

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

**Efecto de una Bacteriocina de *Carnobacterium piscicola*,  
con Antagonismo en Contra de *Listeria monocytogenes*,  
Sobre la Conservación de Trucha Ahumada**

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

**César Alejandro Rodríguez Uribe**  
Valdivia Chile 2003

Profesor Patrocinante: Sra. Renate Schöbitz Twele  
Tecnólogo Médico, M.Sc.  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Ciencias Agrarias

Profesores Informantes: Sra. Luz Haydée Molina  
Pofesora de Biología y Química  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Ciencias Agrarias

Sr. Wilhelm Heimlich Mimica  
Químico  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Ciencias Agrarias

**A MIS PADRES,  
A MABEL Y A MARTINA**

## **Agradecimientos**

- En primer lugar quiero agradecer a mis padres por tantos años de apoyo, sacrificio, paciencia y comprensión; y a Javier por el apoyo logístico.
- A la señora Renate por permitirme participar en este equipo de trabajo y darme la oportunidad de involucrarme en un tema que me a servido como herramienta para mis oportunidades como profesional. Gracias por la constante preocupación y la infinita paciencia
- Agradecimientos muy especiales a la empresa Cultivos Marinos Chiloé, de la ciudad de Ancúd por la confianza depositada en este estudio y por el vital apoyo prestado.
- Deseo agradecer también por la gran disposición mostrada por la señora Luz Haydée y por don Wilhelm, mis profesores colaboradores, cada vez que los necesite.
- Al personal del laboratorio de microbiología del ICYTAL y muy especialmente a la señora Sade y señora Mariela por su gran disposición a colaborar en todo lo que necesite no sólo durante el desarrollo de mi tesis sino durante toda la carrera.
- Al personal del laboratorio de química del Instituto de Medicina Preventiva de la Universidad Austral por todo el conocimiento entregado en la realización de los análisis, especialmente a Daniel.
- Quisiera agradecer también a todos esos amigos que siempre estuvieron dispuestos a colaborar desinteresadamente cuando necesite ayuda. Algunos de ellos amigos de muchos años como Nacho, Ricardo, Rodrigo o Américo y otros que me han en la etapa de llegar a vivir en otro lugar, como Bernardino y Jinette.
- Finalmente gracias a Mabel por ser la amiga y la compañera incansable, por tirarme para arriba y aconsejarme un poco cuando lo he necesitado y a mi hija Martina por ser la razón de todo.

## ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Objetivo general	1
1.2	Objetivos específicos	1
2	REVISION BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas	3
2.2	Listeria monocytogenes	9
2.3	Aplicación de bacteriocinas en alimentos	12
2.3.1	Factores que afectan la efectividad de bacteriocinas en alimentos	12
2.3.2	Aspectos reglamentarios del uso de bacteriocinas en alimentos	13
2.4	La industria de salmónidos en Chile	14
2.5	Aspectos de calidad del salmón ahumado	16
2.5.1	Evaluación sensorial	17
2.5.2	Métodos químicos	17
2.5.3	Métodos físicos	18
2.5.4	Procedimientos microbiológicos	19
2.6	Control de <i>L. monocytogenes</i> en salmón ahumado	19
2.7	Proceso de elaboración de salmón ahumado en frío	21
3	MATERIAL Y MÉTODO	24
3.1	Origen de la bacteriocina	24
3.2	Purificación parcial de la bacteriocina	24
3.3	Prueba de actividad de bacteriocina	25
3.4	Origen de los pescados	26
3.5	Sistema de aplicación de la bacteriocina sobre los filetes de trucha	26
3.6	Estudio del efecto de la aplicación de bacteriocina sobre la calidad de la trucha ahumada en frío	28
3.6.1	Preparación de los filetes para su inoculación	28
3.6.2	Manejo de la bacteriocina	28

3.6.3	Inoculación de los filetes	29
3.6.4	Manejo de las muestras posterior a la inoculación	29
3.6.5	Análisis microbiológicos	29
3.6.6	Medición de pH	30
3.6.7	Determinación de bases volátiles totales	30
3.6.8	Análisis organoléptico	31
3.6.8.1	Selección de panelistas	31
3.6.8.2	Tratamientos a ser evaluados	31
3.6.8.3	Ejecución del panel sensorial	31
3.7	Estudio de la inhibición de <i>L. monocytogenes</i> en presencia de bacteriocina, sobre trucha ahumada en frío	32
3.7.1	Preparación de la cepa	32
3.7.2	Preparación de las muestras	32
3.7.3	Inoculación de las muestras	33
3.7.4	Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	33
3.8	Análisis de resultados	34
4	PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	35
4.1	Purificación parcial de la bacteriocina	35
4.2	Estandarización de parámetros de funcionamiento del sistema de aplicación de bacteriocina.	35
4.3	Estudio del efecto de la aplicación de bacteriocina sobre la calidad de la trucha ahumada en frío	35
4.3.1	Análisis microbiológicos	35
4.3.2	Análisis físicos y químicos	38
4.3.3	Análisis organoléptico	40
4.4	Estudio de la inhibición de <i>L. monocytogenes</i> por bacteriocina, sobre trucha ahumada en frío	43
5	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
6	CONCLUSIONES	52

7	RESUMEN - SUMMARY	53
	BIBLIOGRAFÍA	55
	ANEXOS	61

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Bacteriocinas producidas por distintas cepas de <i>C. piscicola</i> y sus fuentes de origen	4
2	Principales compuesto utilizados en la medición de calidad a través de métodos químicos	18
3	Resumen de los tratamientos y de las pruebas para la evaluación de la trucha	32
4	Recuento de bacterias psicrótrofas (log ufc/g) en trucha ahumada envasada al vacío, almacenada 21 días a $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$	36
5	Recuento de BAL (log ufc/g) en trucha ahumada envasada al vacío, almacenada 21 días a $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$	37
6	Medición de pH en trucha ahumada envasada al vacío, almacenada 21 días a $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$	39
7	Medición de nitrógeno básico volátil total (mg N/100g) en trucha ahumada envasada al vacío, almacenada 21 días a $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$	40
8	Recuento de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/cm <sup>2</sup> ) en trucha ahumada envasada al vacío, almacenada 21 días a $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo hipotético de infección por <i>Listeria monocytogenes</i>	11
2	Sistema utilizado para la inoculación de la bacteriocina sobre filetes de trucha	27
3	Recuento de bacterias psicrótrofas (log ufc/g) en filetes de trucha ahumada y envasada al vacío almacenada 21 días a $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$	36
4	Recuento de BAL (log ufc/g) en filetes de trucha ahumada y envasada al vacío durante 21 días a $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$	38
5	Medición de pH en filetes de trucha ahumada, envasada al vacío durante 21 días a $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$	39
6	Determinación de nitrógeno básico volátil total (mg N/100g) en filetes de trucha ahumada, envasada al vacío y almacenada 21 días a $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$	40
7	Resultado para magnitud de diferencia en los 4 tratamientos en el panel sensorial en los días 7 y 14 de análisis (escala de 0 a 9)	41
8	Resultado para calidad de las muestras en relación al control (R) en el panel sensorial para los días 7 (a) y 14 (b)	42
9	Diferencia encontrada en las muestras de trucha evaluadas por el panel sensorial (2 días de muestreo y 3 repeticiones por día, total 9 panelistas)	42
10	Recuento de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/cm <sup>2</sup> ) en trozos de trucha ahumada y envasada al vacío durante 21 días a $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Diagrama de flujo de trucha ahumada en frío (Cultivos Marinos Chiloé Ltda.)	62
2	Estandarización de los parámetros para la aplicación de la bacteriocina	63
2.1	Area de aspersión proporcionado por la pistola atomizadora a una distancia de 30 cm, con una presión de 20 psi	63
2.2	Tabla con valores de diámetros de aplicación con la pistola atomizadora con varios niveles de abertura de la tobera	64
2.3	Mediciones del volumen de líquido atomizado (mL) en 2 seg, con el sistema de aspersión con los parámetros de aplicación estandarizados	64
3	Test de comparación pareada	65
4	Tabla con las dimensiones de los trozos de trucha ahumada en frío utilizados para recuento de <i>L. monocytogenes</i>	66
5	Bacterias psicrótrofas	67
5.1	Recuentos de bacterias psicrótrofas (log ufc/g) para las muestras de trucha ahumada	67
5.2	Análisis de varianza para recuento de bacterias psicrótrofas de los cuatro tratamientos	67
5.3	Análisis de varianza para recuento de bacterias psicrótrofas en trucha ahumada en frío, por tratamiento	67
5.3.1	Trucha sin inocular (control)	67
5.3.2	Trucha con buffer fosfato	68
5.3.3	Trucha con bacteriocina 1.600 UA/mL	69
5.3.4	Trucha con bacteriocina 3.200 UA/mL	69
5.4	Análisis de varianza para recuento de bacterias psicrótrofas en trucha ahumada en frío, por días de análisis	70

5.4.1	Tiempo cero	70
5.4.2	Día 7	70
5.4.3	Día 14	71
5.4.4	Día 21	71
6	Bacterias ácido lácticas	72
6.1	Recuento de BAL (log ufc/g) para las muestras de trucha ahumada	72
6.2	Análisis de varianza para recuento de BAL en trucha ahumada en frío, para los cuatro tratamientos	72
6.3	Análisis de varianza para BAL en trucha ahumada en frío, por tratamiento	73
6.3.1	Trucha sin inocular (control)	73
6.3.2	Trucha con buffer fosfato	74
6.3.3	Trucha con bacteriocina 1.600 UA/mL	74
6.3.4	Trucha con bacteriocina 3.200 UA/mL	75
6.4	Análisis de varianza para recuento de BAL en trucha ahumada en frío, por días de análisis	76
6.4.1	Día 14	76
6.4.2	Día 21	76
7	Medición de pH	78
7.1	Valores de pH en trucha ahumada en frío	78
7.2	Análisis de varianza para medición de pH en trucha ahumada en frío, para los cuatro tratamientos	78
7.3	Análisis de varianza para determinación de pH en trucha ahumada en frío, por tratamiento	79
7.3.1	Trucha sin inocular (control)	79
7.3.2	Trucha con buffer fosfato	79
7.3.3	Trucha con bacteriocina 1.600 UA/mL	80
7.3.4	Trucha con bacteriocina 3.200 UA/mL	80
7.4	Análisis de varianza para la determinación de pH en trucha ahumada, por días de análisis	80

