al 0,75% de agar), el que posteriormente fue vertido sobre una placa con agar soya tripticasa (AST). Con el sobrenadante se realizaron diluciones seriadas, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64, en buffer fosfato 0,05 M pH 7,0 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ )<sup>1</sup>, las que fueron depositadas en forma de gotas sobre el césped de agar semisólido en un volumen de 20  $\mu\text{L}$ . Posteriormente se dejó secar la placa por 30 minutos aproximadamente bajo una campana de flujo laminar. Las placas fueron incubadas por 24 h a 25°C en una cámara que contenía un 10% de  $\text{CO}_2$ , para el desarrollo de *L. monocytogenes* y visualización de los halos de inhibición. En la FIGURA 5 se presenta un esquema de la prueba de la gota sobre césped.

La interpretación de esta técnica está basada en la formación de halos de inhibición producidos por la cepa indicadora en las zonas donde se depositó la gota de sobrenadante, que contenía la bacteriocina. Se consideró una prueba positiva cuando el halo producido se presentaba de forma nítida, con bordes delimitados, transparente y sin desarrollo en el interior. La actividad fue definida como el recíproco de la mayor dilución que presentó un halo de inhibición de la cepa indicadora, siendo expresada como Unidades de Actividad por mililitro (UA/mL).

Los ensayos de actividad se realizaron en duplicado.

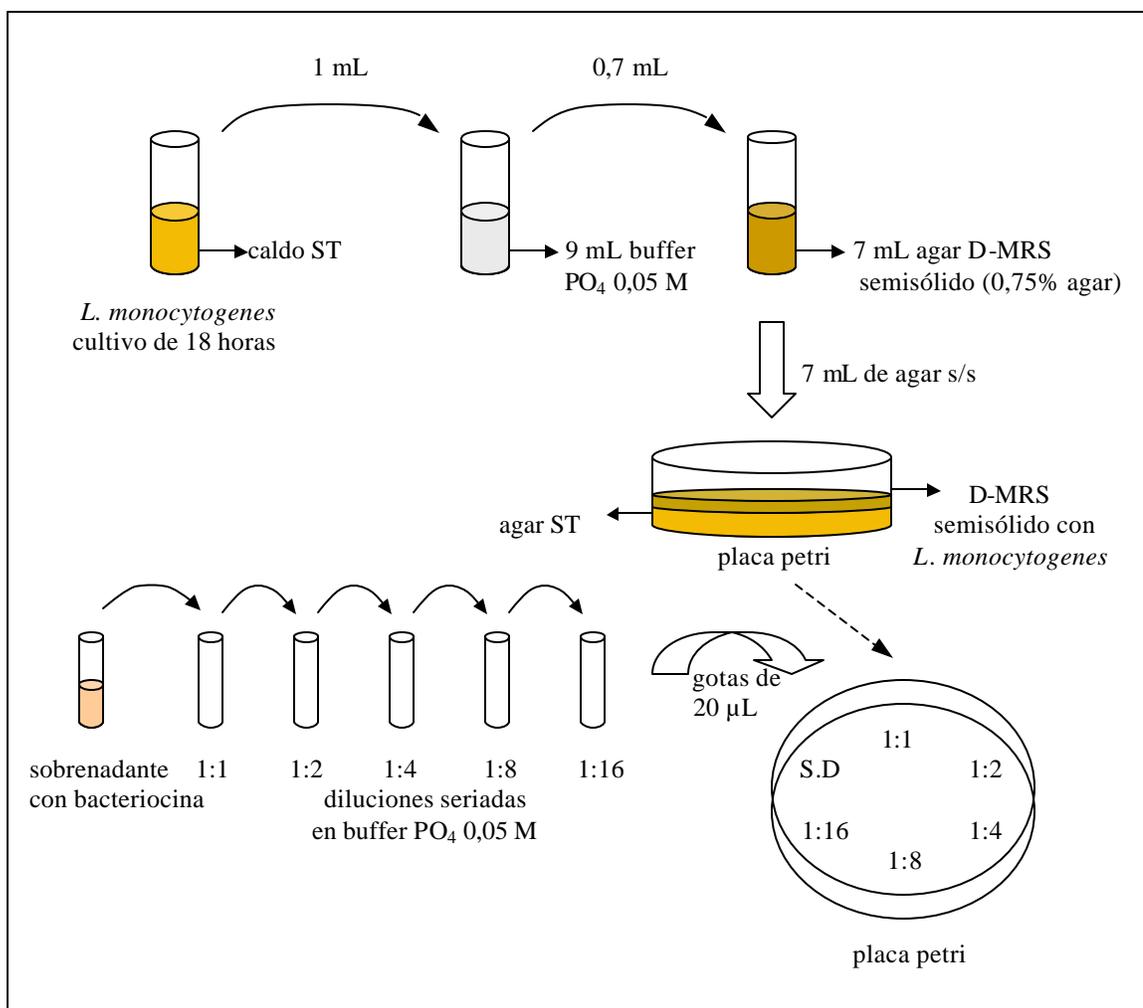
### **3.4 Purificación parcial de la bacteriocina**

El proceso de purificación, según DELGADO (2001) consistió en dos etapas. En primer lugar el cultivo obtenido de la producción (3.2) fue centrifugado por 15 min a 7.700 g (10.000 rpm) a 4°C y luego el sobrenadante fue sometido a una ultrafiltración batch en

---

<sup>1</sup>  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : Reactivo J.T. Baker. ACS. México  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  : Merck. Germany.

un equipo Millipore (Millipore Corporation, Bedford, M.A.) de 146 mm de diámetro de membrana circular. Como primera etapa de filtración, el sobrenadante fue ultrafiltrado a través de una membrana de 30 KD y posteriormente en una de 10 KD (Millipore Corporation, USA), luego se pasó a través de una membrana de 3 KD (Diaflo® Amicon, USA), seguido de una diafiltración con agua desionizada con esta misma membrana. En cada etapa se realizaron pruebas de actividad de la bacteriocina a los retenidos y permeados. El retenido obtenido de la diafiltración fue el que se utilizó para los estudios 3.5 y 3.6.



**FIGURA 5** Esquema general de la prueba de la “gota sobre césped” utilizada para la determinación de la actividad de la bacteriocina.

### **3.5 Estudio de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina en contra de *L. monocytogenes* inoculada sobre filetes de salmón ahumado**

Para este estudio, se trabajó con la bacteriocina producida (3.2) y purificada parcialmente (3.4). La que posteriormente fue inoculada sobre filetes de salmón ahumado.

**3.5.1 Sustrato para la inoculación.** Se utilizó filetes de salmón ahumado en frío obtenidos en forma congelada de la planta salmonera Cultivos Marinos Chiloé, ubicada en la Ruta 5 Sur, Km. 6 Ancud - Chacao, los cuales fueron trozados en dimensiones de  $7 \times 5 \times 0,5$  cm, medidos con un pie de metro (Mitutoyo, Vernier Caliper Mitutoyo Corporation, Japan), como lo muestra la FIGURA 6. Cada trozo constituyó una muestra.

**3.5.2 Inóculo de la cepa de *L. monocytogenes* Lm82.** Se trabajó con un cultivo de 18 h de *L. monocytogenes* Lm82, mantenida en caldo ST a 25°C, el cual fue diluido en buffer fosfato pH 7,2 (APHA, 1992) hasta una concentración de  $10^4$  ufc/mL, la que posteriormente fue aplicada sobre las muestras de salmón ahumado (3.5.1).

La inoculación se llevó a cabo bajo un sistema de campana fabricado de polietileno de dimensiones ( $40 \times 80 \times 50$ ) cm, donde se tomó cada trozo de salmón (3.5.1) y se inoculó por aspersión con la utilización de un frasco plástico con capacidad de 500 mL, con atomizador, dando un volumen de 0,2 mL aplicado por muestra, quedando la bacteria en una concentración de  $10^3$  ufc/cm<sup>2</sup> sobre el salmón.

**3.5.3 Inoculación de la bacteriocina parcialmente purificada.** Se utilizó la bacteriocina de *C. piscicola* L103 producida según descrito en (3.2), parcialmente purificada (3.4) y diluida en buffer fosfato 0,05 M pH 7,0 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) con actividades de 800 y 1.600 UA/mL respectivamente (3.3).

La inoculación se llevó a cabo a través de un sistema de aspersión (frasco con atomizador), aplicada a las muestras inoculadas previamente con *L. monocytogenes* (3.5.2) con la actividad de bacteriocina correspondiente.

Este trabajo se realizó bajo la campana de polietileno utilizada anteriormente (3.5.2).

**3.5.4 Condiciones de almacenamiento.** Las muestras tratadas en 3.5.3 fueron introducidas en bolsas para envasado al vacío, utilizando para esto una máquina envasadora (MINIVAC 300. Construzioni Meccaniche Industriali. Italia).

Los trozos de filete de salmón fueron almacenados bajo condiciones de refrigeración a  $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante 28 días.



**FIGURA 6** Filete de salmón ahumado envasado al vacío junto a pié de metro utilizado para la medición del tamaño de la muestra.

**3.5.5 Tratamientos.** Para este estudio se trabajaron cuatro tipos de tratamientos que se señalan a continuación:

- A: bacteriocina 1.600 UA/mL (actividad inicial) + *L. monocytogenes* Lm82 ( $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup>, concentración inicial).
- B: bacteriocina 800 UA/mL (actividad inicial) + *L. monocytogenes* Lm82 ( $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup>, concentración inicial).
- C: control de la cepa indicadora *L. monocytogenes* Lm82 ( $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup>, concentración inicial).
- D: control con buffer fosfato en reemplazo de la bacteriocina, para observar el efecto de la humedad sobre los filetes de salmón ahumado y verificar la posible existencia de *L. monocytogenes* en las muestras.

Cada tratamiento se realizó en triplicado y la experiencia se realizó dos veces.

**3.5.6 Muestras y análisis microbiológicos.** Los muestreos se realizaron cada 7 días durante los 28 días de almacenamiento (3.5.4), comenzando el día 0 correspondiente a las muestras recién inoculadas (3.5.3).

El análisis microbiológico realizado fue el recuento de *L. monocytogenes* sobre agar selectivo para *Listeria*, OXA (Oxoid. Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) incubado a 36°C durante 48 h.

Para el recuento de *L. monocytogenes*, la muestra de salmón se introdujo dentro de una doble bolsa Stomacher y se le agregó 50 mL de buffer fosfato pH 7,2 (APHA, 1992), posteriormente fue sometida a una agitación a alta velocidad durante 2 min en un equipo Stomacher (Seward Medical. London. UK). Se hicieron diluciones adicionales de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  según el día de almacenamiento para poder contabilizar las colonias. La siembra se realizó mediante la técnica de recuento en superficie (ICMSF, 1988).

Los resultados finales de los recuentos fueron expresados en  $\text{cm}^2$  de área.

**3.5.7 Análisis estadístico.** Los análisis realizados a los resultados obtenidos de los recuentos microbiológicos fueron evaluados mediante un análisis de varianza multifactorial, utilizando para ello un programa estadístico Statgraphics plus 5.0. En caso de observarse diferencias significativas entre recuentos se utilizó la prueba de Tukey, observando así la magnitud de la diferencia con el mismo programa estadístico.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de la bacteriocina (3.5) sobre *L. monocytogenes* se analizaron las siguientes interacciones de los resultados obtenidos:

- entre tratamientos
- entre días
- entre días para el mismo tratamiento

### **3.6 Estudio del efecto de las proteasas del salmón sobre la actividad de la bacteriocina de *C. piscicola* L103 a $5 \pm 2^\circ\text{C}$**

En esta etapa del estudio se evaluó el efecto de las proteasas naturales del salmón sobre la actividad de la bacteriocina. Como control de sensibilidad de la bacteriocina frente a una proteasa, se incluyó un tratamiento en el cual se inoculó una proteasa (1 mg/mL) tipo I de páncreas bovino junto con la bacteriocina.

Antes de realizar el ensayo se verificó la existencia de proteasas naturales en el jugo de salmón, para lo cual se realizó un ensayo de actividad proteásica (3.6.1) (JAGNOW, G. y DAWID, W., 1991).

**3.6.1 Ensayo de la actividad proteásica.** Esta prueba se llevó a cabo con el jugo de salmón filtrado, el que fue preparado mezclando 100 g de salmón ahumado con 100 mL de buffer fosfato 0,05 M pH 7,0 dentro de una doble bolsa Stomacher y sometido a una agitación en un equipo Stomacher a alta velocidad por 2 minutos. Luego esta mezcla fue centrifugada a 7.700 g por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$  y finalmente el sobrenadante fue filtrado a

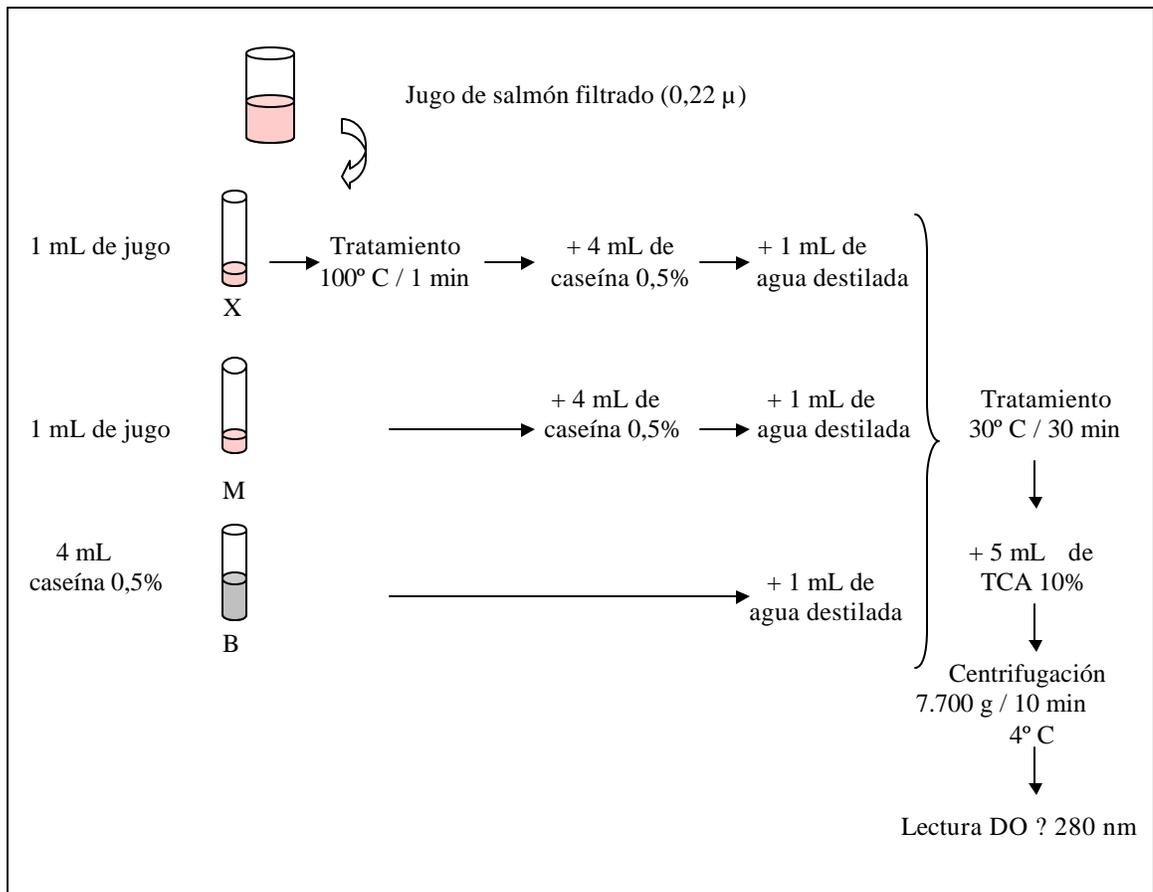
través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . De este jugo se obtuvieron dos muestras de 1 mL; las que fueron depositadas en dos tubos tapa rosca (tubos X y M). Además se preparó un blanco con 4 mL de caseína al 0,5% (Casein soluble. BDH Biochemical Ltda., Inglaterra) (tubo B). El tubo X fue sometido a una temperatura de 100°C por 1 min. en un baño de agua, produciéndose de esta forma inactivación enzimática en el caso que existieran enzimas en el jugo. Luego se agregó 1 mL de agua destilada a cada tubo y 4 mL de caseína al 0,5% a los tubos X y M. Se incubaron todos los tubos en un baño de agua a 30°C durante 30 min. Luego de transcurrido el tiempo se agregó 5 mL de TCA al 10% (Tricloro Acetic Acid, Merck) a todos los tubos para precipitar los excedentes de proteína no hidrolizada.

El precipitado se separó por centrifugación (7.700 g por 10 min a 4°C) y se midió la densidad óptica del sobrenadante a 280 nm en cubeta de cuarzo en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro Genesys 5. Spectronic Instruments). En la FIGURA 7 se presenta un esquema del ensayo de la actividad proteásica.

Una unidad de actividad proteásica se definió como aquella cantidad de enzima que provocaba un aumento de  $\text{DO}_{280}$  de 0,001 bajo estas condiciones.

**3.6.2 Sustrato a inocular.** El sustrato que se utilizó para este estudio fue salmón ahumado. A 100 g se le adicionó 100 mL de buffer fosfato 0,05 M pH 7,0 y se colocó en una doble bolsa de Stomacher para su homogeneización a alta velocidad por 2 min obteniendo de esta forma un jugo al cual se le añadió la bacteriocina. Posteriormente el jugo extraído fue centrifugado a 7.700 g (10.000 rpm) por 15 min a 4°C.

Para eliminar posibles bacterias contaminantes el sobrenadante fue filtrado mediante un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ ; donde a 2 mL de este líquido se le agregó 2 mL de la bacteriocina con actividad inicial de 1.600 UA/mL.



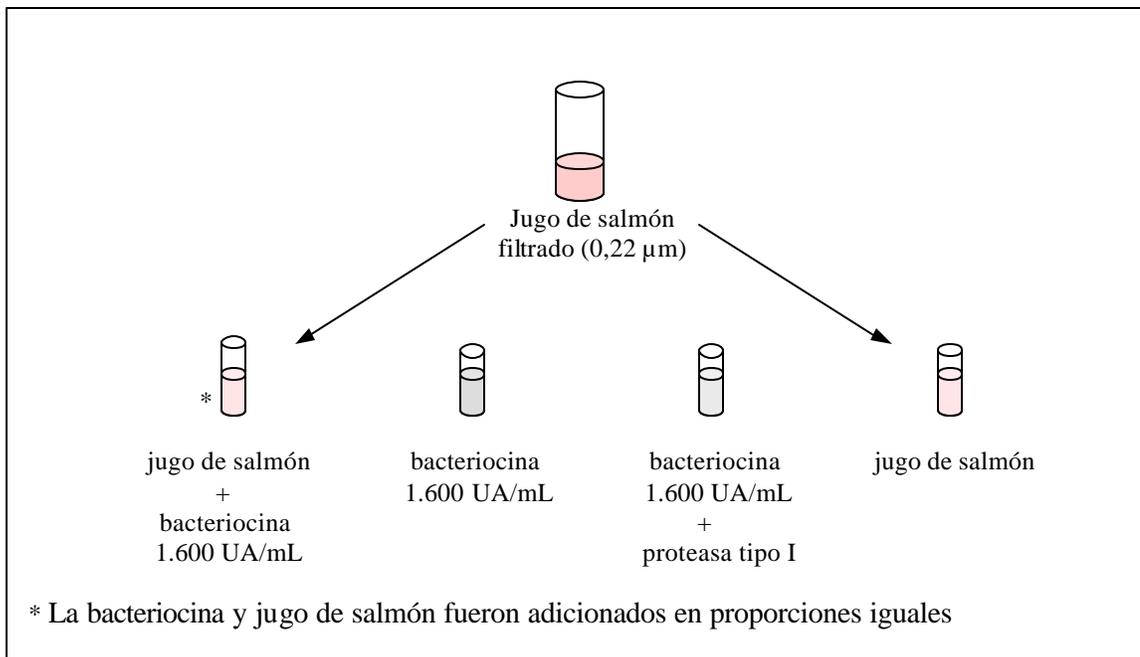
**FIGURA 7 Esquema general del ensayo de actividad proteásica.**

FUENTE: JAGNOW, G. y DAWID, W., 1991.

**3.6.3 Tratamientos.** Los tratamientos utilizados se esquematizan en la FIGURA 8, y fueron los siguientes:

- A: Bacteriocina 1.600 UA/mL (actividad inicial) + jugo del salmón en buffer fosfato 0,05 M pH 7,0.
- B: Bacteriocina 1.600 UA/mL (actividad inicial).
- C: Bacteriocina 1.600 UA/mL (actividad inicial) + Proteasa tipo I de páncreas bovino 1 mg/mL (concentración final) + 2 mL buffer fosfato 0,05 M pH 7,0.

- D: Jugo de salmón en buffer fosfato 0,05 M pH 7,0.



**FIGURA 8** Esquema de los tratamientos utilizados en el estudio de las proteasas del salmón.

**3.6.4 Análisis de actividad.** Se verificó la actividad de la bacteriocina en el extracto durante 48 h manteniendo los tubos con diferentes tratamientos (3.6.3) a temperatura de refrigeración  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ . Los muestreos se realizaron en seis tiempos diferentes durante las 48 h. La actividad de la bacteriocina remanente se determinó según la técnica descrita en 3.3.

Para la prueba se utilizó un sacabocados de 6 mm de diámetro con el cual se realizó un pocillo en el agar ST en el cual se depositó una gota de 50 µL del sobrenadante tratado y sobre éste se depositó el agar semisólido con la cepa indicadora *L. monocytogenes* Lm82.

Se realizaron tres mediciones del diámetro total de los halos de inhibición por pocillo, utilizando un pie de metro y se observó la diferencia de actividad a través del tiempo. Para cada variable se inocularon tres pocillos.

**3.6.5 Análisis estadístico.** Para examinar el efecto de las proteasas naturales del salmón sobre la actividad de la bacteriocina, se realizó un análisis descriptivo entre tratamientos.

Además se utilizó un análisis de varianza multifactorial, para relacionar los resultados obtenidos entre el tiempo de almacenamiento, para el mismo tratamiento, para lo cual se utilizó un programa estadístico Statgraphics plus 5.0. En caso de observarse diferencias significativas entre los resultados se utilizó la prueba de Tukey, para observar la magnitud de la diferencia con el mismo programa estadístico.

## 4. PRESENTACION DE RESULTADOS

### 4.1 Producción de la bacteriocina de *C. piscicola* L103

En esta sección se presentan los resultados obtenidos durante el cultivo de la bacteria ácido láctica. En primer lugar se presentan las curvas de crecimiento para cada una de las etapas del proceso (batch y continuo) y la producción de bacteriocina expresada en términos de actividad.

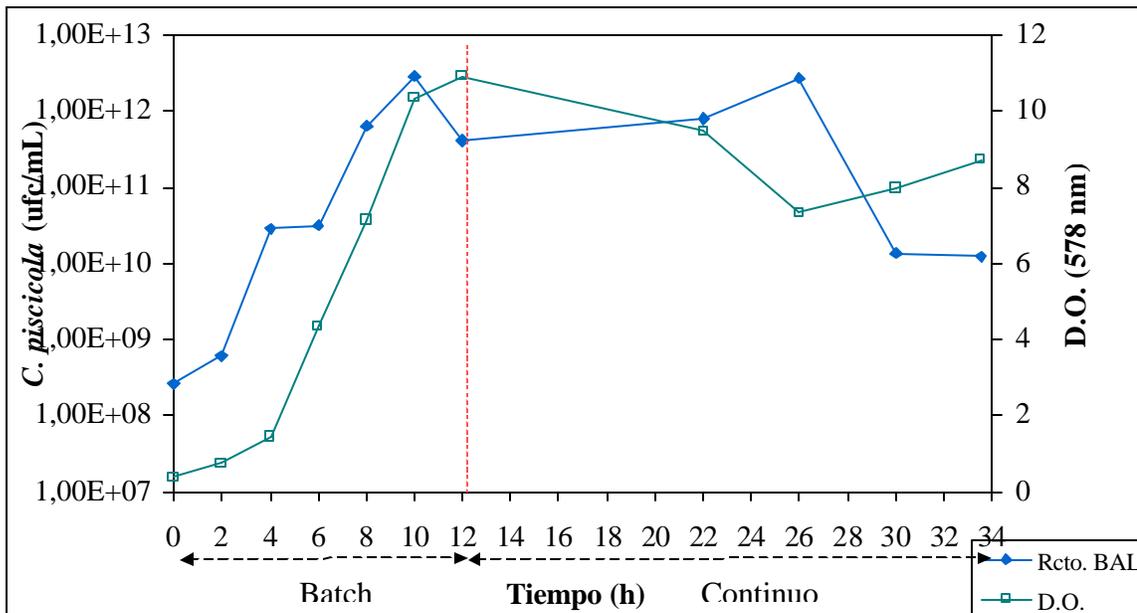
• **Cultivo batch y continuo.** En la FIGURA 9 se observa la curva de crecimiento de la cepa de *C. piscicola* L103 obtenida a partir de los datos del proceso (ANEXO 3). El cultivo batch con un recuento inicial de  $2,6 \times 10^8$  ufc/mL con un inóculo de la cepa láctica, a pH 6,5 y una temperatura de 25°C, se extendió por 12 h, dando comienzo al cultivo continuo, el que se detuvo después de 21,5 h.

Cabe señalar que el flujo promedio obtenido en las primeras 10 horas de cultivo continuo fue de 2 L/h, el que aumentó a un promedio de 2,6 L/h durante las últimas 11,5 horas de cultivo, esto debido al mal estado de la bomba que medía el flujo de entrada.

Además se calculó el nuevo tiempo de duplicación ( $t_d$ ) que presentó la cepa láctica en este cultivo (ANEXO 4), con el fin de comprobar que manteniendo las condiciones del mismo experimento a nivel laboratorio, se mantenía la actividad de la bacteriocina presentada en ese proceso.