7.4.1	Tiempo cero	80
7.4.2	Día 7	80
7.4.3	Día 14	81
7.4.4	Día 21	81
8	Nitrógeno básico volátil total en trucha ahumada en frío	82
8.1	Tabla con datos de determinación de nitrógeno básico volátil total en trucha ahumada en frío, para los 4 tratamientos	82
8.2	Análisis de varianza para determinación de nitrógeno básico volátil total para los cuatro tratamientos	82
8.3	Análisis de varianza para determinación de nitrógeno básico volátil total en trucha ahumada en frío, por tratamiento	83
8.3.1	Trucha sin inocular (control)	83
8.3.2	Trucha con buffer fosfato	83
8.3.3	Trucha con bacteriocina 1.600 UA/mL	84
8.3.4	Trucha con bacteriocina 3.200 UA/mL	85
8.4	Análisis de varianza para la determinación de nitrógeno básico volátil total en trucha ahumada, por días de análisis	85
8.4.1	Tiempo cero	85
8.4.2	Día 7	86
8.4.3	Día 14	86
8.4.4	Día 21	87
9	Resultado del panel sensorial para magnitud de diferencia en los 4 tratamientos (escala de 0=No hay diferencia a 9=Extremadamente diferente)	88
9.1	Análisis estadísticos para la magnitud de diferencia en la evaluación organoléptica de las muestras de trucha ahumada, envasada al vacío	89
9.1.1	Análisis de varianza para grado de diferencia entre las muestras de trucha ahumada en el día 7	89
9.1.2	Análisis de varianza para grado de diferencia entre las muestras de	89

	trucha ahumada en el día 14	
9.1.3	Análisis de varianza para grado de diferencia entre las muestras de trucha ahumada en ambos días de análisis	90
10	Resultado del panel sensorial para calidad de las muestras en relación al control (1=Superior a R, 2=Igual a R y 3=Inferior a R)	91
10.1	Análisis estadístico de la aceptación en la evaluación organoléptica de las muestras de trucha ahumada con respecto al control	92
10.1.1	Análisis de varianza para aceptación entre las muestras de trucha ahumada con respecto al control en el día 7	92
10.1.2	Análisis de varianza para aceptación entre las muestras de trucha ahumada con respecto al control en el día 14	92
10.1.3	Análisis de varianza para aceptación entre las muestras de trucha ahumada con respecto al control para los dos días de análisis	93
10.1.4	Tabla de contingencia para la aceptación entre las muestras de trucha ahumada con respecto al control en el día 7	93
10.1.5	Tabla de contingencia para la aceptación entre las muestras de trucha ahumada con respecto al control en el día 14	93
10.1.6	Tabla de contingencia para la aceptación entre las muestras de trucha ahumada con respecto al control para los dos días de análisis	94
10.2	Tabla de contingencia para naturaleza de la diferencia entre muestras en la evaluación organoléptica de muestras de trucha ahumada con respecto al control para los dos días de análisis	95
11	Resultados de recuento de <i>L. monocytogenes</i> en trucha ahumada en frío, para los 3 tratamientos	96
11.1	Análisis de varianza para recuento de <i>L. monocytogenes</i> en trucha ahumada en frío, para los 3 tratamientos	96
11.2	Análisis estadísticos para estudio del efecto de la aplicación de bacteriocina sobre <i>L. monocytogenes</i> . Recuento de <i>L. monocytogenes</i> por tratamiento	97
11.2.1	Trucha con <i>L. monocytogenes</i> (control)	97

11.2.2	Trucha con bacteriocina 1.200 UA/mL y <i>L. monocytogenes</i>	97
11.2.3	Trucha con bacteriocina 1.600 UA/mL y <i>L. monocytogenes</i>	98
11.3	Análisis de varianza para recuento de <i>L. monocytogenes</i> en trucha ahumado en frío, por días de análisis	98
11.3.1	Tiempo cero	98
11.3.2	Día 7	98
11.3.3	Día 14	98
11.3.4	Día 21	99

## 1. INTRODUCCION

Los principales destinos de los salmónidos producidos en el país son en su mayoría mercados exigentes en cuanto a calidad se refiere, lo que incluye la seguridad microbiológica, siendo estrictos en la ausencia total de algunos gérmenes patógenos, como es el caso de *Listeria monocytogenes*. Una creciente atención ha recibido esta bacteria en las últimas décadas debido al número de casos registrados por el consumo de alimentos contaminados y al alto nivel de mortalidad que lleva asociado para el consumidor. El proceso de elaboración del salmón ahumado en frío no cuenta con una etapa donde se asegure la eliminación de este microorganismo, lo que sumado a la capacidad de *Listeria* para soportar condiciones ambientales adversas, plantea la necesidad de la aplicación de un método mediante el cual pueda ser destruida.

Otro gran desafío lo plantean las exigencias de los consumidores por alimentos más frescos y mínimamente procesados, sin preservantes químicos, por lo cual adquieren gran interés los métodos de conservación naturales e inocuos para el consumidor, exigencias cumplidas por algunos compuestos de origen biológico como las bacteriocinas. Es así como la biopreservación a través de estos péptidos antimicrobianos ha ganado un creciente interés y son muchos los que han investigado sobre sus características y su posible utilización en la preservación de productos marinos

Es así como en el presente estudio se han planteado los siguientes objetivos.

### 1.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de una bacteriocina láctica sobre la conservación de filetes de trucha ahumada.

### 1.2 Objetivos específicos

- Estandarizar los parámetros para la aplicación por aspersión de la bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* L103 sobre filetes de trucha.

- Estudiar el estado de conservación de la trucha ahumada, inoculada con la bacteriocina de *C. piscicola* L103, envasada al vacío y almacenada a 2°C, a través de parámetros microbiológicos, físicos, químicos, y organolépticos.
- Estudiar la inhibición de *Listeria monocytogenes* Lm82 por la bacteriocina de *C. piscicola* L103 sobre trucha ahumada en frío, envasada al vacío y almacenada a 2°C.

## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias Gram-positivas, no esporuladas y generalmente inmóviles, dentro de las cuales se describen siete géneros: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*. Todos los miembros de este grupo producen ácido láctico como principal, o único, producto final de la fermentación de hexosas (JAY, 1992), propiedad tecnológicamente importante en la industria alimentaria tanto por sus beneficios como por su acción dañina (GARCIA **et al.**, 1995). Su morfología corresponde a cocos o bacilos comúnmente ordenados en pares o cadenas, con gran tolerancia a la acidez. Viven en ambientes asociados a vegetales y al tracto intestinal. Las bacterias ácido lácticas son anaerobias aerotolerantes, debido a que poseen un tipo de fermentación asociado con el metabolismo anaerobio, siendo incapaces de cualquier tipo de respiración y además son indiferentes al oxígeno (LARPENT, 1994).

Pueden distinguirse dos grupos basados en los productos finales de la fermentación de glucosa. Las bacterias lácticas homofermentativas producen ácido láctico como el único o principal producto final, mientras las lácticas heterofermentativas producen cantidades equivalentes de ácido láctico, CO<sub>2</sub> y etanol (JAY, 1992). Nutricionalmente las BAL son muy exigentes, debido a su limitada capacidad biosintética, requiriendo de medios de crecimiento que contengan un carbohidrato fermentable y muchos factores de crecimiento como vitaminas del grupo B, purinas, pirimidinas y aminoácidos.

Las BAL son capaces de inhibir a otras bacterias debido a la acidificación del medio donde se desarrollan por la producción de ácidos orgánicos como el láctico y acético y de peróxido de hidrógeno (REQUENA y PELAEZ, 1995). Otros mecanismos

de acción antimicrobiano son, la competencia por nutrientes y/o producción de bacteriocinas o sustancias antibióticas (MEDINA **et al.** 1992).

El género *Carnobacterium spp.* fue establecido en forma relativamente reciente, e incluye bacterias como *Lactobacillus carnis* y *Lactobacillus divergens*. Este género reúne bacterias que en muchos aspectos tienen características de los lactobacilos pero difieren en su incapacidad para crecer en medios que contengan acetato y su capacidad de síntesis de ácido oleico en vez de ácido cis-vaccénico (COLLINS **et al.**, 1987; McMULLEN y STILES, 1996). El género *Carnobacterium* incluye las especies *C. divergens*, *C. piscicola*, *C. gallinarum* y *C. movile*. Este género de BAL ha sido ampliamente estudiado por su capacidad de producir un tipo de péptido con actividad antimicrobiana en contra de algunas bacterias patógenas especialmente *Listeria monocytogenes* (BUCHANAN y KLAWITTER, 1992; PILET **et al.**, 1995; DUFFES **et al.**, 1999; NILSSON **et al.**, 1999; SCHÖBITZ **et al.**, 1999). Dentro de este género se ha mostrado un gran interés por *C. piscicola*. En el CUADRO 1 se presentan algunos ejemplos de bacteriocinas producidas por distintas cepas de esta especie.

**CUADRO 1 Bacteriocinas producidas por distintas cepas de *C. piscicola* y sus fuentes de origen.**

Bacteriocina	Cepa	Fuente	Referencia
Piscicolina 126	JG126	Jamón deteriorado	a
Carnocina U149	U149	Pescado	b
Piscicolina 61	LV61	Carne	c
Carnobacteriocina	L103	Carne envasada al vacío	d

<sup>a</sup> JACK (1996).

<sup>b</sup> STOFFELS **et al.** (1993).

<sup>c</sup> Schillinger y Holzapfel, citados por MURIANA (1996).

<sup>d</sup> SCHÖBITZ **et al.** (1999).

Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de proteínas con propiedades antibacterianas, que varían en su espectro de actividad, modo de acción, peso molecular, origen genético y propiedades bioquímicas (ABBE **et al.**, 1995). Las BAL forman el

grupo más estudiado dentro de las bacterias productoras de bacteriocinas, pues estos organismos tienen un largo historial de uso en alimentos como cultivos iniciadores o como contaminantes naturales (MURIANA, 1996).

El término bacteriocina fue acuñado por Jacob **et al.** en 1953 (citados por JACK **et al.**, 1995). TAGG **et al.** (1976) y JACK **et al.** (1995), señalan cinco criterios básicos que definen las bacteriocinas:

- poseen un reducido espectro de acción centrado sobre especies próximas a la cepa productora
- poseen un sitio proteico biológicamente activo y esencial para su actividad
- presentan un modo de acción bactericida
- presentan unión a receptores específicos en la pared celular de la cepa sensible
- la producción de bacteriocinas está ligada a plásmidos y el organismo productor posee inmunidad a su propia bacteriocina

Estos criterios están basados en características de las colicinas, bacteriocinas prototipo producidas por varios miembros de la familia de las *Enterobacteriaceae*. Debido a las considerables diferencias que presenta el modelo prototipo de las colicinas con la mayoría de las bacteriocinas de bacterias gram-positivas, y para definir sustancias antagonicas no bien definidas, algunos autores han preferido usar términos como “sustancias del tipo bacteriocinas” o “sustancias inhibidoras del tipo bacteriocinas” (TAGG **et al.**, 1976; JACK **et al.**, 1995).

Klaenhammer, citado por JACK **et al.** (1995), definió cuatro distintas clases de bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: clase I, lantibióticos; clase II, bacteriocinas pequeñas y relativamente estables al calor, dentro de las cuales se pueden distinguir 3 subgrupos, clase IIa, péptidos activos contra *Listeria*, clase IIb, complejos de poración que requieren 2 péptidos diferentes para funcionar; clase IIc, péptidos tiol-activados que requieren cisteína reducida para su actividad; clase III, proteínas grandes (> 30 kDa) y termolábiles; y clase IV, bacteriocinas complejas que contienen moléculas de lípidos o carbohidratos, esenciales para su actividad.