Como se observa en la FIGURA 9, los recuentos de *C. piscicola* L103 presentaron una breve fase de latencia entre el tiempo 0 y 4 horas, luego el crecimiento ocurrió en forma exponencial, hasta alcanzar un máximo de  $2,8 \times 10^{12}$  ufc/mL a las 10 horas de cultivo. Al comenzar el cultivo continuo (12 horas) el recuento microbiano presentó un leve

descenso a  $4,0 \times 10^{11}$  ufc/mL y se mantuvo entre  $10^{10}$  y  $10^{11}$  ufc/mL, hasta finalizar la etapa de cultivo continuo. Los valores de recuento de la BAL se presentan en el ANEXO 3.2.



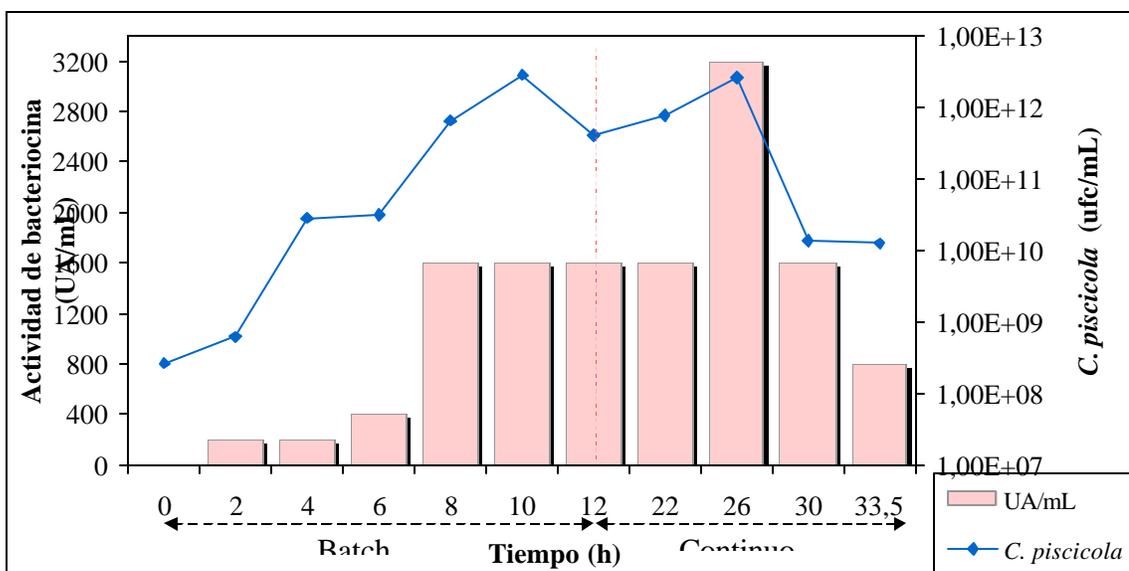
**FIGURA 9 Recuento microbiano y densidad óptica (DO<sub>578 nm</sub>) del cultivo de *C. piscicola* L103 en caldo D-MRS, en un sistema batch y continuo.**

En cuanto a la densidad óptica (DO<sub>578 nm</sub>), durante el cultivo batch se observó que ésta aumentó progresivamente hasta llegar a un máximo de 10,93 a las 12 horas, presentando durante el cultivo continuo un valor mínimo de 7,33 a las 26 horas (ANEXO 3.1).

En las FIGURAS 10 y 11 se grafica la actividad de la bacteriocina a través de los cultivos batch y continuo. Durante la etapa batch se presentaron valores mínimos de actividad equivalentes a 200 UA/mL a las 2 horas después de iniciado el proceso, la cual aumentó a través de la etapa exponencial del cultivo, alcanzando valores máximos de 1.600 UA/mL hasta el término del cultivo batch, después de 12 horas.

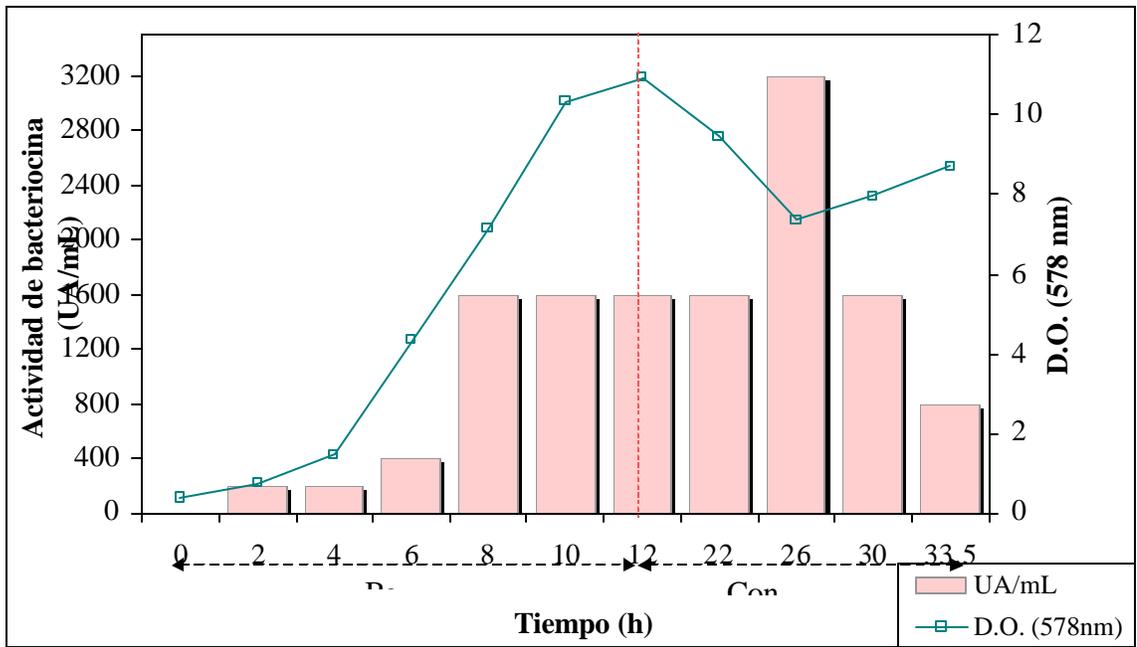
Durante el cultivo continuo la actividad se mantuvo en 1.600 UA/mL hasta las 22 horas, observándose un aumento a las 26 horas que alcanzó 3.200 UA/mL, este valor descendió luego hasta llegar a 800 UA/mL al término del cultivo. Los valores de actividad de la bacteriocina obtenidos durante el cultivo se presentan en el ANEXO 3.3.

En la FIGURA 10 se observa que la actividad mínima presentada en el cultivo (200 UA/mL) se registró con los recuentos más bajos, de  $10^8$  ufc/mL a las 2 horas, la que aumentó a 400 UA/mL a las 6 horas con un recuento microbiano de  $10^{10}$  ufc/mL, registrando un máximo a las 26 horas, durante el cultivo continuo de 3.200 UA/mL cuando el recuento también alcanzó un máximo de  $2,65 \times 10^{12}$  ufc/mL.

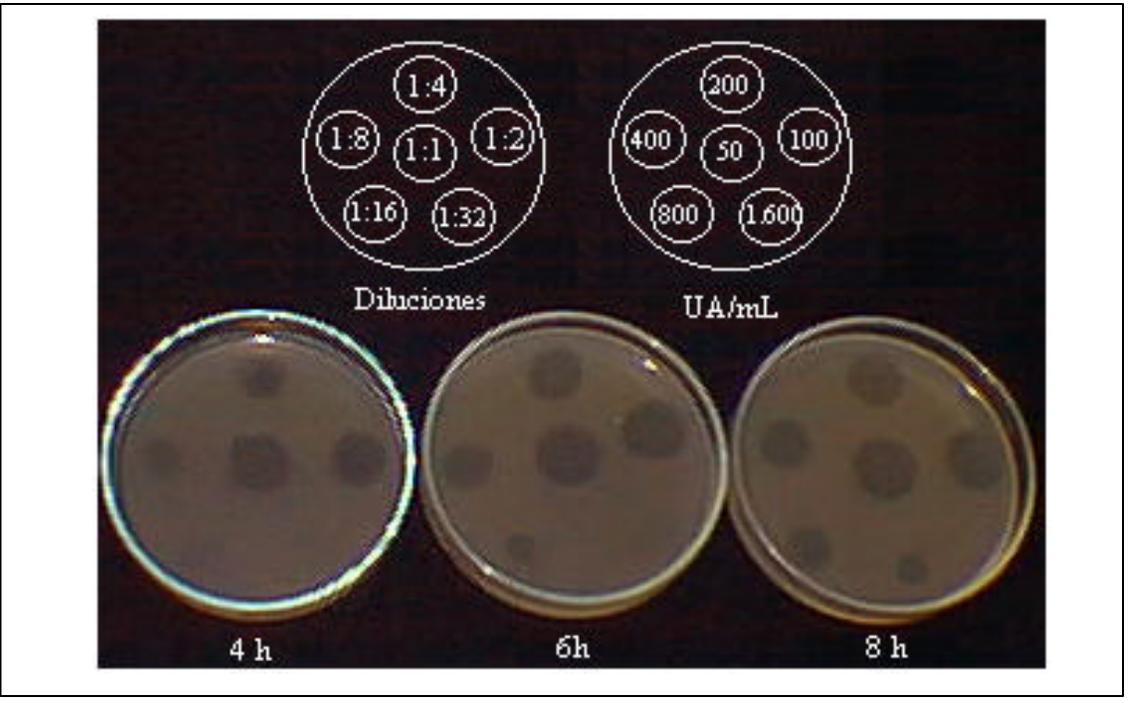


**FIGURA 10** Actividad de la bacteriocina (UA/mL) y recuentos (ufc/mL) durante el cultivo batch y continuo de *C. piscicola* L103.

En la FIGURA 11 se observa que la densidad óptica aumentó a través del tiempo durante el cultivo batch, llegando a un máximo a las 8 horas con una actividad de 1.600 UA/mL, la que presentó un mínimo (7,33) a las 26 horas de cultivo continuo justo cuando la actividad registró el máximo.



**FIGURA 11** Actividad de la bacteriocina (UA/mL) y curva de la densidad óptica (D.O. 578nm) durante el cultivo batch y continuo de *C. piscicola* L103.



**FIGURA 12** Halos de inhibición durante la producción de la bacteriocina, correspondientes a 4, 6 y 8 horas de cultivo.

Un ejemplo de la actividad presentada por la bacteriocina durante el cultivo, medida por la formación de halos de inhibición producidos sobre el césped de la cepa indicadora (*L. monocytogenes* Lm82) y expresada en términos de UA/mL, se muestra en la FIGURA 12. Se puede observar que los halos presentan una inhibición clara, nítida y transparente, sin desarrollo microbiano en su interior hasta la dilución 1:4; 1:8 y 1:32 para las 4, 6 y 8 horas de cultivo respectivamente.

#### **4.2 Purificación parcial de la bacteriocina**

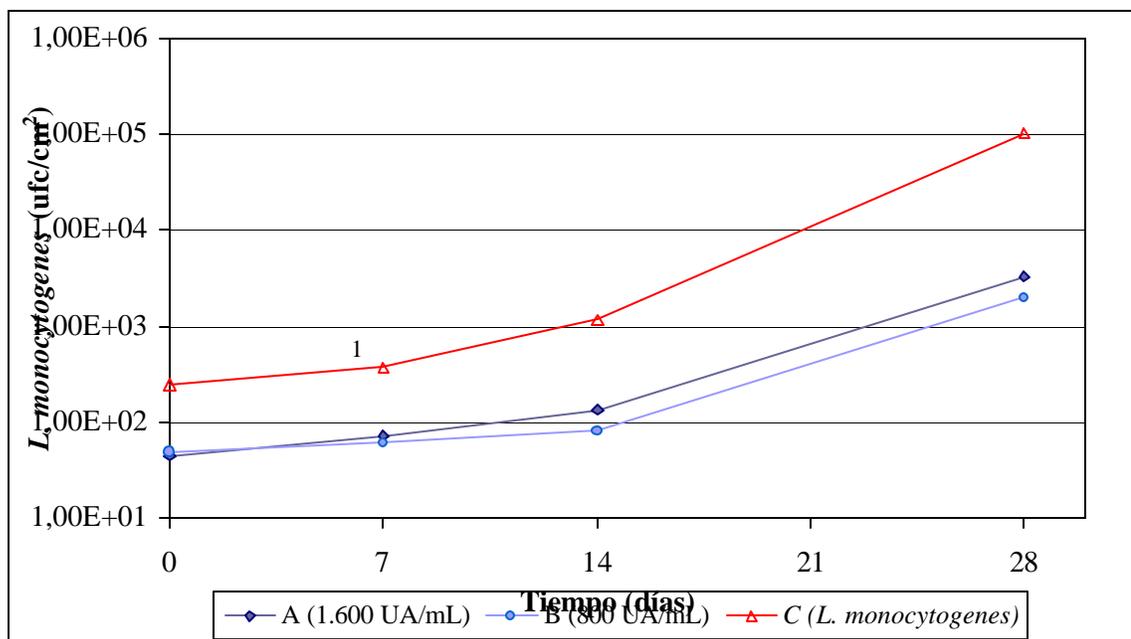
Durante la purificación parcial de la bacteriocina se registró el nivel de actividad del permeado a través de las membranas de 30, 10 y 3 KD, obteniéndose actividad solo del permeado de las dos primeras membranas utilizadas (DELGADO, 2001). Además se analizó la porción de retenido luego del proceso de diafiltración en la membrana de 3 KD, observando en este punto niveles de actividad de 800, 1.600 y 3.200 UA/mL. La bacteriocina con actividades de 800 y 1.600 UA/mL fue la utilizada en las experiencias de inoculación sobre filetes de salmón ahumado (4.3) y de 1.600 UA/mL para el estudio con las proteasas (4.4).

#### **4.3 Inoculación de la bacteriocina parcialmente purificada sobre filetes de salmón ahumado**

Los resultados obtenidos de la inoculación de la bacteriocina y *L. monocytogenes* sobre filetes de salmón ahumado y envasados al vacío mostraron una tendencia de los recuentos para esta bacteria en aumento en ambas repeticiones del experimento. A través de un análisis de varianza (ANEXO 5.3) se determinó que no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las repeticiones, por lo cual los datos fueron analizados en forma conjunta.

En la FIGURA 13 se presentan los recuentos promedios de *L. monocytogenes* obtenidos a través del tiempo de almacenamiento del salmón a 5°C, y se observa claramente una diferencia entre el control del cultivo de *L. monocytogenes* sin bacteriocina y los

tratamientos con los dos niveles de bacteriocina. Los resultados obtenidos del recuento de *L. monocytogenes* para ambas repeticiones se encuentran en el ANEXO 5.



**FIGURA 13** Recuentos de *L. monocytogenes* inoculada sobre filetes de salmón ahumado, con dos niveles de actividad de bacteriocina, almacenados a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ .<sup>1)</sup>

Se puede apreciar que los recuentos iniciales obtenidos para los tratamientos con bacteriocina fue del orden de  $10^1$  ufc/cm<sup>2</sup>, mientras que los filetes tratados solo con *L. monocytogenes* presentaron un recuento inicial del orden de  $10^2$  ufc/cm<sup>2</sup>. Ambos tratamientos presentaron un aumento en los recuentos a través del tiempo de almacenamiento, sin embargo se observa que en los filetes con bacteriocina (1.600 UA/mL y 800 UA/mL) el aumento fue menor que en el salmón solo con *L. monocytogenes*. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre el primer día de análisis y el día 28 para todos los tratamientos (ANEXO 5.3.2).

<sup>1</sup> Valores correspondientes al promedio de triplicados de dos repeticiones

También hubieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), entre los tratamientos, lo cual según la prueba de Tukey arrojó que éstas se encontraban entre los filetes tratados con bacteriocina y los filetes inoculados sólo con *L. monocytogenes* (tratamiento C). Por su parte los tratamientos con bacteriocina en dos niveles, 1.600 y 800 UA/mL, no presentaron diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre sí (ANEXO 5.3.3).

Los niveles de recuentos encontrados en el último día de almacenamiento para los filetes tratados solo con *L.monocytogenes* fueron del orden de  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>, mientras que los filetes tratados con los dos niveles de bacteriocina presentaron recuentos del orden de  $10^3$  ufc/cm<sup>2</sup>. Los filetes tratados con buffer (control) no presentaron recuentos de *L. monocytogenes* en todo el período de almacenamiento.

Para tener una visión más clara de lo sucedido con cada tratamiento a través del tiempo de almacenamiento estos datos se analizaron por separado (ANEXO 5.4).

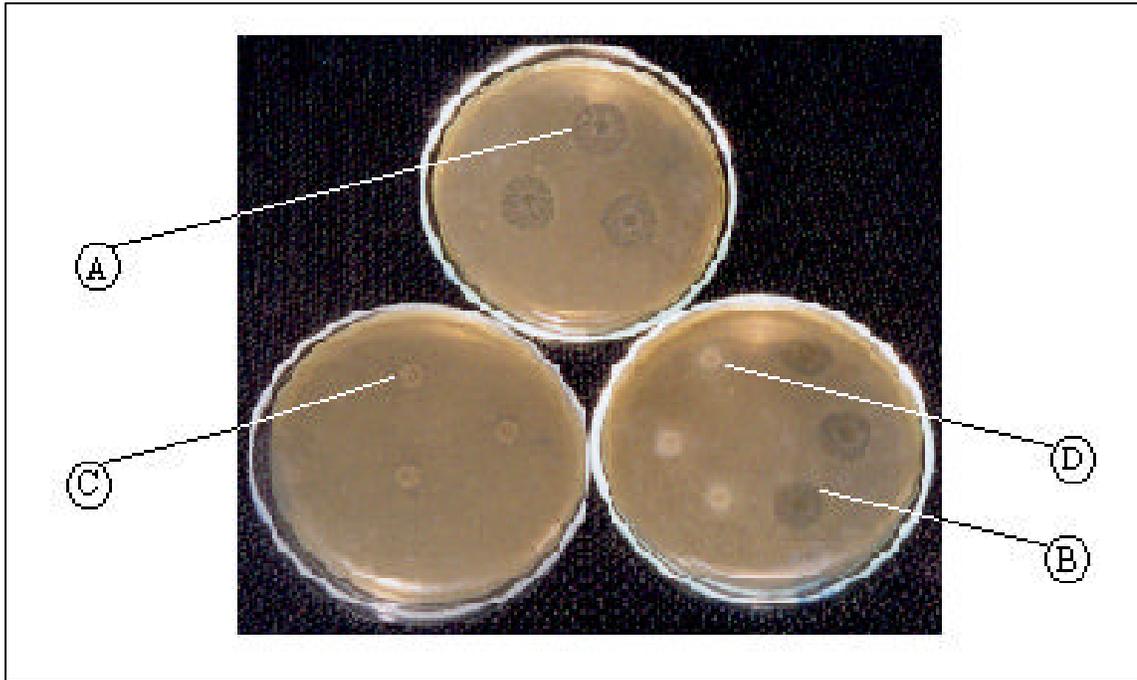
Los filetes tratados sólo con bacteriocina presentaron una diferencia significativa entre los recuentos del primero y el último día de almacenamiento (ANEXOS 5.4.1 y 5.4.2), mientras que los recuentos de *L. monocytogenes* en el control (tratamiento C), arrojaron diferencia entre días de almacenamiento, la cual fue significativa para todos los días de almacenamiento (ANEXO 5.4.3).

#### **4.4 Estudio del efecto de las proteasas nativas del salmón sobre la bacteriocina**

La técnica del pocillo utilizada para este estudio permitió observar la actividad de la bacteriocina a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$  a través del tiempo, en presencia de jugo de salmón, el cual contenía proteasas naturales, según se demostró experimentalmente (ANEXO 6.1).

La bacteriocina al ser expuesta a las proteasas del jugo de salmón mantuvo su actividad e inhibió la cepa indicadora *L. monocytogenes* Lm82, ello se observó por la formación de halos claros, nítidos, transparentes y sin desarrollo microbiano en su interior mediante la técnica del pocillo como se observa en la FIGURA 14. En ella se observa que el jugo

de salmón puro no provocó inhibición de *L. monocytogenes* (tratamiento D) al igual que la bacteriocina tratada con proteasa bovina tipo I (tratamiento C), presentando el pocillo un halo poco nítido y con desarrollo microbiano en su interior.

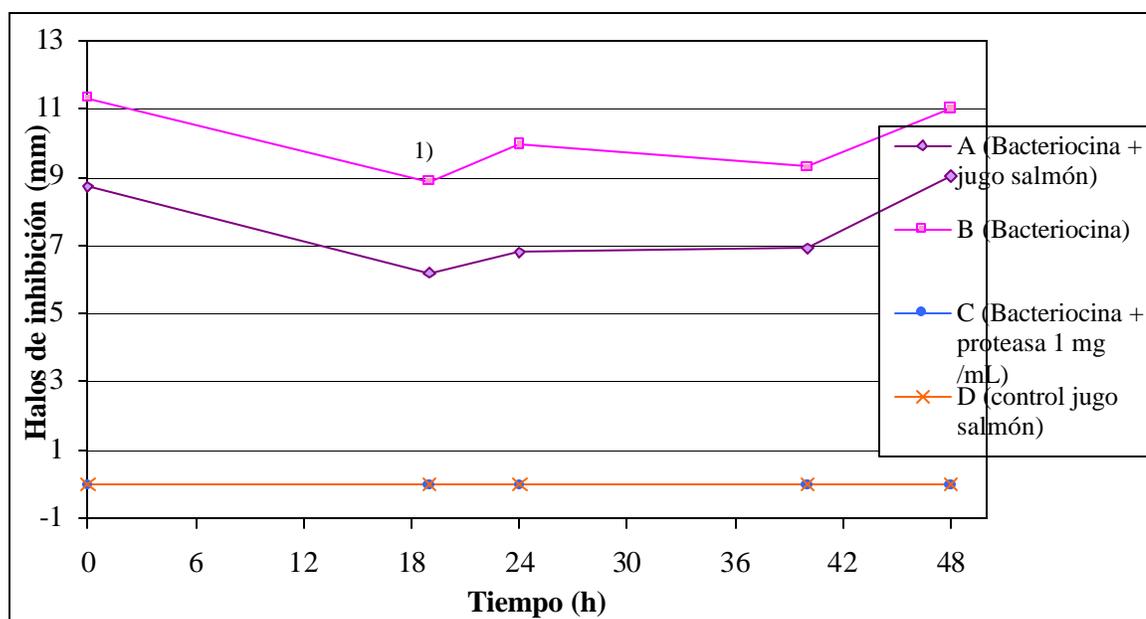


**FIGURA 14 Efecto de las proteasas nativas del salmón sobre la actividad de la bacteriocina, después de 48 horas a  $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .**

Tratamientos: A: bacteriocina 1.600 UA/mL + jugo de salmón; B: bacteriocina 1.600 UA/mL; C: bacteriocina 1.600 + proteasa tipo I bovina UA/mL; D: jugo de salmón puro.

Se determinó la actividad de la bacteriocina a distintos tiempos de almacenamiento, visualizándose de esta forma el comportamiento de la bacteriocina en presencia del jugo de salmón durante 48 horas de almacenamiento como lo indica la FIGURA 15. De esta figura se desprende que el control, bacteriocina pura, fue la que presentó mayor actividad, es decir halos de mayor tamaño del orden de los 10 mm, junto al tratamiento de jugo de salmón con bacteriocina cuyos diámetros fueron del orden de 7,5 mm (ANEXO 6.2).

Como se puede observar el jugo de salmón tratado con bacteriocina presentó un halo inicial en el tiempo cero de 8,7 mm (ANEXO 6.2). La inhibición presentó variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) a través del tiempo (ANEXO 6.3.1), obteniendo un halo final de 9 mm a las 48 h de almacenamiento.



**FIGURA 15 Efecto de las proteasas nativas del salmón sobre la bacteriocina (1.600 UA/mL) de *C. piscicola* L103.<sup>1</sup>**

Con respecto a la bacteriocina tratada con la proteasa bovina tipo I en concentración de 1 mg/mL, presentó una inactivación en forma inmediata, es decir desde el tiempo cero, manteniéndose inactiva a través del tiempo.

El jugo de salmón puro, tratamiento D, no inhibió la cepa indicadora (*L. monocytogenes* Lm82), mientras que el control de la bacteriocina pura presentó valores de halos de inhibición de 11,3 mm para el tiempo cero, el que a través del tiempo presentó diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre el primer y último tiempo de muestreo con

<sup>1</sup> Halo de inhibición sin considerar el pocillo de 6 mm. Valores correspondientes al promedio de triplicados con tres mediciones de halo.

respecto a los tres valores intermedios, es decir, entre el primer y último tiempo de almacenamiento no se registraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) como lo indica el ANEXO 6.3.2, con un halo de inhibición de 11 mm.

## 5. DISCUSION

El uso de bacteriocinas o cepas de BAL productoras de bacteriocinas, para el control de microorganismos patógenos o alterantes en alimentos, ha sido tema de diversos estudios durante los últimos años (EL-KHATEIB *et al.*, 1993, McMULLEN y STILES, 1996, DUFFES *et al.*, 1999a y MAURIELLO *et al.*, 1999). Resulta por lo tanto indispensable establecer los parámetros de un sistema de cultivo de BAL para la producción de bacteriocinas, proyectado hacia la aplicación en alimentos. Su uso a nivel industrial en alimentos en forma pura o semipurificada debe considerar su efectividad en contra de patógenos y la posible inactivación que estas sustancias puedan tener por enzimas presentes en forma natural en el alimento (AYMERICH *et al.*, 1993). Es así como en este estudio se consideró la producción de bacteriocina a nivel pre-piloto y su aplicación, estudiando la acción de las enzimas naturales del salmón sobre la bacteriocina de *C. piscicola* L103.