Los lantibióticos son péptidos pequeños (menos de 5.000 Da) que contienen en su estructura aminoácidos atípicos como dihidroaminoácidos y tioeter aminoácidos (JACK et al., 1995), siendo la nisina la más conocida de las bacteriocinas pertenecientes a este grupo (REQUENA y PELAEZ, 1995). Las bacteriocinas del grupo II corresponden a proteínas activas contra membrana de la célula bacteriana, no contienen lantionina, son de tamaño pequeño (< 10 kDa) y relativamente estables al calor. Su molécula generalmente está cargada positivamente a pH neutro y poseen entre 30 y 60 aminoácidos (JACK et al., 1995). Gran interés merecen las bacteriocinas pertenecientes al grupo IIa, por su actividad principalmente antilisterial. Dentro de ese grupo se encuentran muchas bacteriocinas producidas por distintas cepas de *C. piscicola*. Las bacteriocinas perteneciente a la clase IIa comparten entre 34 y 80,5% de sus secuencias, entre otras características comunes como, un alto contenido de aminoácidos no polares (ENNANHAR et al., 2000); un alto contenido de cisteína, en comparación con otras bacteriocinas similares, los que forman puentes disulfuros (EIJSink et al., 1998); poseen un N-terminal hidrofílico y un C-terminal hidrófobo lo que afecta su actividad sobre la membrana de la bacteria inhibida (Abbe, citado por ENNANHAR et al., 2000). Existe poco conocimiento acerca de la estructura secundaria y terciaria de las bacteriocinas pertenecientes a la clase IIa, aunque existe evidencia que se trata principalmente de conformaciones no estructuradas, generalmente aleatorias (JACK et al., 1995; AYMERICH et al., 1998).

Las bacteriocinas de las BAL presentan propiedades bioquímicas comunes como la tolerancia a bajos niveles de pH, y a elevadas temperaturas, además de su sensibilidad a enzimas proteolíticas incluyendo a aquellas de origen pancreático y algunas de origen gástrico, como la pepsina. Esta característica es muy importante al pensar en un uso alimentario, ya que esto permite que sean inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal, evitándose así los riesgos relacionados con el uso de antibióticos (REQUENA y PELAEZ, 1995). La tolerancia de las bacteriocinas a tratamientos térmicos es, por lo general, elevada y parece estar asociada a la estructura de péptidos pequeños sin estructura terciaria (JACK et al., 1995), aunque se debe señalar que su

termoestabilidad puede verse disminuida luego de su purificación y por factores como el pH (MEDINA **et al.**, 1992).

En general la producción de bacteriocina y la inmunidad a la bacteriocina por parte del organismo productor, están ligadas genéticamente y asociadas a plásmidos (REQUENA y PELAEZ, 1995). Existen excepciones a lo anterior, ya que estudios sobre nisina, y sobre lantibióticos en general, indican que es ribosomalmente sintetizada como un péptido precursor (prepéptido) que es modificado enzimáticamente. Varios estudios sobre péptidos precursores apoyan la idea general que las bacteriocinas de bajo peso molecular (clase I y clase II) de bacterias gram positivas son primero formadas como prepéptidos, los cuales parecen no ser biológicamente activos (TAGG **et al.**, 1976), en el caso de la nisina corresponde a un péptido de 57 aminoácidos llamado prenisina, este prepéptido es modificado y libera la región líder N-términal de 23 aminoácidos y la región estructural de 34 aminoácidos (pronisina). La pronisina es modificada hasta dar lugar a la proteína activa (péptido maduro) (JACK **et al.**, 1995).

Se acostumbra decir que las bacteriocinas poseen un estrecho margen de acción, limitado a bacterias taxonómicamente muy próximas a la cepa productora (TAGG **et al.**, 1976), pero existen bacteriocinas con amplio rango de acción, como es el caso de la nisina, la cual es activa contra una gran cantidad de bacterias gram positivas. Bajo condiciones normales las bacteriocinas gram negativas no son sensibles a las bacteriocinas de BAL a menos que medie una destrucción de la integridad de la membrana celular.

Parece existir un mecanismo de acción común para la mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL (KLAENHAMMER, 1988; BRUNO y MONTVILLE, 1993; ABBE **et al.**, 1995; ENNAHAR **et al.**, 2000) afectando la integridad de las membranas de los microorganismos susceptibles, resultado de la formación de poros en la membrana citoplasmática, la cual tiene como consecuencia la pérdida de la fuerza motriz protónica (FMP) en forma total o parcial (JACK **et al.**, 1995). La FMP es la fuerza impulsora de muchos procesos vitales de la membrana citoplasmática, tales como la síntesis de ATP (Harold, citado por BRUNO y MONTVILLE, 1993), lo que involucra destrucción del potencial de membrana y

gradiente de pH (JACK *et al.*, 1995; MONTVILLE y CHEN, 1998). La pérdida de la FMP genera una disminución en los niveles intracelulares de ATP, incapacidad de realizar transporte activo de nutrientes e incapacidad de mantener suficientes concentraciones de cofactores lo que contribuye a la inhibición y muerte celular (Konisky citado por BRUNO y MONTVILLE, 1993).

Bhunja *et al.*, citados por MEDINA *et al.* (1992), señalan que el efecto letal de las bacteriocinas consta de dos etapas, en la primera la bacteriocina se absorbe a receptores específicos en la pared celular, etapa reversible y que no produce daños en la célula receptora. La segunda etapa comprende daños en la membrana, que altera su funcionamiento, los que son irreversibles (TAGG *et al.*, 1976). Publicaciones posteriores revisadas por JACK *et al.* (1995), discrepan sobre la necesidad de sitios de unión específicos para la acción de las bacteriocinas, indicando que muchos de estos péptidos pueden unirse a bacterias no sensibles.

La acción antibacteriana de una bacteriocina se mide en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL) y es definido como el recíproco de la más alta dilución que produce una zona de inhibición en el crecimiento del cultivo indicador en condiciones estandarizadas (TAGG *et al.*, 1976). El método más utilizado para medir la actividad consiste en la técnica de “gota sobre césped” (SCHILLINGER y LÜCKE, 1991; BUCHANAN y KLAWITTER, 1992; YANG *et al.*, 1992; PILET *et al.*, 1995; COVENTRY *et al.*, 1996). En esta técnica se utiliza una capa de agar que contiene a la bacteria indicadora, sobre este “césped” se colocan alícuotas de diluciones de bacteriocina, observándose luego de su incubación, la formación de halos de inhibición en el crecimiento de dicha cepa, previa eliminación de organismos productores viables de la preparación de bacteriocina (TAGG *et al.*, 1976). Otra de las pruebas utilizadas para medir el efecto antagónico de una bacteriocina es el “test de pocillos en agar”, en el cual se tiene un agar con la cepa indicadora al que se le realizan pocillos en los que se introduce la solución con bacteriocina; luego de su incubación se mide la formación de halos (SCHILLINGER y LÜCKE, 1991). Otros métodos están basados, por ejemplo, en diferencias en la turbidez de un caldo de cultivo con la cepa indicadora al crecer en presencia de la bacteriocina, o en la habilidad de las bacterias sobrevivientes de la acción

de una bacteriocina para producir un cambio de color en un colorante indicador (TAGG *et al.*, 1976).

## 2.2 *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* es un bacilo gram positivo, móvil a 20°C pero no a 37°C, no formador de esporas, aerobio facultativo que puede crecer entre -0,4 y 50°C (FARBER y PETERKIN, 1991). Es resistente a diversas condiciones como concentraciones de sal del 12%, un pH de 4,5 (AHAMAD y MARTH, 1990), temperaturas de refrigeración y cortos calentamientos a 60°C (WESSELS y HUSS, 1996).

Al género *Listeria* pertenecen 6 especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. murrayi*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. grayi*. Dentro de la especie *L. monocytogenes* se conocen 13 serotipos, siendo los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b los más comúnmente encontrado en los brotes de listeriosis registrados (FARBER y PETERKIN, 1991; ERICSSON, 1997). Sin embargo existe información contradictoria en relación a sí las poblaciones de esta bacteria, encontradas normalmente en alimentos, se corresponden con las que se ven involucradas en casos de listeriosis humana; pues mientras BOERLIN *et al.* (1997), no encuentra ninguna relación, estudios más recientes afirman que si existiría (RØRVIK *et al.*, 2000).

La bacteria aunque descrita desde principios de siglo, solo se le reconoció como patógena causante de enfermedades alimentarias a principios de la década de los 80'. La listeriosis afecta a mujeres embarazadas y su feto, ancianos, individuos inmunodeprimidos, o que padecen de diabetes mellitus, o alcoholismo, entre otras enfermedades. Sus síntomas incluyen meningitis, infecciones del sistema nervioso central, abortos, nacimientos prematuros y septicemia (DILLON y PATEL, 1992). Actualmente es uno de los patógenos alimentarios de mayor interés en los Estados Unidos, basado en la severidad de los casos registrados. El primer brote registrado ocurrió en Canadá, en 1979, debido al consumo vegetales contaminados con la bacteria; se registraron 23 casos con 14 muertos (DILLON y PATEL, 1992). En 1983 leche pasteurizada contaminada causó 14 muertos de un total de 49 casos (Fleming *et al.*, citados por FUCHS, 1999). 86 casos fueron provocados por queso tipo mexicano en

1985, en California (USA), de los cuales 29 fueron fatales (Linnan et al., citados por FUCHS, 1999). Casos esporádicos han sido asociados a productos marinos. En 1980 un brote asociado a pescados y mariscos afectó a 29 pacientes con 9 muertos (Food and Drug Administration, FDA, 2001<sup>1</sup>). Un brote se registró en la provincia de Värmland en Suecia (ERICSSON, 1997), e involucró salmón y trucha arcoiris ahumada y envasada al vacío. Las 9 personas afectadas incluían a personas sobre 70 años y mujeres embarazadas, registrándose tres casos fatales. Actualmente en Estados Unidos se estima en unos 2500 el número de casos graves que se presentan cada año con unos 500 casos fatales (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDC, 2000).

Esta bacteria se considera un contaminante medioambiental que se encuentra, con una alta frecuencia, tanto en agua de mar como en agua dulce (VAZ-VELHO et al., 1998; RØRVIK et al., 2000), así como también, en alimentos marinos como pescado ahumado, cocido, congelado, marinado y productos elaborados a partir de surimi (DILLON y PATEL, 1992; FARBER, 1992). Weagant et al. citados por DILLON y PATEL (1992), encontraron que el 26% de las muestras de alimentos marinos congelados contenían *L. monocytogenes*, mientras que JEMMI (1993), encuentra una incidencia total del 10% en salmón ahumado.