Para determinar las condiciones óptimas de cultivo para la producción de una bacteriocina, es necesario conocer las características fisiológicas y bioquímicas de la bacteria productora, para mantener el ambiente en condiciones ideales de temperatura, pH, disponibilidad de agua, oxígeno y nutrientes (BROCK, 1999). Estos procesos al ser transferidos desde el laboratorio a un nivel a mayor escala, deben contemplar el proceso batch del cultivo de la BAL, ya que allí se pueden ensayar variaciones del medio obteniendo curvas de crecimiento de las cepas lácticas y producción de su bacteriocina. En este estudio las condiciones operacionales se basaron en experiencias realizadas anteriormente a nivel de laboratorio (BÓRQUEZ, 2000), con las cuales se realizó un escalamiento a nivel pre-piloto.

Como medio de cultivo para la cepa productora de bacteriocina *C. piscicola* L103 se utilizó, caldo D-MRS, a una temperatura de 25°C y un pH ajustado en forma constante a 6,5 con NaOH 5N. Las condiciones señaladas corresponden a las utilizadas anteriormente para esta cepa en el cultivo batch (BÓRQUEZ, 2000), obteniéndose mayores niveles de actividad a las 12 horas de cultivo. De igual forma SCHILLINGER *et al.* (1993), utilizaron para la producción de *C. piscicola* LV61 caldo D-MRS a 25°C, aplicando niveles de pH entre 5,0 y 10,0. Los autores comprobaron que cuando el pH se mantenía en 6,5 hubo un aumento del nivel de actividad de la bacteriocina, de 400 UA/mL a 3.200 UA/mL. Además los autores señalados estudiaron el efecto de la temperatura en la producción de la bacteriocina de la BAL, presentándose un aumento de actividad (3.200 UA/mL) cuando el cultivo se realizó a 25°C durante 24 horas.

Por su parte, JACK *et al.* (1996), HSIEH y GLATZ (1996) y MAURIELLO *et al.* (1999), utilizaron caldo MRS para la propagación de la cepa láctica para la producción de bacteriocina. Este caldo corresponde también a la base del caldo utilizado en el presente estudio. AHN y STILES (1990), trabajaron en la producción de la bacteriocina de *C. piscicola* LV17 cultivada en caldo APT a distintos pH entre 5,0 y 6,5, y a una temperatura de 25°C, demostrando que el mayor desarrollo de BAL y los más altos niveles de actividad de la bacteriocina se encontraban en el cultivo de pH 6,5, viéndose disminuida en un 50% cuando el pH se ajustó a 6,0. Por lo que la utilización de pH a 6,5 para efectuar un cultivo en la modalidad batch para producir bacteriocina es ampliamente utilizado (NETTLES y BAREFOOT, 1993, SCHILLINGER *et al.*, 1993, PILET *et al.*, 1995, BHUGALOO-VIAL *et al.*, 1997 y DUFFES *et al.*, 1999a).

Por otra parte se ha comprobado que el cultivo de la BAL para la producción de bacteriocina es mayor cuando se realiza en forma continua, en comparación con un cultivo tipo batch (BHUGALOO-VIAL *et al.*, 1997, BROCK, 1999, BORQUEZ, 2000). Por este motivo la producción de *C. piscicola* L103 en este estudio se realizó mediante un sistema continuo, con un período batch inicial de 12 h, hasta alcanzar niveles máximos de actividad, como los presentados por BÓRQUEZ (2000). También se pudo

observar que los niveles de actividad obtenidos durante la etapa batch fueron más bajos que los obtenidos durante el cultivo continuo, coincidiendo con los resultados de BÓRQUEZ (2000) anteriormente expuestos.

Para realizar el cultivo en forma continua por consiguiente, se debieron considerar condiciones operativas adicionales a las de un cultivo batch, como son el flujo de entrada del medio nutritivo al fermentador, para lo cual se obtuvo un promedio de 2,6 L/h, con una tasa de dilución de  $0,26 \text{ h}^{-1}$ , valor inferior al informado por BÓRQUEZ (2000) de 2,8 L/h, el cual corresponde a una tasa de dilución de  $0,28 \text{ h}^{-1}$ , igual al 80% de la tasa de dilución crítica obtenida en ese experimento ( $D_{\text{crit}} = 0,3466 \text{ h}^{-1}$ ). También se observó que a más bajas tasas de dilución se obtuvo menor producción de bacteriocina, es decir durante las primeras 10 h de cultivo continuo, que como se explicó anteriormente la tasa de dilución fue de  $0,2 \text{ h}^{-1}$ , coincidiendo con lo expuesto por PILET *et al.* (1995) y BHUGALOO – VIAL *et al.* (1997), quienes observaron que a mayores tasas de dilución era mayor la producción de bacteriocina. No obstante, si se considera la curva de crecimiento obtenida en el batch del presente trabajo, se puede observar que la tasa de duplicación fue de 1,67 h, lo cual es menor a la obtenida por BÓRQUEZ (2000) de 2h, cambiando de esta forma las condiciones del cultivo continuo, es decir aumentando los valores para la tasa de dilución y el flujo de alimentación, lo que pudo haber influido directamente sobre la obtención de los niveles de actividad más bajos, en comparación con los obtenidos por otros autores (PILET *et al.*, 1995). Ello refleja los problemas que se pueden enfrentar al realizar un escalado en la producción de microorganismos desde un nivel de laboratorio a un nivel pre-piloto.

El escalado o cambio de escala propuesto en este estudio como la adaptación de un proceso industrial desde las condiciones de un pequeño equipo de laboratorio a las de una fermentación a gran escala, es uno de los aspectos más importantes y complicados de la microbiología industrial, ya que raramente el comportamiento de un proceso microbiano es el mismo en un pequeño equipo de laboratorio que en un fermentador de

mayor escala (BROCK, 1999), como lo ocurrido en este estudio comparativamente con la producción a una escala menor bajo las mismas condiciones de cultivo batch.

Con respecto a la fase de desarrollo de la cepa productora en la cual se detectó producción de bacteriocina, ésta se observó desde principios de la fase exponencial de crecimiento del microorganismo, comenzando con valores de actividad de 200 UA/mL hasta llegar a 1.600 UA/mL al término de dicha fase, lo cual coincide con los resultados obtenidos por BÓRQUEZ (2000), en la producción de esta bacteriocina a escala de laboratorio. La actividad de la bacteriocina aumentó en la medida en que se fue multiplicando la cepa productora. Ello estaría indicando que la bacteriocina correspondería a un metabolito primario, es decir, su síntesis ocurre durante la fase primaria del crecimiento del microorganismo, y no cerca de la fase final o fase estacionaria, lo que correspondería según BROCK (1999) a un metabolito secundario.

Resultados similares han reportado TANIGUCHI *et al.* (1994) en la producción de nisina por *Lactococcus lactis* sbsp. *lactis*, donde se observó que la concentración de nisina fue en aumento junto con el crecimiento de la BAL, manteniéndose estable su producción durante el cultivo continuo. Ello también es similar a lo obtenido por BHUGALOO – VIAL *et al.* (1997), quienes concluyeron que la cantidad de péptidos era directamente proporcional a la biomasa producida.

AHN y STILES (1990), observaron que la producción de bacteriocina por *C. piscicola* LV17 fue detectada a principios de la fase logarítmica de crecimiento, con una tendencia similar a la curva de crecimiento de la cepa productora. De igual forma, en la producción de piscicolina V1 y divercina V41 se detectó actividad de la bacteriocina en el comienzo de la fase exponencial de crecimiento, alcanzando un máximo al principio de la fase estacionaria, permaneciendo estables en este período (PILET *et al.*, 1995). Por su parte MATHIEU *et al.* (1994) durante la producción de *C. piscicola* CP5 en caldo ST con extracto de levadura, detectaron actividades de la bacteriocina a principios de la fase

logarítmica, alcanzando un máximo nivel de actividad al principio de la fase estacionaria, similar a lo ocurrido en este estudio.

MURIANA (1996), señala que las bacteriocinas han sido utilizadas en numerosos experimentos, en forma pura o semipurificada, directamente sobre el alimento para el control de *L. monocytogenes*. POST (1996) afirma que estas sustancias antibacterianas adicionadas en alimentos, ofrecen una prometedora compatibilidad entre las regulaciones que una sustancia de este tipo debe seguir y los requerimientos del consumidor. La bacteriocina aplicada en este estudio sobre filetes de salmón ahumado con *L. monocytogenes*, presentó un efecto bacteriostático, sin observarse diferencia entre los niveles de actividad de bacteriocina. Por otro lado en las pruebas de actividad realizadas sobre agar ST y agar D-MRS, la bacteriocina presentó un efecto bactericida, al no observarse desarrollo microbiano en el interior del halo de inhibición. Las diferencias encontradas en cuanto a la capacidad de inhibición en placa y sobre salmón coincide con lo observado por BÓRQUEZ (2000). Este efecto de la bacteriocina de *C. piscicola* L103, también fue descrito para la cepa de *C. piscicola* LK5, en co-cultivo con *L. monocytogenes* SCOTT A en caldo ST, donde se observó un efecto bacteriostático (BUCHANAN y KLAWITTER, 1992). Ello según STOFFELS *et al.* (1993), correspondería a que la cepa láctica no produce suficiente cantidad de bacteriocina para inhibir a *Listeria*. Por otra parte, la aplicación de la bacteriocina sobre un alimento, afirman estos autores, sería menos efectivo por el efecto que tienen algunos componentes del alimento como la grasa y enzimas proteolíticas sobre estas sustancias. Por su parte, EINARSSON y LAUZON (1995) observaron que bacteriocinas como bavaricina A y nisina Z prolongaron la vida útil de camarón en salmuera, destacando que los resultados fueron obtenidos aplicando las bacteriocinas en forma pura y semipura, concluyendo que pueden ser utilizadas de ambas formas en alimentos.

Se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los filetes de salmón control, es decir solo con *L. monocytogenes*, y los inoculados con bacteriocina. Ello también fue observado por MING *et al.* (1997), al aplicar pediocina en polvo al interior de envases

de jamón, pechuga de pavo y carne bovina, presentándose un efecto bacteriostático. Sin embargo, en el jamón los recuentos de *L. monocytogenes* ATCC19115 aumentaron después de seis semanas de almacenamiento a 4°C. Ello también es similar a lo observado por EL-KHATEIB *et al.* (1993), quienes estudiaron el efecto de pediocina PO2, producida por *Pediococcus acidilactis* PO2, aplicada sobre carne, presentándose diferencias significativas entre la carne tratada con bacteriocina y el tratamiento control, durante el almacenamiento a temperaturas de refrigeración, similar a lo ocurrido en este trabajo.

En este estudio se alcanzaron elevados recuentos de *L. monocytogenes* al término del almacenamiento a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ , sobre el salmón sin bacteriocina. Ello también fue descrito por GUYER y JEMMI (1991), quienes estudiaron el comportamiento de *L. monocytogenes* durante la fabricación y almacenamiento de salmón ahumado contaminado experimentalmente, concluyendo que debe prevenirse la contaminación con este patógeno en las etapas de pre-proceso y post-proceso, es decir en salmón crudo y ahumado, ya que observaron que hay un incremento significativo durante el almacenamiento a 4°C y a 10°C.

La efectividad de la bacteriocina aplicada sobre un alimento puede depender de la pérdida de actividad que ocurra por acción de ciertos componentes intrínsecos, como la grasa, la presencia de enzimas proteolíticas, el pH y de ciertos aditivos utilizados en el producto final (MEDINA *et al.*, 1992, ABEE *et al.*, 1995 y SAUCIER y GREER, 2001), además de la presencia de patógenos resistentes a los mecanismos de acción de la bacteriocina (PILET *et al.*, 1995). También va a influir sobre su efectividad el no aplicar una cantidad suficiente para lograr la completa inactivación del patógeno (MURIANA, 1996).

Por esta razón se ha estudiado el comportamiento de muchas bacteriocinas en presencia de enzimas, observando la inactivación parcial y pérdida total de actividad en algunos casos, por acción de enzimas proteolíticas como por ejemplo la pepsina y la papaina

(AHN y STILES, 1990, NETTLES y BAREFOOT, 1993, SCHILLINGER *et al.*, 1993 y JACK *et al.*, 1996). Sin embargo la inactivación de las bacteriocinas no se produce en presencia de todas las enzimas proteolíticas aplicadas, es así como la nisina es inactivada por quimiotripsina, siendo sin embargo resistente a la tripsina, bajo ciertas condiciones de acidez (NETTLES y BAREFOOT, 1993). Por ello, en este estudio se planteó la posibilidad que proteasas del salmón pudieran afectar la actividad de la bacteriocina, comprobándose previamente la presencia de proteasas nativas, por la técnica descrita por JAGNOW y DAWID (1991) y utilizando como control una proteasa tipo I bovina y la bacteriocina purificada. Se observó que las proteasas naturales presentes en el músculo del salmón, no afectaron la actividad de la bacteriocina de *C. piscicola* L103, lo cual coincide con lo reportado por PILET *et al.* (1995), quienes chequearon la acción de diferentes enzimas proteolíticas, sobre piscicolina V1 y divercina V41, observando que sólo eran inactivadas en presencia de pronasa E, proteinasa K y tripsina.