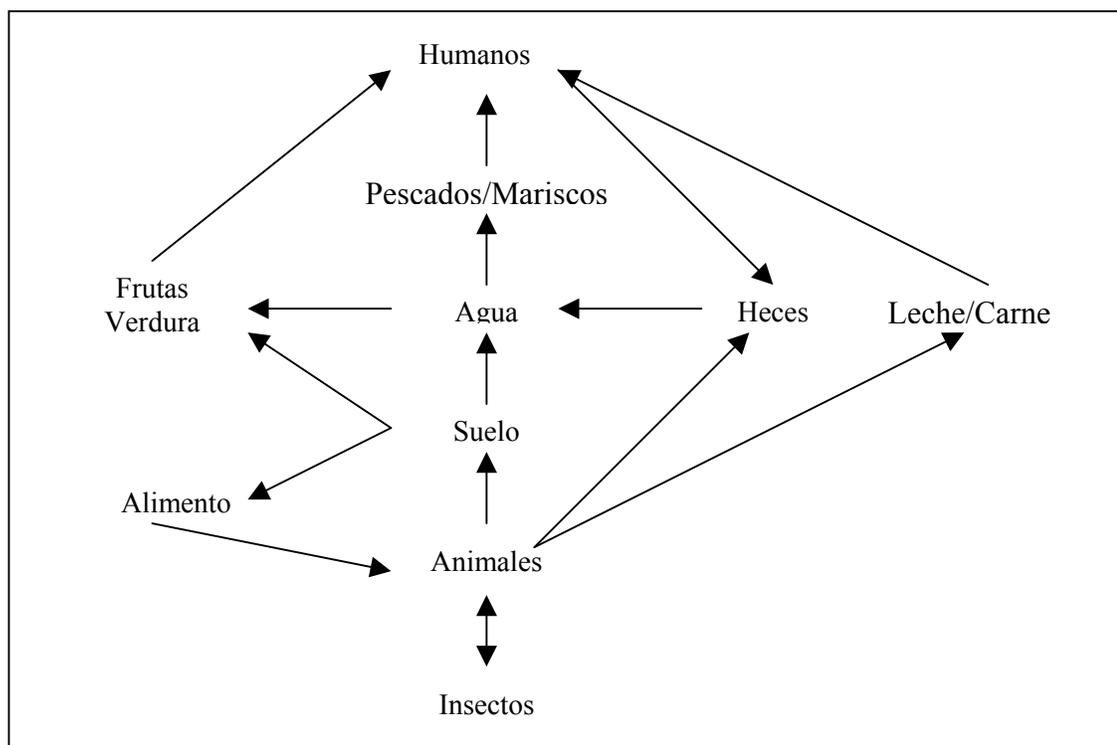
Es posible encontrar *Listeria* en el agua donde son cultivados los peces, a donde llega proveniente del material fecal de animales portadores (DILLON y PATEL, 1992). La contaminación llega a la planta procesadora de salmón, por lo general, transportada desde el agua por los peces. Una vez en la planta la bacteria es capaz de formar biopelículas en los equipos lo que le confiere una protección adicional contra condiciones adversas y la limpieza, haciendo más difícil su erradicación (MAFU et al., 1990; AUTIO et al., 1999). Brackett y Beuchat, citados por DILLON y PATEL (1992), sugieren un ciclo de infección de *Listeria* (FIGURA 1), mostrando la forma en que el organismo llega al ser humano.

En Chile, GESCHE y FERRER (1995), analizaron 52 muestras de 4 áreas de la X Región de nuestro país, correspondientes a agua marina de las zonas de recolección (ocho muestras), pescado eviscerado (20 muestras) y pescado fileteado (24 muestras)

---

<sup>1</sup> www.cfsan.fda.gov. Marzo, 2001. Center for Food Safety and Applied Nutrition, FDA.

proveniente de una planta elaboradora. Un 12% del total de muestras contenían *L. monocytogenes*, que correspondieron a un 12,5% de las muestras de agua de mar, 15% del pescado eviscerado y 8% del pescado fileteado. VILLALOBOS (2000), tomó 594 muestras de una planta procesadora de salmones de Chiloé, durante el año 1999. Las muestras correspondieron a producto fresco-refrigerado (121 muestras) y congelado (463), dentro de los que se incluye productos como el salmón ahumado en frío, envasado



FUENTE: Brackett, citado por DILLON y PETEL, 1992

**FIGURA 1** Ciclo hipotético de infección por *Listeria monocytogenes*

al vacío. Sus porcentajes de aislamiento fueron elevados, siendo un 53% del total de las muestras positivas para *L. monocytogenes*, divididas en un 60 % de las muestras de producto congelado y 26% de los salmones que correspondían a fresco refrigerado. Las concentraciones de *Listeria* en alimentos suelen ser baja, por lo general menor a  $10^2$  ufc/g (Jorgensen y Huss, citados por FDA, 2001), aunque se han reportado concentraciones más altas (FARBER y PETERKIN, 1991).

### 2.3 Aplicación de bacteriocinas en alimentos

Muchos autores se refieren a la inoculación directa de cepas productoras de bacteriocinas en productos alimenticios para inhibir microorganismos patógenos o de descomposición, sin embargo es mucho menor la información referente a la aplicación directa de las bacteriocinas (DUFFES *et al.*, 1999). La nisina es la única bacteriocina disponible comercialmente, por lo que son más recurrentes los estudios sobre este tema (MURIANA, 1996). Cutter y Siragusa, citados por MURIANA (1996), aplicaron nisina, por aspersión, para descontaminar canales de vacuno contaminadas con *Listeria innocua*, logrando la reducción de entre 1,8 y 3,3 ciclos logarítmicos.

Según la información de la literatura la actividad con que las bacteriocinas son aplicadas para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* son muy variables, encontrándose valores de 100 UA/ml (SCHÖBITZ *et al.*, 1999) y otros tan altos como 50.000 UA/ml (DUFFES *et al.*, 1999). SCHÖBITZ *et al.* (1999), inocularon una bacteriocina obtenida a partir de *C. piscicola* L103 con actividad de 100 UA/ml, en carne envasada al vacío a fin de controlar el crecimiento de *L. monocytogenes*, resultando esta bacteria completamente inhibida durante el periodo de almacenamiento de 21 días a 4°C. Por otro lado BORQUEZ (2000), quien obtuvo la bacteriocina de *C. piscicola* L103 mediante sistema de cultivo continuo, la aplicó sin purificación previa, con dos actividades (200 y 800 UA/ml) sobre filetes de salmón fresco, previamente inoculados con una cepa de *L. monocytogenes*. Después de 15 días de almacenamiento al vacío y a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ , se observó una acción bacteriostática sobre *Listeria*. DUFFES *et al.* (1999), investigaron la inhibición de *L. monocytogenes* por *C. piscicola* V1, *C. piscicola* SF668, *C. divergens* V41 y sus respectivas bacteriocinas sin purificar, sobre salmón ahumado envasado al vacío, y almacenado a 4 y 8°C. Los autores demostrando que el patógeno podía ser inhibido ya sea por la inoculación del extracto de bacteriocinas o en presencia de las cepas productoras.

**2.3.1 Factores que afectan la efectividad de bacteriocinas en alimentos.** Son muchos los factores que influyen en la actividad de las bacteriocinas sobre un organismo sensible, el cual se busca inhibir. MURIANA (1996), señala que la cantidad de

bacteriocina necesaria para un determinado nivel de letalidad va a depender del tipo de bacteria y del modo de acción de la bacteriocina, además la cantidad relativa de bacteriocina puede depender de la población de células que se debe inhibir.

Cuando se inoculan al alimento cepas productoras de bacteriocinas, las condiciones pueden no ser las más adecuadas para su producción (DUFFES *et al.*, 1999). Las bacteriocinas, por su parte, se pueden ver afectadas adversamente por condiciones en el procesamiento del producto, como pueden ser el calor, el pH (MURIANA, 1996), actividad proteolítica de la flora endógena, acción enzimática propia del alimento o unión a grasa y proteína (AYMERICH *et al.*, 1998). DUFFES *et al.* (1999), establecen además que la actividad de las bacteriocinas es aumentada cuando se asocia con otros factores inhibitorios como contenido de NaCl, CO<sub>2</sub>, ácidos orgánicos, temperatura y pH.

Otro punto importante a tener en cuenta para la aplicación de bacteriocinas como agente antimicrobianos en alimentos es la existencia de cepas que presentan resistencia a una bacteriocina; esta puede presentarse en forma de resistencia natural como puede ser observada debido a actividad proteolítica propia de la bacteria, o en forma espontánea por alteraciones y/o mutaciones de la membrana celular o sus constituyentes que interactúan con la bacteriocina (MURIANA, 1996).

**2.3.2 Aspectos reglamentarios del uso de bacteriocinas en alimentos.** Para su aplicación en alimentos se debe presentar una solicitud a las autoridades gubernamentales o internacionales (AYMERICH *et al.*, 1998). En los Estados Unidos de Norte América el organismo que regule su uso dependerá del alimento en el cual se utilice y el propósito para el cual se aplique. En el caso de alimentos procesados en los cuales se busque un efecto preservante, se estará bajo la jurisdicción de la Food and Drug Administration (FDA) y como un ingrediente alimentario estará regulado por el Acta de Alimentos Drogas y Cosméticos (FFDCA) (FIELDS, 1996). Las bacteriocinas caen bajo la condición de sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS). El reconocimiento de seguridad de una sustancia puede estar basado en la experiencia derivada del uso común o en procedimientos científicos. Los interesados en el uso de

este tipo de sustancias pueden escoger una autodeterminación de su condición de GRAS, la cual esta sujeta a la opinión de la FDA, realizar una petición formal a la agencia para que la incluya como GRAS, o presentar una petición para que sea considerada como aditivo alimentario.

La única bacteriocina que ha sido autorizada oficialmente para su uso alimentario es la nisina, que fue aprobada por la FAO/WHO en 1969, por la Comunidad Europea en 1983 y por la FDA en 1987; permitiéndose su uso en 52 países, en alimentos como queso, alimentos enlatados, pescado fresco, productos de panadería, leche pasteurizada y cerveza (AYMERICH *et al.*, 1998).

FIELDS (1996), indica que la información necesaria para realizar una evaluación de seguridad para una bacteriocina debería incluir diferentes aspectos.

- Caracterización del compuesto a ser utilizado, que debe ser lo más completa posible. Se debe incluir la identificación de la cepa productora, nombre químico del compuesto purificado, nombre común o comercial, sus propiedades, y la proporción en que se encuentra en la preparación final e información sobre cualquier constituyente contaminante.
- Descripción de las condiciones de cultivo y los métodos de purificación, además de detalles sobre procedimientos para garantizar la pureza de la cepa productora
- Usos propuestos, niveles en que se utiliza y los alimentos en los cuales será aplicado.
- Documentación que demuestre su efectividad
- Presentación de los controles necesarios para asegurar la ausencia el organismo productor en la preparación final.
- Destino metabólico del péptido, lo que incluye estudios para determinar si es fácilmente digerido en el tracto gastrointestinal.

#### **2.4 La industria de salmónidos en Chile**

El sector de la acuicultura representa, actualmente en Chile, el segundo rubro exportador más relevante superando a los productos de la pesca extractiva. Según el

Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA), citado por CHILE (2001), la cosecha total de los centros de cultivo de acuicultura para el año 2000 alcanzó a 376.918 toneladas brutas, de las cuales un 84,4% son aportadas por la X Región; esta cifra incluye cultivo de algas, moluscos y peces. El 95% de los volúmenes de cultivo provienen del área de los salmónidos, lo que incluye diversas especies de salmón como salmón atlántico, coho, plateado y rey, y trucha arcoiris.