Sin embargo, en este estudio se observó que el jugo de salmón con bacteriocina presentó halos de inhibición de menor diámetro que la bacteriocina pura, lo que pudo deberse a que en el jugo de salmón la bacteriocina se diluyó a la mitad en comparación con el control. Por otra parte, la bacteriocina control, conservada a  $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$  mantuvo su actividad durante 48 h. Ello similar a lo observado por HSIEH y GLATZ (1996), donde a  $4^{\circ}\text{C}$  se mantuvo la actividad de la bacteriocina parcialmente purificada producida por *Propionibacterium thoenii* P127 almacenada durante 14 semanas. Lo que constituye un aspecto importante para la comercialización de la bacteriocina, en cuanto a su distribución y almacenamiento.

La aplicación de la bacteriocina de *C. piscicola* L103 en salmón ahumado puede proporcionar un óptimo camino para la inhibición de *L. monocytogenes in situ*, por la acción bacteriostática presentada en este estudio, y porque factores intrínsecos del alimento como las proteasas no afectarían la actividad de ésta sobre el salmón.

## 6. CONCLUSIONES

- \* Al efectuar un cultivo continuo de *Carnobacterium piscicola* L103 a escala pre-piloto manteniendo constante la temperatura en 25°C y un pH de 6,5 se logró producción de bacteriocina, alcanzando un máximo de 3.200 UA/mL a una tasa de dilución ( $D$ ) de 0,26 h<sup>-1</sup>.
- \* El comportamiento de *Carnobacterium piscicola* L103 en cultivo a nivel pre-piloto varió comparativamente con uno a menor escala, disminuyendo su tiempo de duplicación ( $t_D$ ).
- \* La bacteriocina parcialmente purificada de *Carnobacterium piscicola* L103 inhibió el desarrollo de *Listeria monocytogenes* sobre filetes de salmón ahumado envasados al vacío, almacenados a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ , presentando un efecto bacteriostático durante 14 días, con un posterior desarrollo a los 28 días.
- \* No hubo diferencia significativa entre las dos actividades de bacteriocina parcialmente purificada utilizadas, respecto de la acción bacteriostática sobre *Listeria monocytogenes* Lm 82 en salmón ahumado.
- \* Las proteasas nativas del músculo del salmón no inactivaron la bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* L103 a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 48 horas.

## 7. RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto antagónico de una sustancia tipo bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* L103 producida en un cultivo continuo a nivel pre-piloto. Las condiciones operativas establecidas para la producción de la bacteriocina fueron, caldo D-MRS a 25°C con un pH regulado a 6,5 durante todo el proceso. El cultivo batch se realizó durante 12 h para luego dar lugar al cultivo continuo, con un flujo promedio del medio de cultivo de 2,6 L/h, equivalente a una tasa de dilución ( $D$ ) de  $0,26 \text{ h}^{-1}$ , mantenido hasta 33,5 h de iniciado el proceso. La producción de bacteriocina fue detectada a principios de la fase de crecimiento exponencial de la bacteria, la que aumentó en forma paralela con el aumento de recuento de la bacteria ácido láctica BAL, obteniendo valores máximos de actividad de 3.200 UA/mL a las 26 h de cultivo. Para evaluar el efecto antagónico de la bacteriocina en contra de *Listeria monocytogenes*, se utilizó dos niveles de actividad, 800 y 1.600 UA/mL, inoculados por aspersion sobre filetes de salmón ahumado previamente inoculados con *L. monocytogenes* Lm82. Los recuentos microbianos mostraron un efecto bacteriostático durante 14 días de almacenamiento a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ , observándose posteriormente un aumento en los recuentos de listeria para el día 28. No se detectó diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) entre los dos niveles de actividad de la bacteriocina y tampoco a través del tiempo durante los primeros 14 días. Además se evaluó el efecto de proteasas naturales del salmón sobre la bacteriocina, donde se observó que las proteasas naturales no afectan la actividad de la bacteriocina almacenada a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Concluyéndose que la bacteriocina de *C. piscicola* L103 es un factor de seguridad en contra de *L. monocytogenes* Lm82 al ser inoculada sobre filetes de salmón ahumado, almacenados a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## SUMMARY

In the present study the parameters for bacteriocin production from *Carnobacterium piscicola* L103 at pre-pilot level were investigated and the antagonistic capacity of the bacteriocin against *Listeria monocytogenes* on smoked salmon, determined. The operative conditions established for the production of the bacteriocin were, D-MRS broth to 25°C with pH regulated to 6,5. Batch culture was carried out during 12 h followed by continuous culture, with an average flow of the culture broth of 2,6 L/h, equivalent to a rate of dilution ( $D$ ) of 0,26 h<sup>-1</sup>, maintained up 33,5 h, from the beginning of the process. The production of bacteriocin was detected at the beginning of the exponential growth phase of the bacteria, which increased in parallel with the increase of bacterial count, obtaining maximum values of activity of 3.200 AU/mL after 26 h of cultivation. In order to evaluate the antagonistic effect of the bacteriocin against *L. monocytogenes*, two levels of bacteriocin activity, 800 and 1.600 AU/mL, were inoculated by aspersion on smoked salmon fillets co-inoculated with *L. monocytogenes* Lm82. Microbial counts showed a bacteriostatic effect during 14 days of storage to 5 ± 2°C. An increase in listeria counts was observed after 28 days of storage. Significant difference were not detected ( $p>0,05$ ), between the two levels of activity of the bacteriocin and neither during the first 14 days of storage. The effect of natural proteases of the salmon on the bacteriocin was also evaluated, where it was observed that the natural proteases did not affect the activity of the bacteriocin stored 5 ± 2°C during 48 hours. It is concluded that the bacteriocin of *C. piscicola* L103 can be a security factor against *L. monocytogenes* Lm82 when inoculated on smoked salmon fillets, stored 5 ± 2°C during 14 days.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- ABBE, T., LOTHAR, K. and HILL, C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28 (2): 169 - 185.
- ACEVEDO, J. 1988. Cinética de fermentaciones. Tema N° 3. En: III Curso latinoamericano de biotecnología y VIII Curso internacional de Ingeniería bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso. pp. 3.1 – 3.31.
- ACEVEDO, J. y GENTINA, M. 1988. Sistemas de Cultivo. Tema N° 4. En: III Curso latinoamericano de biotecnología y VIII Curso internacional de Ingeniería bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso. pp. 4.1 – 4.44.
- AGUILAR, A. 1991. Biotechnology of lactic acid bacteria: an European perspective. *Food Biotechnology*, in the press: 1 – 8.
- AHN, C. and STILES, M. 1990. Plasmid-Associated bacteriocin Production by a Strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(8): 2503 – 2510.
- APHA, AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1992, Standard methods for the examination for dairy products. Editado por R. T. Marshall. 16ª Edición Washington D. C., American Public Health Association. pp. 546.

- AYMERICH, M., HUGAS, M. and MONFORT, J. 1998. Review: Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. *Food Science and Technology Int.* 4: 141 – 158.
- BAREFOT and KLAENHAMMER. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology.* 45 (6): 1808 – 1815.
- BELIARD, E. y THUAULT, D. 1995. Propiedades antimicrobianas de las bacterias ácido lácticas. En: *Microbiología alimentaria, volumen II: Fermentaciones alimentarias*. Bourgeois, C. y Larpent, J. Edit. Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 309 – 325.
- BHUGALOO-VIAL, P., GRAJEK, W., DOUSSET, X. and BOYAVAL, P. 1997. Continuous bacteriocin production with high cell density bioreactors. *Enzyme and Microbial Technol.* 21: 450 – 457.
- BORQUEZ, P. 2000. Producción Continua y Purificación parcial de la bacteriocina de *Carnobacterium piscicola L103*, utilizando un fermentador modular. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 82 p.
- BROCK, T. D. 1999. *Biología de los microorganismos*. Editorial Grafyllus. España. 986 pp.
- BROWN, A. 1990. Fed-batch and continuous culture. En: *Fermentation a practical approach*. Edited by McNeil, B. and Harvey, L. M. Glasgow. pp. 113 – 130.
- BROWN, A., CAMPBELL, I. y PRIEST, F. 1989. *Introducción a la biotecnología*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 167 pp.

- BUCHANAN, R. and BAGI, L. 1997. Microbial Competition: effect of culture conditions on the Suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*. J. Food Protec. 60 (3): 254 – 261.
- BUCHANAN, R. and KLAWITTER, L. 1992. Characterization of a lactic acid bacterium, *Carnobacterium piscicola* LK5, with activity against *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J. Food Safety 12: 199 – 217.
- BURGEOIS, C. y MAFART, P. 1995. La cerveza. En: Microbiología alimentaria, volumen II: Fermentaciones alimentarias. Bourgeois, C. y Larpent, J, Edit. Acibia S.A. Zaragoza, España. pp. 73 – 88.
- DELGADO, R. 2001. Efecto de una bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* parcialmente purificada sobre salmón fresco refrigerado. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 141 p.
- DUFFES, F., CORRE, C., LEROI, F., DOUSSET, X. and BOYAVAL, P. 1999a. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. J. Food Protec. 62 (12): 1394 – 1403.
- DUFFES, F., LEROI, F., BOYAVAL, P. and DOUSSET, X. 1999b. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. Strains in simulated cold smoked fish system stored at 4°C. Int. J. Food Microbiol. 47: 33 – 42.
- EINARSSON, H. and LAUZON, H. 1995. Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 61 (2): 669 – 676.

- EKLUND, M. W., POYSKY, F. T., PARANJPYE, R. N., LASHBROOK, L. C., PETERSON, M. E. and PELROY, A. 1995. Incidence and Sources of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Fishery Products and Processing Plants. *J. Food Protec.* 58 (5): 502 – 508.
- EL-KHATEIB, T., YOUSEF, A. and OCKERMAN, H. 1993. Inactivation and attachment of *Listeria monocytogenes* on beef muscle treated with lactic acid and selected bacteriocins. *J. Food Protec.* 56 (1): 29 – 33.
- ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K. and ISHIZAKI, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 85 – 106.
- FAO, Food and Agriculture of Organization of the United Nation. 1999. FAO expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products. Fisheries report N° 604. Roma.
- GUYER, S. and JEMMI, T. 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* during Fabrication and Storage of experimentally contaminated smoked salmon. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (5): 1523 – 1527.
- HANLIN, M., KALCHAYANAND, N., RAY, P. and RAY, B. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *J. Food Protec.* 56 (3): 252 – 255.
- HSIEH, H. and GLATZ, B. 1996. Long-Term Storage stability of the Bacteriocin Propionicin PLG-1 produced by *Propionibacterium thoenii* and potential as a food preservative. *J. Food Protec.* 59 (5): 481 – 486.

- HUSS, H. 1993. Assurance of seafood quality. Edited by Technological laboratory, Ministry of Fisheries. Dinamarca. 169 pp.
- HUSS, H., BEN, P. and JEPPESEN, V. 1995. Control of biological hazards in cold smoked salmon production. Food Control. 6 (6): 335 – 340.
- ICMSF, INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD. 1988. Microorganisms in foods 1. Their significance and methods of enumeration. Second Edition. University of Toronto Press.
- INTESAL, Instituto Tecnológico del Salmón. 2000. Resumen manual provisorio para el control de la *Listeria monocytogenes* en pescado ahumado. Instituto Tecnológico del Salmón, Puerto Montt, Chile.
- JACK, R., WAN, J., GORDON, J., HARMARK, K., DAVIDSON, B., HILLER, A., WETTENHALL, R., HICKEY, M. and COVENTRY, M. 1996. Characterization of the Chemical and Antimicrobial Properties of Piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. Appl. Environ. Microbiol. 62 (8): 2897 – 2903.
- JAGNOW, G. y DAWID, W. 1991. Experimentos modelos. En: Biotecnología introducción con experimentos modelos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 210 – 211.
- JAY, J. 1994. Microbiología moderna de los Alimentos. Editorial Acribia, S.A. España. 804 p.
- KUNZ, B. 1986. Cultivo de microorganismos para la producción de Alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 125 p.

- LARPENT, J. 1995. Los microorganismos de las fermentaciones. En: Microbiología alimentaria volumen II: Fermentaciones alimentarias. Bourgeois, C. y Larpent, J. Edit. Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 1 – 16.
- LOVETT, J. and TWEDT, R. 1988. Bacteria associated with Foodborne diseases, *Listeria*. Food Technol. April: 181 – 190.
- MAURIELLO, G., APONTE, M., ANDOLFI, R., MOSCHETTI, G. and VILLANI, F. 1999. Spray-Drying of Bacteriocin-Producing lactic acid Bacteria. J. Food Protec. 62 (7): 773 – 777.
- MATHIEU, E., MICHEL, M., LEBRIHI, A. and LEFEBVRE, G. 1994. Effect of the bacteriocin carnocin CP5 and of the producing strain *Carnobacterium piscicola* CP5 on the viability of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in salt solution, broth and skimmed milk, at various incubation temperatures. Int. J. Food Microbiol. 22: 155 – 172.
- McMULLEN, L. and STILES, M. 1996. Potencial for used of Bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. J. Food Protec. Suppl: 64 – 72.
- MEDINA, M. GAYA, P. y NUÑEZ, M. 1992. Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Revista Española de Lechería. Febrero 1992: 29-32.
- MING, X. and DAESCHEL, M. 1993. Nisins resistance of Foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. J. Food Protec. 56 (11): 944 – 948.
- MING, X., WEBER, G., AYRES, J. and SANDINE, W. 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. J. Food Science 62 (2): 413 – 415.

- MURIANA, P. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. In Food. J. Food Protec. Suppl: 54 – 63.
- NETTLES, C. and BAREFOOT, S. 1993. Biochemical and Genetic characteristics of bacteriocins of Food-Associated lactic acid bacteria. J. Food Protec. 56 (4): 338 – 356.
- NILSSON, L., GRAM, L. and HUSS, H. 1999. Growth Control of *Listeria monocytogenes* on Cold-smoked salmon using a Competitive Lactic Acid bacteria flora. J. Food Protec. 62 (4): 336 – 342.
- OMS, Organización Mundial de la Salud. 1987. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes en el hombre y los animales. Acha, P. y Szysres, B. Ed. Publicación científica de la Organización Mundial de la Salud N° 503. pp. 121 – 126.
- OWEN, F. 1996. Use of bacteriocins in food: regulatory considerations. J. Food Protec. Supplement: 72 – 77.
- PETERSON, M., PELROY, G., PARANJPYE, R., POYSKY, F., ALMOND, J. and EKLUND, M. 1993. Parameters for control of *Listeria monocytogenes* in smoked fishery products: sodium chloride and packaging, method. J. Food Protec. 56 (11): 938 – 943.
- PILET, M., DOUSSET, X., BARRÉ, R., NOVEL, G., DESMAZEAUD, M. and PIARD, J. 1995. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. J. Food Protec. 58 (3): 256 – 262.
- POST, R. 1996. Regulatory perspective of the USDA on the use of antimicrobials and inhibitors in food. J. Food Protec. Suppl: 78 – 81.

- REQUENA, T. y PELAEZ, C. 1995. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 35 (1): 19 – 44.
- RORVIK, L.M., SKJERVE, E. and YNDESTAD, M. 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum – packed smoked salmon, during storage at 4°C. Int. J. Food Microbiol. 14: 111 – 118.
- SAHM, H. 1993. Biological Fundamentals. En Biotechnology. A Multi-Volume Comprehensive Treatise. Volumen 1. 2ª Edición. Rehm, H. J. Y Reed, G. Ed, VCH. Weinheim, RFA. pp.150 – 158.
- SAUCIER, L. and GREER, G. 2001. Description of a simple Detection Assay for in situ production of Bacteriocin on Meat. J. Food Protec. 64 (2): 264 – 267.
- SCHILLINGER, U., STILES, M. E. and HOLZPAPFEL, W. H. 1993. Bacteriocin production by *C. piscicola* LV61. Int. J. Food Microbiol. 20(3): 131 – 147.
- SCHÖBITZ, R., ZAROR, T., LEON, O. and COSTA, M. 1999. A bacteriocins from *C. piscicola* of *L. monocytogenes* in vacuum-packaged meat. Food Microbiol. 16: 249 – 255.
- SINCLAIR, C. and CANTERO, D. 1990. Fermentation modelling. En: Fermentation a practical approach. Edit. by McNeil, B. and Harvey, L. M. Glasgow. pp. 65 – 112.
- STOFFELS, G., NISSEN-MEYER, J., GUDMUNSDOTTIR, A. SLETTEEN, K., HOLO, H. and NES, I. 1992. Purification and Characterization of a New bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 58(5): 1417 – 1422.

- STOFFELS, G., SAHL, H. and GUDMUNDSDÓTTIR, A. 1993. Carnocin UI49, a potential biopreservative produced by *Carnobacterium piscicola*: large scale purification and activity against various gram-positive bacteria including *Listeria* sp. *Int. J. Food Microbiol.* 20: 199 – 210.
- STRYER, L. 1995. Enzimas: conceptos básicos y cinética. En: *Bioquímica*. 4ª Edición. Edit. Reverté, S.A. España. pp. 181 - 204.
- TAGG, J. T., DAJANI, A. S. and WANNAMAKER, L. W. 1976. Bacteriocins of Gram positive bacteria. 40 (3): 722 – 756.
- TANIGUCHI, M., HOSHINO, K., URASAKI, H. and FUJH, M. 1994. Continuous production of an antibiotic Polypeptide (nisin) by *Lactococcus lactis* using a bioreactor coupled to a Microfiltration Module. *J. Fermentations and Bioengineering.* 77 (6): 704 – 708.

## **ANEXOS**

**ANEXO 1 Composición del medio de cultivo D-MRS utilizado para la producción de la bacteriocina**

Ingredientes	g/L
Proteasa peptona N° 3 (Difco)	10
Extracto de carne (BBL®)	10
Extracto de levadura (Merck)	5
Tween 80 (BBL®)	1
Citrato de amonio (W & Z)	2
Sulfato de Mg × 7 H <sub>2</sub> O (W & Z)	0,1
Sulfato de Mn × 1 H <sub>2</sub> O (W & Z)	0,05
Fosfato dipotásico (W & Z)	2
Sacarosa (Merck)	20
Agua destilada	1.000 mL

FUENTE: SCHILLINGER y STILES, 1993

## ANEXO 2 Cálculo del flujo de entrada y salida para el cultivo continuo de *C. piscicola* L103

Considerando un tiempo de duplicación  $t_D = 2$  h (BORQUEZ, 2000), la velocidad específica de crecimiento es:

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_D} = \frac{0,69315}{2} = 0,3466 \text{ h}^{-1}$$

donde:

$$\mu_{\text{máx}} = D_{\text{crít}} = 0,3466 \text{ h}^{-1}$$

Utilizando una tasa de dilución (D) igual al 80 % de la tasa de dilución crítica ( $D_{\text{crít}}$ ), se obtiene el siguiente flujo de alimentación para el cultivo continuo:

$$D_{\text{crít}} \times 0,8 = 0,3466 \text{ h}^{-1} \times 0,8 = 0,2773 \text{ h}^{-1} = D$$

Como:

$$D = \frac{F}{V}$$

donde: D = tasa de dilución ( $\text{h}^{-1}$ )

V = volumen del fermentador (L)

F = flujo de alimentación (L/h)

Entonces:

$$F = D \times V$$

$$F = 0,2773 \text{ h}^{-1} \times 10 \text{ L}$$

$$F = 2,773 \text{ L/h}$$

### ANEXO 3 Resultados del cultivo de *C. piscicola* L103 a nivel pre-piloto

#### ANEXO 3.1 Valores de densidad óptica (578 nm).

Tiempo (h)	D.O.	ln D.O.
0	0,379	-0,970
2	0,754	-0,282
4	1,457	0,376
6	4,348	1,470
8	7,128	1,964
10	10,333	2,335
12	10,926	2,391
22	9,453	2,246
26	7,333	1,992
30	7,963	2,075
34	8,713	2,165

#### ANEXO 3.2 Valores de recuento bacteriano de *C. piscicola* L103 (ufc/mL).

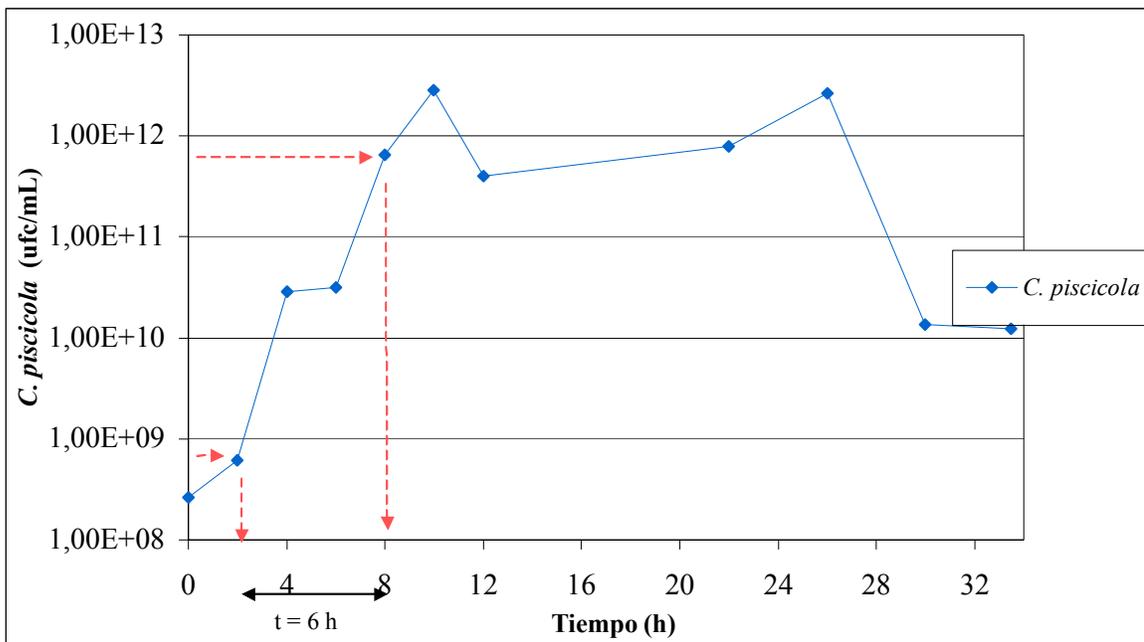
Tiempo (h)	Rcto.	log rcto.
0	$2,60 \times 10^8$	9,415
2	$6,10 \times 10^8$	9,785
4	$2,86 \times 10^{10}$	11,456
6	$3,15 \times 10^{10}$	11,498
8	$6,45 \times 10^{11}$	12,810
10	$2,84 \times 10^{12}$	13,453
12	$4,00 \times 10^{11}$	12,602
22	$7,85 \times 10^{11}$	12,895
26	$2,65 \times 10^{12}$	13,423
30	$1,37 \times 10^{10}$	11,137
34	$1,24 \times 10^{10}$	11,093

**ANEXO 3.3 Valores de actividad de la bacteriocina durante el cultivo de *C. piscicola* L103.**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>UA/mL</b>
2	200
4	200
6	400
8	1.600
10	1.600
12	1.600
22	1.600
26	3.200
30	1.600
34	800

#### ANEXO 4 Cálculo del tiempo de duplicación ( $t_D$ ) del cultivo de *C. piscicola* L103 para la producción pre-piloto

Considerando los datos obtenidos del recuento de la BAL en la fermentación a nivel pre-piloto (ANEXO 3.2), se puede calcular el tiempo de duplicación de la población microbiana matemáticamente como sigue:



De acuerdo al gráfico se puede considerar un período de crecimiento exponencial desde las 2 horas de comenzado el cultivo hasta las 8 horas aproximadamente, por lo que:

$$N_0 = 6,10 \times 10^8$$

donde:  $N_0$  : número inicial de células

$$N = 6,45 \times 10^{11}$$

$N$  : número final de células

$$t = 6 \text{ h}$$

$t$  : tiempo de crecimiento exponencial

Como el tiempo de duplicación es:

$$t_D = g = \frac{t}{n}$$

Donde:

$n$  : número de generaciones

$$n = \frac{(\log N - \log N_0)}{\log 2}$$

$$\text{luego: } n = \frac{\log 6,10 \times 10^8 - \log 6,45 \times 10^{11}}{\log 2}$$

$$n = 10,0463$$

$$\text{Por lo tanto: } t_D = \frac{6 \text{ h}}{10,0463} = 1,6744 \text{ h}$$

**ANEXO 5 Resultados obtenidos en el estudio de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina en contra de *L. monocytogenes* inoculada sobre filetes de salmón ahumado**

**ANEXO 5.1 Recuento de *L. monocytogenes* (ufc/cm<sup>2</sup>).**

Datos obtenidos en el primer experimento:

<b>Tiempo</b>	<b>Tratamientos</b>			
	<b>A (1.600 UA/mL)</b>	<b>B (800 UA/mL)</b>	<b>C (<i>L.monocytogenes</i>)</b>	<b>D (buffer)</b>
0	$5,71 \times 10^1$	$8,14 \times 10^1$	$2,04 \times 10^2$	$0,00 \times 10^0$
7	$1,04 \times 10^2$	$8,57 \times 10^1$	$3,71 \times 10^2$	$0,00 \times 10^0$
14	$2,24 \times 10^2$	$8,86 \times 10^1$	$1,10 \times 10^3$	$0,00 \times 10^0$
28	$3,04 \times 10^3$	$1,59 \times 10^3$	$9,20 \times 10^4$	$0,00 \times 10^0$