En cuanto a exportaciones, Chile es el segundo mayor productor de salmón atlántico del mundo, superado sólo por Noruega, y el principal productor de trucha. La industria de los salmónidos generó ventas al exterior por US\$ 974 millones con 206.590 toneladas (CHILE, 2001), siendo Japón el principal destino con un 49% de la producción del año 2000, seguidos de Estados Unidos y la Comunidad Económica Europea, con un 37% y 6%, respectivamente. Los productos más vendidos corresponden a los congelados con un 66% del total de salmónidos exportados, le siguen los productos frescos (30%) y en tercer lugar aparecen los productos ahumados, exportándose durante el año 2000, 1.730 toneladas (0.8%), lo que equivale al 2% de los retornos de la industria salmonera chilena (US\$ 19.399).

De los productos ahumados un 58,3% de las toneladas exportadas, durante el año 2000, fue trucha (1.037 toneladas) con un aumento de sobre el 87% con respecto al año 1999, a pesar de la caída registrada en los precios (precio promedio de US\$12,4/kg en 1999 y US\$11,9/kg en el año 2000). El porcentaje restante corresponde casi exclusivamente a salmón atlántico (41,6%), el total de salmón ahumado en el año 2000 correspondió a 711 toneladas (con un 18% de aumento), manteniéndose el precio promedio en unos US\$10,3/kg (CHILE, 2001). Estas cifras revelan un creciente interés por productos con valor agregado, por lo que se prevé un crecimiento en la exportación de productos ahumados.

Una preocupación creciente ha tenido en Chile, el tema de la contaminación con *L. monocytogenes* pues es muy frecuente encontrarla tanto en productos, como materia prima y equipos dentro de la planta procesadora (VILLALOBOS, 2000), lo que se ha traducido en importantes esfuerzos tanto a nivel gubernamental como en las mismas plantas procesadoras, lográndose en algunos casos reducir en parte la incidencia de la

bacteria. El problema de la presencia de *Listeria* es particularmente preocupante en un producto crudo, listo para el consumo, como lo es el ahumado en frío, ya que no existe ninguna condición del proceso que logre destruir o por lo menos inhibir el desarrollo de la bacteria (FDA, 2001<sup>1</sup>).

## 2.5 Aspectos de calidad del salmón ahumado

El pescado es, en general, uno de los productos más perecibles debido a su composición proteica y a su alto contenido de agua, la cual puede llegar a ser mayor a un 95% en el caso del salmón, y en la trucha los valores fluctúan entre un 70 y 80%. Otro aspecto destacable es el bajo contenido de carbohidratos en el músculo del pescado, generalmente inferior al 0,5% (HUSS, 1998), lo cual influye en una escasa disminución en el pH. En general la composición de distintos tipos de pescados varía por las diferencias propias de cada individuo influenciadas por su estado de madurez, sexo, tipo de alimentación y estacionalidad (SCHLESINGER, 1993).

En los peces vivos y los recién capturados los microorganismos se encuentran en las superficies externas (piel, branquias) y en el intestino, en una cantidad y tipo muy variable que depende principalmente del medio ambiente en que se encuentren. En el caso de peces extraídos de aguas templadas la microflora esta dominada por bacilos psicrótrofos gram negativos, encontrándose los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, entre otros. En contraste, el músculo de un pez saludable o de un pescado recién capturado es estéril, debido a que el sistema inmunológico del pez previene el crecimiento de bacterias en el músculo; una vez muerto las bacterias son capaces de colonizar entre las fibras musculares, pero en forma muy limitada (HUSS, 1998). Por lo tanto se hace imprescindible un adecuado manejo post mortem tanto al nivel de la cadena de frío, así como de la manipulación en la planta procesadora para evitar la excesiva contaminación del músculo expuesto.

La producción de olores y sabores desagradables en el pescado se presentan debido a la existencia de compuestos volátiles como di y trimetilamina presente en pescados marinos producido a partir compuestos nitrogenados naturalmente encontrados

---

<sup>1</sup> [www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov). Marzo, 2001. Center for Food Safety and Applied Nutrition, FDA.

en el pescado. Este tipo de daño es producto de la actividad autolítica y de microorganismos. Otro tipo de deterioro se debe a la oxidación de las grasas del pescado, de naturaleza altamente insaturada, que la hace susceptible a la oxidación. Estos son solo algunos de los daños que ocurren en el pescado producto de la acción química, enzimática o bacteriana que deterioran su calidad organoléptica y la de los productos que con él se elaboren (HUSS, 1998). El factor más importante que afecta el proceso de descomposición es la temperatura, de esta forma, un producto mantenido a 0°C puede ser comestible luego de 15 días de almacenamiento, a 5°C no será apto para el consumo luego de 5 días (SCHLESINGER, 1993). Así también el manejo del pescado luego de su muerte puede ser importante en la velocidad del deterioro (HUSS, 1998).

Para evaluar la calidad del pescado se pueden utilizar diversos procedimientos los que incluyen evaluación sensorial, métodos químicos, métodos físicos y métodos microbiológicos.

**2.5.1 Evaluación sensorial.** Ciertas características de un alimento sólo pueden ser medidas significativamente por humanos, y en estos casos los procedimientos sensoriales son la mejor forma de evaluarlos. La inspección visual es también una forma muy habitual de evaluar la calidad del pescado fresco. En el salmón ahumado en frío no se han identificado microorganismos específicos del deterioro por lo tanto el análisis sensorial parece ser la mejor forma de evaluar su vida útil (LEROI y JOFRAUD, 2000). Los métodos sensoriales deben ser realizados científicamente, bajo condiciones cuidadosamente controladas para reducir los efectos ambientales y prejuicios personales.

**2.5.2 Métodos químicos.** Permiten establecer estándares cuantitativos relacionados con la calidad de los productos pesqueros, evitando recurrir a opiniones personales especialmente en lo que respecta a calidad marginal (HUSS, 1998). Entre los procedimientos de mayor utilidad (CUADRO 2) se encuentra la medición de amoníaco proveniente de la desaminación por descomposición de urea, creatina y otros compuestos nitrogenados (CONNEL y SHEWAN, 1980). Otro parámetro es la medición de dimetilamina (DMA) producida por la acción de enzimas autolíticas a partir de la

TMA (HEBARD et al., 1982). La trimetilamina (TMA), amina volátil es asociada con el olor típico del pescado en deterioro y producida por la reducción bacteriana del óxido de trimetilamina (HUSS, 1998). Aún cuando se cree que la producción de TMA esta relacionada con bacterias del deterioro, su correlación con el recuento de bacterias no es buena. La determinación de nitrógeno básico volátil total (NBVT), es tal vez el más utilizado de los métodos instrumentales y se correlaciona en forma razonablemente buena con los cambios sensoriales durante el deterioro (CONNEL y SHEWAN, 1980). Su cuantificación incluye la medición de TMA, DMA, amoníaco y otros compuestos nitrogenados básicos volátiles asociados con la descomposición de productos pesqueros. Su principal desventaja es que no refleja la forma en que se produjo el deterioro (sí este es bacteriano o autolítico). Un aspecto interesante de mencionar es que una fuente de variabilidad importante, especialmente en el caso de NBVT y TMA proviene de variaciones biológicas en la concentración de los compuestos precursores (CONNEL y SHEWAN, 1980).

**CUADRO 2 Principales compuesto utilizados en la medición de calidad a través de métodos químicos.**

Compuesto medido	Compuestos precursores	Reacción y sus productos
Amoníaco <sup>1</sup>	Urea, creatina, proteínas, péptidos y aminoácidos	$\text{Compuesto} \xrightarrow{\text{desaminación}} \text{NH}_3$
Trimetilamina (TMA) <sup>2</sup>	Oxido de trimetilamina (OTMA)	$\text{OTMA} \xrightarrow{\text{Reducción}} \text{TMA} + \text{FA}^*$
Dimetilamina (DMA) <sup>2</sup>	Trimetilamina (OTMA)	$\text{TMA} \xrightarrow{\text{Reducción}} \text{DMA} + \text{FA}$

\* Formaldehído

FUENTE: <sup>1</sup> CONNEL y SHEWAN, 1980; HUSS, 1998.

<sup>2</sup> HEBARD et al., 1982; HUSS, 1998.

**2.5.3 Métodos físicos.** Incluyen textura, propiedades eléctricas y pH. Sobre el último parámetro se puede mencionar que brinda valiosa información acerca de la condición de la carne de pescado (HUSS, 1998).

**2.5.4 Procedimientos microbiológicos.** Se utilizan principalmente para evaluar la presencia de organismos patógenos y constituye una fuente de información de la calidad higiénica del producto, pero no su calidad comestible o su frescura (CONNEL y SHEWAN, 1980; HUSS, 1998). Tienen el inconveniente de ser métodos largos y costosos. El análisis microbiológico más común es el recuento total, que representa el número total de bacterias aerobias viables capaces de formar colonias a una temperatura dada (HUSS, 1998). También se puede buscar bacterias que son responsables del deterioro, como por ejemplo, bacterias que sean capaces de producir H<sub>2</sub>S o de reducir el OTMA.

## **2.6 Control de *L. monocytogenes* en salmón ahumado**

La Food and Drug Administration (FDA, 2001<sup>1</sup>) considera prácticamente imposible eliminar la *L. monocytogenes* del ambiente de procesamiento, en plantas elaboradoras de productos listos para el consumo, tales como pescado ahumado en frío y otros productos cárnicos. El organismo sin embargo da recomendaciones para controlar adecuadamente a este contaminante ambiental tales como, un adecuado entrenamiento al personal en prácticas de higiene y limpieza, reducción o eliminación de la *Listeria* en puntos como las cintas transportadoras y máquinas de corte, recomendando el uso de vapor y compuestos de amonio cuaternario. También se recomienda el monitoreo habitual de la presencia del patógeno, y se hace hincapié en la importancia de observar estrictamente las buenas prácticas de higiene y buenas prácticas de elaboración.

Debido a que no existe ninguna condición en el producto o etapa en el proceso que permita inhibir o eliminar la presencia de *Listeria* en el salmón ahumado en frío, se deben evaluar métodos adicionales a la aplicación de sal, humo y temperatura, los cuales demuestran ser insuficientes para destruir la bacteria (FDA, 2001<sup>1</sup>).

Algunos productos químicos utilizados habitualmente han sido investigados para un potencial uso en contra de *L. monocytogenes*, tanto en productos cárnicos como en pescado.