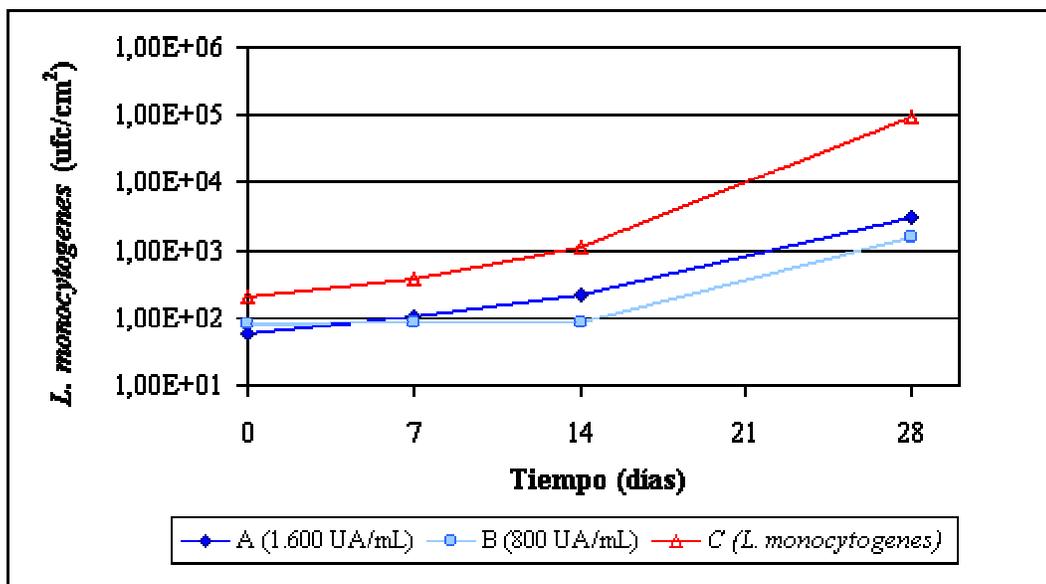
Datos obtenidos en el segundo experimento:

<b>Tiempo</b>	<b>Tratamientos</b>			
	<b>A (1.600 UA/mL)</b>	<b>B (800 UA/mL)</b>	<b>C (<i>L.monocytogenes</i>)</b>	<b>D (buffer)</b>
0	$3,29 \times 10^1$	$1,43 \times 10^1$	$2,86 \times 10^2$	$0,00 \times 10^0$
7	$4,19 \times 10^1$	$3,53 \times 10^1$	$3,76 \times 10^2$	$0,00 \times 10^0$
14	$4,39 \times 10^1$	$7,14 \times 10^1$	$1,24 \times 10^3$	$0,00 \times 10^0$
28	$3,51 \times 10^3$	$2,41 \times 10^3$	$1,13 \times 10^5$	$0,00 \times 10^0$

**ANEXO 5.2 Gráficos obtenidos de la inoculación de dos niveles de bacteriocina sobre filetes de salmón ahumado para dos repeticiones**

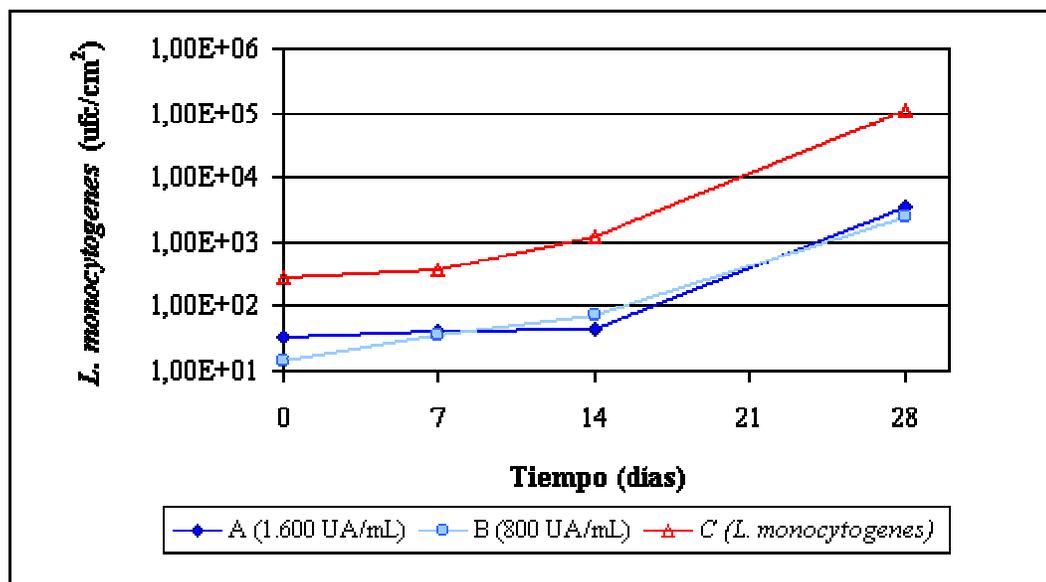
**ANEXO 5.2.1 Experimento N°1.**

Representación gráfica del primer experimento.



**ANEXO 5.2.2 Experimento N°2.**

Representación gráfica del segundo experimento.



**ANEXO 5.3 Análisis estadísticos del recuento de *L. monocytogenes*.**

**ANEXO 5.3.1 Análisis de varianza para el estudio de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina sobre salmón.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calc.	Nivel sign.
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Días	16,3384	3	5,44614	134,72	0,0000
B: Repetición	0,17329	1	0,17329	4,29	0,0838
C: Tratamiento	6,2687	2	3,13435	77,53	0,0001
INTERACCIONES					
AB	0,158491	3	0,0528303	1,31	0,3558
AC	0,599507	6	0,0999178	2,47	0,1476
BC	0,180942	2	0,0904711	2,24	0,1879
RESIDUO	0,242562	6	0,0404269		
TOTAL (Corregido)	23,9619	23			

**ANEXO 5.3.2 Análisis de comparación múltiple para el estudio de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina sobre salmón según el tiempo.**

Método: 95,0 por ciento		Tukey HSD	
Tiempo	n	Promedio de cuadrados mínimos	Grupos homogéneos
1	6	1,85096	X
2	6	2,04409	XX
3	6	2,32144	X
4	6	3,93808	X
Contraste		Diferencia	+/- Límites
1 – 2		-0,193129	0,400525
1 – 3		*-0,470478	0,400525
1 – 4		*-2,08711	0,400525
2 – 3		-0,277349	0,400525
2 – 4		*-1,89398	0,400525
3 – 4		*-1,61663	0,400525
* indica una diferencia estadísticamente significativa.			

**ANEXO 5.3.3 Análisis de comparación múltiple para el estudio de la actividad antimicrobiana de la bacteriocina sobre salmón según los tratamientos.**

Método: 95,0 por ciento		Tukey HSD	
Tratamiento	n	Promedio de cuadrados mínimos	Grupos homogéneos
B	8	2,11641	X
A	8	2,24175	X
C	8	3,25778	X
Contraste		Diferencia	+/- Límites
A – B		0,125339	0,308463
A – C		*-1,01603	0,308463
B – C		*-1,14137	0,308463
* indica una diferencia estadísticamente significativa.			

**ANEXO 5.4 Análisis Estadísticos del recuento de *L. monocytogenes* según tratamientos.**

**ANEXO 5.4.1 Tratamiento A: salmón con bacteriocina 1.600 UA/mL y *L. monocytogenes*. Análisis de varianza.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calc.	Nivel sign.
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Tiempo	4,44617	3	1,48206	28,80	0,0103
B: Repetición	0,204675	1	0,204675	3,98	0,1401
RESIDUO	0,15436	3	0,0514532		
TOTAL (Corregido)	4,8052	7			

Análisis de comparación múltiple para el tratamiento A, según el tiempo.

Método: 95,0 por ciento		Tukey HSD	
Tiempo	n	Promedio de cuadrados mínimos	Grupos homogéneos
1	2	1,6369	X
2	2	1,81962	X
3	2	1,99636	X
4	2	3,51409	X
Contraste		Diferencia	+/- Límites
1 – 2		-0,182708	1,09438
1 – 3		-0,35944	1,09438
1 – 4		*-1,87717	1,09438
2 – 3		-0,176733	1,09438
2 – 4		*-1,69447	1,09438
3 – 4		*-1,52773	1,09438
* indica una diferencia estadísticamente significativa.			

**ANEXO 5.4.2 Tratamiento B: salmón con bacteriocina 800 UA/mL y *L. monocytogenes*. Análisis de varianza:.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calc.	Nivel sign.
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Tiempo	3,8194	3	1,27313	15,82	0,0242
B: Repetición	0,138762	1	0,138762	1,72	0,2805
RESIDUO	0,241365	3	0,0804551		
TOTAL (Corregido)	4,19953	7			

Análisis de comparación múltiple para el tratamiento B, según el tiempo.

Método: 95,0 por ciento		Tukey HSD	
Tiempo	n	Promedio de cuadrados mínimos	Grupos homogéneos
1	2	1,53298	X
2	2	1,74038	X
3	2	1,90057	X
4	2	3,29171	X
Contraste		Diferencia	+/- Límites
1 – 2		-0,207398	1,36848
1 – 3		-0,367586	1,36848
1 – 4		*-1,75873	1,36848
2 – 3		-0,160188	1,36848
2 – 4		*-1,55133	1,36848
3 – 4		*-1,39114	1,36848
* indica una diferencia estadísticamente significativa.			

**ANEXO 5.4.3 Tratamiento C: salmón con *L. monocytogenes*. Análisis de varianza.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calc.	Nivel sign.
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Tiempo	8,67236	3	2,89079	1627,81	0,0000
B: Repetición	0,0107949	1	0,0107949	6,08	0,0904
RESIDUO	0,00532762	3	0,00177587		
TOTAL (Corregido)	8,68848	7			

Análisis de comparación múltiple para el tratamiento C, según el tiempo.

Método: 95,0 por ciento		Tukey HSD	
Tiempo	n	Promedio de cuadrados mínimos	Grupos homogéneos
1	2	2,383	X
2	2	2,57228	X
3	2	3,06741	X
4	2	5,00843	X
Contraste		Diferencia	+/- Límites
1 – 2		*-0,189283	0,134112
1 – 3		*-0,684409	0,134112
1 – 4		*-2,62544	0,134112
2 – 3		*-0,495126	0,134112
2 – 4		*-2,43615	0,134112
3 – 4		*-1,94103	0,134112
* indica una diferencia estadísticamente significativa.			

**ANEXO 6 Resultados obtenidos en el estudio del efecto de las proteasas del salmón sobre la actividad de una bacteriocina de *C. piscicola* L103**

**ANEXO 6.1 Resultados obtenidos en el ensayo de actividad proteásica para el jugo de salmón.**

TUBOS	LECTURA $\lambda$ 280 nm	UAP*
X <sub>1</sub>	0,320	0,031
M <sub>1</sub>	0,351	
X <sub>2</sub>	0,288	0,004
M <sub>2</sub>	0,292	

\* UAP: Unidades de Actividad Proteásica.

**ANEXO 6.2 Diámetros (mm) de halos de inhibición sin considerar el pocillo de 6 mm.**

Tiempo (h)	TRATAMIENTOS			
	A	B	C	D
0	8,73	11,31	0	0
19	6,19	8,86	0	0
24	6,78	9,97	0	0
40	6,91	9,32	0	0
48	9,03	11,02	0	0

**ANEXO 6.3 Análisis estadísticos para las zonas de inhibición según tratamiento.**

**ANEXO 6.3.1 Tratamiento A: bacteriocina 1.600 UA/mL y jugo de salmón.**

Análisis de varianza.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calc.	Nivel sign.
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Repetición	0,137453	2	0,0687267	0,28	0,7608
B: Tiempo	19,2824	4	4,8206	19,85	0,0003
RESIDUO	1,94308	8	0,242885		
TOTAL (Corregido)	21,3629	14			

## Análisis de comparación múltiple para el tratamiento A.

Método: 95,0 por ciento		Tukey HSD	
Tiempo	n	Promedio de cuadrados mínimos	Grupos homogéneos
2	3	6,19	X
3	3	6,77667	X
4	3	6,91	X
1	3	8,73	X
5	3	9,02667	X
Contraste		Diferencia	+/- Límites
1 – 2		*2,57	1,38771
1 – 3		*1,95333	1,38771
1 – 4		*1,82	1,38771
1 – 5		-0,296667	1,38771
2 – 3		-0,586667	1,38771
2 – 4		-0,72	1,38771
2 – 5		*-2,83667	1,38771
3 – 4		-0,133333	1,38771
3 – 5		*-2,25	1,38771
4 – 5		*-2,11667	1,38771
* indica una diferencia estadísticamente significativa.			

**ANEXO 6.3.2 Tratamiento B: bacteriocina 1.600 UA/mL. Análisis de varianza.**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F-calc.	Nivel sign.
-----					
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Repetición	0,565813	2	0,282907	0,97	0,4180
B: Tiempo	13,4531	4	3,36328	11,59	0,0021
RESIDUO	2,32225	8	0,290282		
-----					
TOTAL (Corregido)	16,3412	14			

## Análisis de comparación múltiple para el tratamiento B.

Método: 95,0 por ciento		Tukey HSD	
Tiempo	n	Promedio de cuadrados mínimos	Grupos homogéneos
2	3	8,85667	X
4	3	9,32	X
3	3	9,96667	X X
5	3	11,0167	X
1	3	11,3133	X
Contraste		Diferencia	+/- Límites
1 – 2		*-2,45667	1,51707
1 – 3		1,34667	1,51707
1 – 4		*1,99333	1,51707
1 – 5		0,296667	1,51707
2 – 3		-1,11	1,51707
2 – 4		-0,463333	1,51707
2 – 5		*-2,16	1,51707
3 – 4		0,646667	1,51707
3 – 5		*-1,05	1,51707
4 – 5		*-1,69667	1,51707
* indica una diferencia estadísticamente significativa.			