- Cloruro de sodio (NaCl), puede ser una fuente de tensión osmótica al disminuir la actividad de agua en el alimento o medio de crecimiento en el que se encuentre la *Listeria*, sin embargo, esta bacteria es capaz de soportar concentraciones de sal superiores a los que se utilizan en el salmón ahumado, que bordean el 3% (FARBER y PETERKIN, 1991; THURETTE et al., 1998).
- Nitrito, este por si solo no tiene un gran efecto antilisterial, pero en presencia de sal, lactato de sodio y una temperatura adecuada es capaz de inhibir al patógeno. PELROY et al. (1994), afirma que la acción antilisterial del nitrito se ve mejorada a 5°C y una concentración de NaCl al 5%.
- Humo líquido, el cual ha sido aplicado con éxito especialmente en productos cárnicos logrando inhibir el crecimiento de *Listeria* (MESSINA et al., 1988).
- Sorbato, es considerado un compuesto GRAS por la FDA (2001)<sup>1</sup>, por lo que puede ser utilizado como aditivo, aunque su aplicación se dificulta desde el punto de vista tecnológico. Estudios de laboratorio revelaron que es más eficaz el sorbato para inhibir *Listera* a pH bajo (pH 5,0) y bajas temperaturas (5°C) (MOIR y EYLES, 1992).
- Almacenamiento al vacío, PELROY et al. (1994) concluyeron que el crecimiento de *L. monocytogenes* en salmón ahumado, se ve claramente afectado por el almacenamiento al vacío comparado con el envasado en bolsas permeables al oxígeno. Este fenómeno lo explican por la tendencia selectiva que tiene el envasado al vacío en favor de las BAL, bacterias que compiten con la *Listeria*.
- Almacenamiento congelado, es una eficiente técnica de prevenir el crecimiento de *L. monocytogenes*, según lo afirma FDA (2001), agregando que en productos

---

<sup>1</sup> www.cfsan.fda.gov. Marzo, 2001. Center for Food Safety and Applied Nutrition, FDA.

<sup>1</sup> www.cfsan.fda.gov. Marzo, 2001. Center for Food Safety and Applied Nutrition, FDA.

envasados al vacío el almacenamiento congelado causa muy poco efecto a nivel sensorial.

## **2.7 Proceso de elaboración del salmón ahumado en frío**

Existen dos tipos de procesos de ahumado, dependiendo de la temperatura utilizada. En el ahumado en caliente la temperatura sobrepasa los 60°C en el centro térmico del pescado, registrándose algún grado de cocción. En el ahumado en frío la temperatura no sobrepasa los 30°C por lo que el producto no sufre una cocción (MÖHLER, 1980).

La mayoría de las características deseables de un producto ahumado son debido a reacciones entre los componentes del humo y los constituyentes alimenticios. La coloración, por ejemplo, se produce principalmente por reacción de pardeamiento de Maillard en la superficie del producto por acción de sustancias de tipo carbonilos procedentes del humo. Contribuyen en la formación del sabor la sedimentación de sustancias coloreadas (principalmente fenoles volátiles que experimentan además oscurecimientos por polimerización u oxidación) y partículas procedente de los carbohidratos (furfural y sus derivados). La otra característica distintiva del ahumado es su sabor y aroma que se forma por la reacción de los proteínas con carbonilos, en primera instancia, y posteriormente con los fenoles (MÖHLER, 1980).

El humo para el proceso industrial de ahumado de salmón se origina por la combustión incompleta de madera o aserrín en presencia de oxígeno y sin llama abierta. Este humo tiene cuatro acciones principales sobre el salmón:

- acción conservadora, por efecto de las sustancias antibacterianas del humo y el retardo en el deterioro de la grasa por los compuestos antioxidantes que posee, como los fenoles.
- efecto colorante por la incorporación de componentes como el alquitrán, por la oxidación y polimerización de componentes del humo con sustancias proteicas y por la fijación de color mediante ácidos y aromatizante por la presencia de fenoles (guayacol, siringol y sus derivados).

- acción endurecedora sobre las proteínas, debido a una reticulación de proteínas musculares por los aldehidos, especialmente formaldehido.

Todos los factores mencionados, sumado al efecto de la sal y un adecuado mantenimiento en frío, provocan un aumento en su vida útil y le confiere al producto sus propiedades sensoriales características (MÖHLER, 1980).

A continuación se describen las principales etapas involucradas en la elaboración del salmón ahumado en frío<sup>1</sup> (ANEXO 1)

**a) Fileteo:** el salmón luego de ser eviscerado, pesado y seleccionado es mantenido en cámara a 0°C. Durante el proceso de fileteo se corta el salmón por la mitad obteniéndose 2 filetes, se eliminan las espinas pero se le deja la piel (Trim D). Esto para evitar marcas en la superficie y la formación de una capa en la superficie, causada por la deshidratación durante el salado y ahumado. De esta forma también se reduce la pérdida de humedad.

**b) Salado:** se realiza en seco, usando solo NaCl en una relación de 10% en peso, en una sala a una temperatura de aproximadamente 10°C. Posteriormente los filetes son lavados con agua potable a fin de eliminar los excesos de sal en la superficie y sometidos a un periodo de curado de 6 horas a temperaturas de refrigeración (entre 2 y 5°C). Este proceso permite que la sal que ha quedado en el filete difunda hacia el interior, a fin de obtener un salado uniforme, con una concentración de sal del 1,5%.

**c) Ahumado:** en el ahumador el filete permanece durante 8 horas, dentro de las cuales se registran tres etapas, un proceso de secado por 2 horas a 20°C, el ahumado propiamente tal por 4 horas a 26°C (entre 25 y 28°C) y un acondicionamiento final de 2 horas a 2°C.

---

<sup>1</sup> Fuente: Cultivos Marinos Chiloé Ltda. Ancud, X Región.

**d) Manejo post-ahumado:** golpe de frío por unos 30 a 45 minutos en un túnel de congelación, llegando a una temperatura por debajo de los 10°C, posteriormente se despiela mecánicamente y congela para luego ser acondicionado hasta una temperatura de -8°C para permitir un mejor corte. Los filetes posteriormente son cortados, ordenados y envasados al vacío (Multivac, modelo AG-800, Alemania).

Si bien la presencia y sobrevivencia de *L. monocytogenes* en un producto crudo, listo para el consumo como el salmón ahumado en frío, presenta una problemática aún por resolver, no se debe olvidar la importancia de los aspectos de calidad debido a las exigencia de los mercados a los cuales se destina el producto. Es así como el presente estudio evalúa el efecto de la aplicación de una bacteriocina sobre la calidad del salmón ahumado en frío y envasado al vacío, destinada a inhibir *L. monocytogenes*.

El trabajo se desarrolló en los laboratorios de microbiología de alimentos y de evaluación sensorial del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL), laboratorio de química del Instituto de Medicina Preventiva de la Universidad Austral de Chile y en la Planta Procesadora de salmones de la empresa Cultivos Marinos Chiloé Ltda., en la ciudad de Ancud, X Región.

### 3.1 Origen de la bacteriocina

La bacteriocina del estudio, corresponde a la bacteria ácido láctica *Carnobacterium piscicola* L103, cepa aislada a partir de carne envasada al vacío por SCHÖBITZ (1989)<sup>2</sup>. La bacteriocina fue obtenida mediante cultivo continuo a escala prepiloto (ZÚÑIGA, 2001<sup>3</sup>), seguido de un proceso de purificación por ultrafiltración (procedimiento evaluado por DELGADO, 2001).

### 3.2 Purificación parcial de la bacteriocina

Para este trabajo la bacteriocina de *C. piscicola* L103 fue parcialmente purificada a través de sucesivos procesos de ultrafiltración según el procedimiento de DELGADO (2001), obtenida a partir del contenido obtenido del fermentador (3.1).

El primer paso consistió en una microfiltración del cultivo en un filtrador rotatorio Spin Trex (New Brunswick Scientific. N.J., U.S.A.), con membrana de 20  $\mu\text{m}$ , a 15-16 psi. de presión y con una velocidad de rotación 1600 r.p.m., a fin de separar las células del medio de cultivo con la bacteriocina. Para el procedimiento completo de purificación parcial se tomó una porción de un litro por cada sesión, en la cual todo el volumen de cultivo fue sometido a las sucesivas etapas.

Para las etapas de ultrafiltración se utilizaron membranas de 30 KD, 10 KD (MILLIPORE Corporation. M.A., U.S.A.) y 3 KD (DIAFLO<sup>®</sup> AMICON, M.A., U.S.A.). En la membrana de 3 kD además de la ultrafiltración, se efectuaron dos etapas

---

<sup>2</sup> Schöbitz, R., 1989. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Datos no publicados.

<sup>3</sup> Tesis en ejecución. Escuela de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile.

de diafiltración dejando 100 mL de retenido, a los cuales se le agregó 100 mL de agua desionizada estéril, repitiendo el procedimiento anterior. El volumen retenido final se recolectó por aspersión con una manguera conectada a una bomba peristáltica. La bacteriocina parcialmente purificada se guardó congelada a  $-18^{\circ}\text{C}$  (Congelador Cónsul, modelo 260, Brasil) en un envase de vidrio estéril. Previo a su congelación se tomó una muestra a fin de determinar su actividad. La relación entre el volumen final e inicial fue de aproximadamente 1:10.

### 3.3 Prueba de actividad de bacteriocina

Para comprobar la actividad de bacteriocina previo a su aplicación, se utilizó la técnica de "gota sobre césped" (TAGG *et al.*, 1976). Para la técnica se empleó una placa de agar Soya Tripticasa (ST) (Difco Laboratories) que contenía un césped de la cepa indicadora, que para este estudio correspondió a *Listeria monocytogenes* Lm82 (Food and Drug Administration, Washington D.C., U.S.A.). Para la preparación del césped se inocularon 7 mL de agar ST semiblando (0,75% agar) con 0,7 mL de un cultivo de 24 horas de *L. monocytogenes*, diluido 10 veces en buffer fosfato, 0,05 M a pH 7,0 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ ). Sobre el césped se colocan 20  $\mu\text{L}$  de la bacteriocina (3.2), esterilizada por ultrafiltración, pasándola por un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation., Bedford, MA.). La placa se secó en una cámara de flujo laminar (Pure Aire Corporation, Van Nuys, California) por 30 min., para luego ser incubada a  $25^{\circ}\text{C}$  por 24 horas en una atmósfera con 10% de  $\text{CO}_2$ . Se observó la formación de halos de inhibición de la cepa indicadora en la zona de inoculación de la bacteriocina.

Para obtener las unidades arbitrarias de actividad de la bacteriocina (UA/mL), se realizaron diluciones seriadas de ésta en buffer fosfato 0,05 M a pH 7,0 (1:1, 1:2... 1:32, y diluciones superiores si fuese necesario), las que fueron puestas sobre el césped de *Listeria*. Se observó la formación de un halo de inhibición en la zona donde fue inoculada la bacteriocina. Para el cálculo de la actividad se observó la mayor de estas diluciones que presentó halo después de 24 horas de incubación. Las unidades de actividad (UA/mL) se obtuvieron a partir del valor recíproco de la dilución que presentó inhibición de la cepa indicadora.

### **3.4 Origen de los pescados**

Los filetes de trucha arcoiris fueron suministrados por la Planta procesadora ubicada en la ciudad de Ancud, Provincia de Chiloé, X Región. Los filetes de aproximadamente 500 g fueron inoculados, ahumados y envasados al vacío en la misma Planta (ANEXO 1).

### **3.5 Sistema de aplicación de la bacteriocina sobre los filetes de trucha**

Para la aplicación de bacteriocina sobre pescado se debía inocular solo un pequeño volumen de líquido debido a que un exceso de humedad podía afectar tanto la fijación de color durante el ahumado, como también, la vida útil durante su almacenamiento al vacío. Por lo tanto el sistema de aplicación debía permitir distribuir uniforme y eficientemente una pequeña cantidad de líquido, para lo cual se escogió una pistola atomizadora (SAGOLA S.A. Vitoria, España) que proporcionaba una fina nube de partículas sobre un área determinada y con un tamaño de gota que fuese fácilmente regulado. Dicha pistola (FIGURA 2) expulsa el líquido contenido en su recipiente por medio de aire comprimido, suministrado por un compresor de aire (SQUARE, Italia) . A fin de poder estandarizar la presión de trabajo (parámetro importante para poder establecer la cantidad de bacteriocina inoculada), se instaló un medidor de presión (SAGOLA S.A. modelo 472 Vitoria, España) (FIGURA 2), con un reloj indicador (rango entre 0 y 120 psi) (FIGURA 2). Finalmente el sistema debía evitar que la contaminación microbiológica que pudiera ser acarreada por el aire llegase al producto, para lo cual se le agregó un filtro de aire elaborado de lana de vidrio de 2 cm de diámetro interno y 15 cm de largo (FIGURA 2).

La pistola atomizadora se esterilizó haciendo pasar 300 mL de solución de alcohol de 70% de concentración, seguido de un enjuague con 2 L de agua destilada estéril, en los dos casos el líquido fue puesto en el recipiente y atomizado a una presión de 25 psi. El recipiente (FIGURA 2) se esterilizó en olla a presión por 15 min.



(1) Pistola atomizadora (SAGOLA), (2) Compresor de aire (SQUARE), (3) Medidor de presión (SAGOLA), (4) Filtro de aire de lana de vidrio, (5) Conexión al compresor.

**FIGURA 2 Sistema utilizado para la inoculación de la bacteriocina sobre filetes de trucha.**

Los parámetros que se tuvieron en cuenta fueron: la presión de aire, el área sobre la cual se realizaba la aplicación, el flujo de líquido atomizado, la cantidad de líquido aplicado por unidad de área y la distancia a la cual debería hacerse la aspersion.

Debido a la forma irregular de los filetes de trucha se realizaron dos aplicaciones paralelas por cada lado, para poder cubrir por completo cada una de sus caras en forma más homogénea. El área de aplicación se reguló según un ancho de los filetes de 16 cm, por lo tanto, el diámetro de aplicación debía ser de 8 cm. El diámetro se regulaba a través de un tornillo en la parte superior de la pistola (FIGURA 2), el cual permite aumentar o disminuir el área de aspersion.

Se probaron distintas presiones, a fin de buscar la adecuada que evitara que el líquido se esparciera demasiado y que a su vez produjese un tamaño de gota pequeño al

aplicar la bacteriocina a una distancia de entre 30 y 35 cm, aproximadamente (ANEXO 2.1). Para la selección de la presión de trabajo se consideró también el diámetro de aplicación (ANEXO 2.2). Posteriormente se estableció una velocidad de aplicación sobre los filetes y el tiempo que demoraría esta, de tal manera de atomizar una cantidad de líquido que no aumentase excesivamente la humedad en la superficie de los filetes. Finalmente con estos parámetros se determinó la cantidad de líquido aplicado.

### **3.6 Estudio del efecto de la aplicación de bacteriocina sobre la calidad de la trucha ahumada en frío**

**3.6.1 Preparación de los filetes para su inoculación.** Los filetes utilizados correspondieron a trucha arcoiris de calidad industrial, Trim E (filetes sin espinas y sin piel), seleccionados al azar. Estos tenían un peso entre 450 y 550 gramos y tamaño de unos 30 cm de largo por 15 a 17 cm en su parte más ancha. Los filetes fueron salados y curados como se indica en el ANEXO 1, proceso después del cual se realizó la inoculación con la bacteriocina.

**3.6.2 Manejo de la bacteriocina.** La bacteriocina se mantuvo congelada a una temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  y fue transportada en una caja térmica enfriada con bolsas de icepack. En la planta procesadora de salmones, la bacteriocina se mantuvo en un congelador hasta el momento de ser utilizada. Para este fin se le descongeló en un baño termostático a  $25^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo no superior a 30 min. Se separó una alícuota la cual se congeló nuevamente como control de la actividad de la bacteriocina en el momento de la inoculación (tiempo cero).

**3.6.3 Inoculación de los filetes.** Para la aplicación de cada uno de los tratamientos los filetes fueron escogidos al azar y puestos sobre bandejas con rejillas. Se utilizó el sistema descrito en la sección 3.5 con una presión de 20 psi, aplicado durante 2 segundos, por cada cara del filete, lo que equivalía aproximadamente a  $65 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ . La aspersión se efectuó en ambas caras (incluyendo los bordes) y a una distancia de entre

30 y 35 cm. Se dejó transcurrir al menos un minuto antes de inocular la segunda cara de un filete.

El estudio se llevó a cabo inoculando dos concentraciones de la bacteriocina de *C. piscicola* L103 sobre la trucha, 3.200 y 1.600 UA/mL, y un control sin inocular. Además se utilizó un control en el cual el volumen de inóculo de bacteriocina es reemplazado por buffer fosfato 0,05 M a pH 7,0.

**Tratamientos.** Se inocularon cuatro tratamientos, cada uno con tres repeticiones.

**T1:** Control sin bacteriocina.

**T2:** Control de inoculación con buffer fosfato.

**T3:** Bacteriocina con 1.600 UA/mL (actividad inicial).

**T4:** Bacteriocina con 3.200 UA/mL (actividad inicial).

**3.6.4 Manejo de las muestras posterior a la inoculación.** Las bandejas con las muestras fueron puestas inmediatamente en carros para ser ingresadas al ahumador, donde fueron ahumadas a una temperatura de 26°C con una humedad relativa del 70% en un proceso que dura 8 horas (ANEXO 1). Después de salir del ahumador fueron envasadas al vacío e inmediatamente trasladadas, en cajas térmicas, al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos donde se mantuvieron almacenadas a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ , en un refrigerador, hasta el momento de su evaluación, en el tiempo cero, y a los 7, 14 y 21 días (CUADRO 3).

**3.6.5 Análisis microbiológicos.** Para la determinación de *L. monocytogenes* se utilizó el método descrito por la Food and Drug Administration (HITCHINS, 1992), para lo cual se obtuvo 25 g de muestra de un composite de los triplicados, los cuales fueron incubados en 225 mL en un caldo de preenriquecimiento selectivo (caldo LEB) a 25°C por 48 horas, de este caldo se sembró con asa sobre placas de agar OXA (OXOID Ltd., Basingstoke, Inglaterra) y LPM (Difco) y se incuban a 35°C y 30°C, respectivamente,

por 48 horas. Las colonias sospechosas de ser *L. monocytogenes* fueron sembradas en agar ST a 25°C por 24 horas y sometidas a pruebas de identificación.

Para el recuento de bacterias psicrótrofas y BAL se tomaron 11 g de muestra a los que se le agregaron 99 mL de buffer fosfato (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, APHA, 1992) que fueron agitados en un homogeneizador Stomacher (Seward, modelo 400), a alta velocidad, por 1 min y se realizaron las diluciones necesarias para los recuentos respectivos. Para el recuento de bacterias psicrótrofas de sembró en profundidad en agar Plate Count (Merk, Darmstadt, Germany) y se incubó a 7°C por 10 días. Para los recuentos de BAL se sembró en superficie sobre agar MRS (Difco Laboratories), incubando a 25°C por 72 horas. Los análisis microbiológicos se realizarán cada 7 días, desde el tiempo cero, durante 21 días (CUADRO 3)

**3.6.6 Medición de pH.** El pH fue medido directamente en la carne de la trucha utilizando un potenciómetro digital (Orion Reseca, Inc., USA) , según lo establece el Servicio Nacional de Pesca, SERNAPESCA (CHILE, 2000).

**3.6.7 Determinación de bases volátiles totales.** Se utilizó el método descrito por SERNAPESCA (CHILE, 2000). Este método determina las bases volátiles nitrogenadas, consistentes principalmente de amoníaco, trimetilamina y dimetilamina. Se basa en la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético al 5% y eliminación de éstas a través de un filtrado. El extracto desproteinizado es alcalinizado con óxido de magnesio y destilado por arrastre de vapor. Las bases volátiles son recibidas en ácido bórico y cuantificadas por titulación con ácido clorhídrico usando verde de bromocresol y rojo de metilo como indicadores. Los resultados son expresados como nitrógeno básico volátil total por 100 g de muestra (mg NBVT/100 g de muestra). Para el análisis se requirieron 25 g de muestra y se realizó en duplicado. El análisis se efectuó en el tiempo cero, y los días 7, 14 y 21 (CUADRO 3).

### **3.6.8 Análisis organoléptico.**

**3.6.8.1 Selección de panelistas.** Con el fin de elegir las personas más idóneas para realizar la evaluación sensorial de la trucha se procedió primero a realizar una prueba de reconocimiento de sabores y olores. La prueba se repitió dos veces, en distintos días y horarios. Con el procedimiento anterior fueron preseleccionados 15 jueces, a los cuales se les solicitó evaluar varias muestras de trucha, la prueba fue también repetida dos veces. Con los resultados de esta prueba se seleccionó el panel del estudio. El número final de panelistas seleccionado fue de nueve.

**3.6.8.2 Tratamientos a ser evaluados.** Los tratamientos evaluados por el panel de jueces fueron, control sin bacteriocina (T1), control de inoculación con buffer fosfato (T2), filetes inoculados con bacteriocina de 1.600 UA/mL (T3) y filetes inoculados con bacteriocina de 3.200 UA/mL (T4).

**3.6.8.3 Ejecución del panel sensorial.** Por ser la trucha ahumada un producto listo para el consumo, no requería de una preparación especial para ser presentado a los panelistas. Los filetes fueron cortados en trozos de 4 cm por 4 cm y un espesor de 1 cm y servidos en platos individuales identificados con un código aleatorio de tres dígitos correspondiente a cada uno de los 4 tratamientos.

Para el análisis se aplicó un test de comparación pareada (Cartilla, ANEXO 3). En esta prueba se solicitó al panelista determinar si existían diferencia entre las muestras y un estándar designado con la letra R. La magnitud de éstas diferencias debían señalarse utilizando una escala de 10 puntos. Además se pedía establecer si el grado de aceptación de la muestra era superior, igual o inferior a R. Finalmente el panelista debía señalar en que características radicaba ésta diferencia, cuando estaban presentes.

La evaluación sensorial se llevó a cabo a los días 7 y 14 días de almacenamiento y fue repetido 3 veces en cada uno de estos días de muestreo (CUADRO 3).

**CUADRO 3 Resumen de los tratamientos y de las pruebas para la evaluación de la trucha.**

	DIAS DE ALMACENAMIENTO															
	Día 0				Día 7				Día 14				Día 21			
	AM	NV	pH	AO	AM	NV	pH	AO	AM	NV	pH	AO	AM	NV	pH	AO
Control sin inoculación	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Control con buffer fofato	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Bacteriocina 1.600 UA/mL	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Bacteriocina 3.200 UA/mL	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

AM: Análisis Microbiológicos.

NV: Determinación de Nitrógeno Básico Volátil Total.

AO: Análisis Organoléptico.

### 3.7 Estudio de la inhibición de *L. monocytogenes* en presencia de la bacteriocina, sobre trucha ahumada en frío

Este experimento se llevó a cabo a fin de conocer el efecto de la bacteriocina de *C. piscicola* L103 sobre *L. monocytogenes* inoculada en la superficie de trozos de trucha ahumada.

**3.7.1 Preparación de la cepa.** Para el estudio se utilizó *L. monocytogenes* Lm82 incubada en caldo ST durante 18 horas; la concentración aproximada de este caldo fue de  $10^9$  ufc/mL, por lo que fue diluido en buffer fosfato (APHA, 1992), hasta una concentración de  $10^5$  ufc/mL, concentración que fue empleada para la inoculación.

**3.7.2 Preparación de las muestras.** Los filetes fueron cortados en trozos de aproximadamente 5 cm por 5 cm, los que fueron medidos con pie de metro a fin de

conocer sus dimensiones exactas. En el ANEXO 4 se presenta un resumen con dichas mediciones.

**3.7.3 Inoculación de las muestras.** A fin de aplicar *L. monocytogenes* en forma segura para el analista y evitar su diseminación en el ambiente, se diseñó una cámara de polietileno sobre una estructura metálica, previamente esterilizada por aspersión de alcohol al 70%. Los trozos, previamente cortados y medidos, fueron puestos dentro de la cámara, donde se les inoculó *Listeria* con un sistema de aspersión manual, por una de sus caras y después de 5 minutos se voltearon para aplicar la *Listeria* en la cara inferior. Posteriormente se aplicó la bacteriocina.

**Tratamientos.** Se inocularon cuatro tratamientos, cada uno con tres repeticiones.

**TA:** Control sólo con *L. monocytogenes*

**TB:** *L. monocytogenes* más bacteriocina con 800 UA/mL (actividad inicial)

**TC:** *L. monocytogenes* más bacteriocina con 1.200 UA/mL (actividad inicial)

Los trozos fueron seleccionados al azar para cada tratamiento. Luego del procedimiento anterior los trozos fueron envasados en bolsas impermeables al oxígeno, selladas al vacío y almacenadas a una temperatura de  $2,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser analizadas en el tiempo cero, a los días 7, 14 y 21 de almacenamiento.

**3.7.4 Recuento de *L. monocytogenes*.** Para cuantificar el crecimiento de *Listeria* sobre el pescado (3.7.3) se realizaron siembras sobre agar OXA (OXOID). Los trozos fueron puestos en 100 mL de buffer fosfato (APHA,1992) y agitados en un homogeneizador Stomacher a alta velocidad por 1 min, realizando las diluciones adicionales necesarias para el recuento. Se sembró 0,1 mL de cada dilución, en la superficie de las placas de agar OXA incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Se contaron las colonias negras con halo negro y que presentaban formación de una zona de depresión hacia el centro de la colonia

### **3.8 Análisis de resultados**

En el análisis organoléptico, el grado de diferencia fueron evaluados por medio de análisis de varianza (ANDEVA) para un diseño factorial de 4 x 2 (4 tratamiento y 2 días de muestreo), para la comparación de la aceptación de las muestras con el control y la naturaleza de la diferencia se empleó una distribución de  $X^2$ , a través de tablas de contingencia.

Para los resultados de los análisis microbiológicos, bases volátiles totales y pH se empleó un ANDEVA multifactorial para un diseño de 4 x 4 (4 tratamientos y 4 días de análisis). En caso de encontrar diferencia estadísticamente significativa se empleó la prueba de hipótesis específica de Tukey (nivel de significancia de 95%). Para el análisis de resultados se empleó el programa STATGRAPHICS Plus versión 2.0, para Windows (Statistical Graphics Corp).

## 4. PRESENTACION DE RESULTADOS

### 4.1 Purificación parcial de la bacteriocina

En total para los requerimientos experimentales se ultrafiltraron y diafiltraron 4 L de caldo obteniéndose 400 mL de bacteriocina parcialmente purificada. Por sesión se ultrafiltró 1 L de caldo que contenía la bacteriocina con actividades iniciales entre 400 y 800 UA/mL, se obtenía un volumen final (también aproximado) de 100 mL con actividades desde 800 a 3.200 UA/mL, dependiendo entre otras cosas de la actividad inicial del cultivo.

### 4.2 Estandarización de parámetros de funcionamiento del sistema de aplicación de bacteriocina

Una vez evaluadas las distintas variables para la aplicación de bacteriocina mediante el uso de la pistola atomizadora (3.5), se fijaron los siguientes parámetros para la aspersion de la bacteriocina sobre los filetes de trucha: distancia de aplicación de 30 a 35 cm, con un diámetro de 8 cm (área de 100 cm<sup>2</sup>), 20 psi de presión, durante un tiempo de 2 seg, resultando en la aplicación de 65 µL/cm<sup>2</sup> de solución por cada cara del filete.

### 4.3 Estudio del efecto de la aplicación de bacteriocina sobre la calidad de la trucha ahumada en frío

A continuación se presentan los resultados del experimento destinado a conocer el efecto de bacteriocina con 1.600 y 3.200 UA/mL sobre la calidad de la trucha ahumada, medida a través de parámetros microbiológicos, físicos, químicos y organolépticos.

**4.3.1 Análisis microbiológicos.** En el CUADRO 4 y FIGURA 3 se presentan los resultados del recuento de bacterias psicrótrofas en agar Plate Count (ANEXO 5). Sólo en el día 14 se observaron diferencias significativas entre tratamientos, en el cual los

tratamientos con bacteriocina tuvieron valores significativamente más bajos que el control (T1) ( $p < 0,05$ ), además, se observó que entre los tratamientos con bacteriocina, el inoculado con 1.600 UA/mL (T3) presentó valores significativamente inferiores

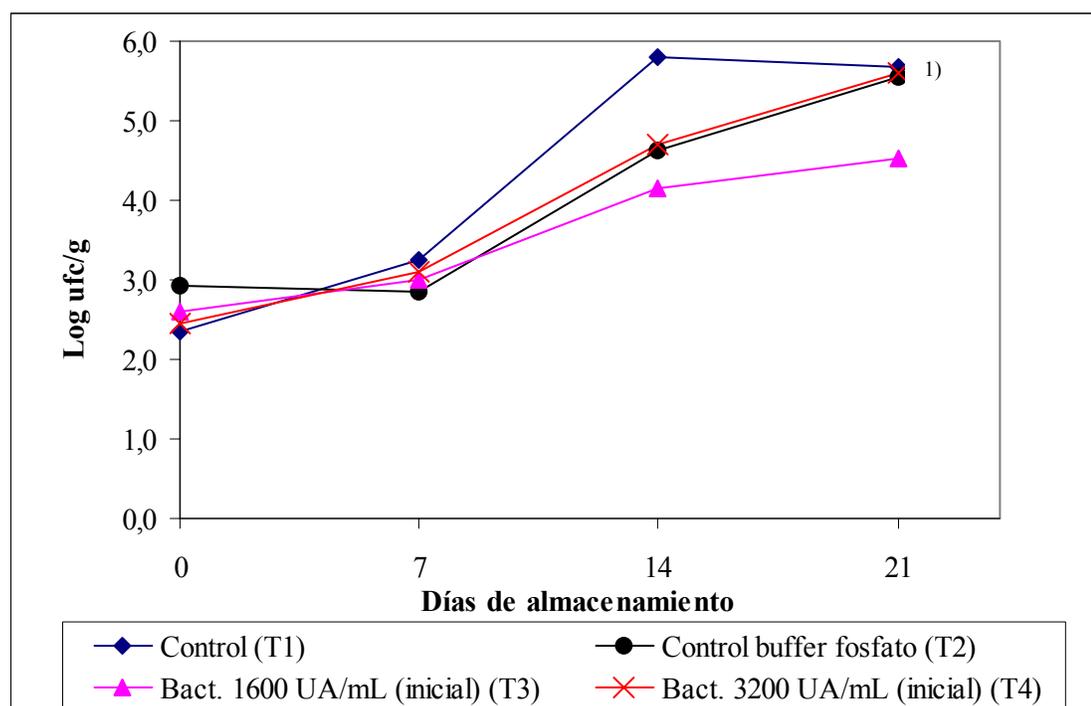
CUADRO 4 Recuento de bacterias psicrótrofias (log ufc/g) en trucha ahumada envasada al vacío, almacenada 21 días a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ .

	Tratamiento 1 (Control)	Tratamiento 2 (Buffer fosfato)	Tratamiento 3 (Bact. 1.600 UA/mL)	Tratamiento 4 (Bact. 3.200 UA/mL)
Día 0	2,35 <sup>1</sup> a <sup>2</sup> a <sup>3</sup>	2,92 a a	2,60 a a	2,46 a a
Día 7	3,25 a b	2,85 a a	3,01 a a	3,10 a a
Día 14	5,79 b c	4,63 a b	4,15 a b	4,71 a b
Día 21	5,67 a c	5,56 a b	4,52 a b	5,59 a b

<sup>1</sup> Valor corresponde al promedio de tres determinaciones.

<sup>2</sup> Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa entre filas.

<sup>3</sup> Letras color rojo distintas indican diferencia significativa entre columnas.



<sup>1)</sup> Valores corresponden al promedio de tres determinaciones.

FIGURA 3 Recuento de bacterias psicrótrofias (log ufc/g) en filetes de trucha ahumada y envasada al vacío almacenada 21 días a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ .

( $p < 0,05$ ) que el tratamiento inoculado con bacteriocina de 3.200 UA/mL (T4). Todos los tratamientos presentaron un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en sus recuentos de bacterias psicrótrofas, desde valores iniciales entre  $\log 2,4 \pm 0,1$  ufc/g y  $\log 2,9 \pm 0,3$  ufc/g. El aumento fue significativo desde el día 7 en el caso del control, alcanzando  $\log 5,7 \pm 0,2$  ufc/g en el día 21. En el caso de los restantes tratamientos el aumento se hizo significativo ( $p < 0,05$ ) a partir del día 14, y sus recuentos alcanzaron valores de  $\log 5,6 \pm 0,2$  ufc/g para el control con buffer fosfato,  $\log 4,5 \pm 0,4$  ufc/g en el tratamiento 3 y  $\log 5,6 \pm 0,4$  ufc/g para el tratamiento 4.

En el CUADRO 5 y FIGURA 4 se observa que recién a los 14 días se obtuvo recuentos de BAL en todos los tratamientos. Los resultados (ANEXO 6) muestran que en ese día los recuentos en el control con buffer fosfato (T2) fueron significativamente más alto ( $p < 0,05$ ) que el control sin inoculación (T1) y que en el tratamiento con bacteriocina de 1.600 UA/mL (T3). También se detectaron diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los dos tratamientos con bacteriocina. En el día 21 sólo el tratamiento 2 fue significativamente más alto ( $p < 0,05$ ) llegando a  $\log 4,6 \pm 0,3$  ufc/g. El control en ese día alcanzó un recuento de  $\log 4,0 \pm 0,2$  ufc/g, las muestras con 1.600 UA/mL  $\log 3,7 \pm 0,2$  ufc/g y el tratamiento con 3.200 UA/mL un valor de  $\log 3,8 \pm 0,3$  ufc/g.

Finalmente, no fue posible detectar *L. monocytogenes* en ninguno de los filetes de trucha utilizados en la experiencia, mediante la metodología descrita por la FDA (HITCHINS, 1992).

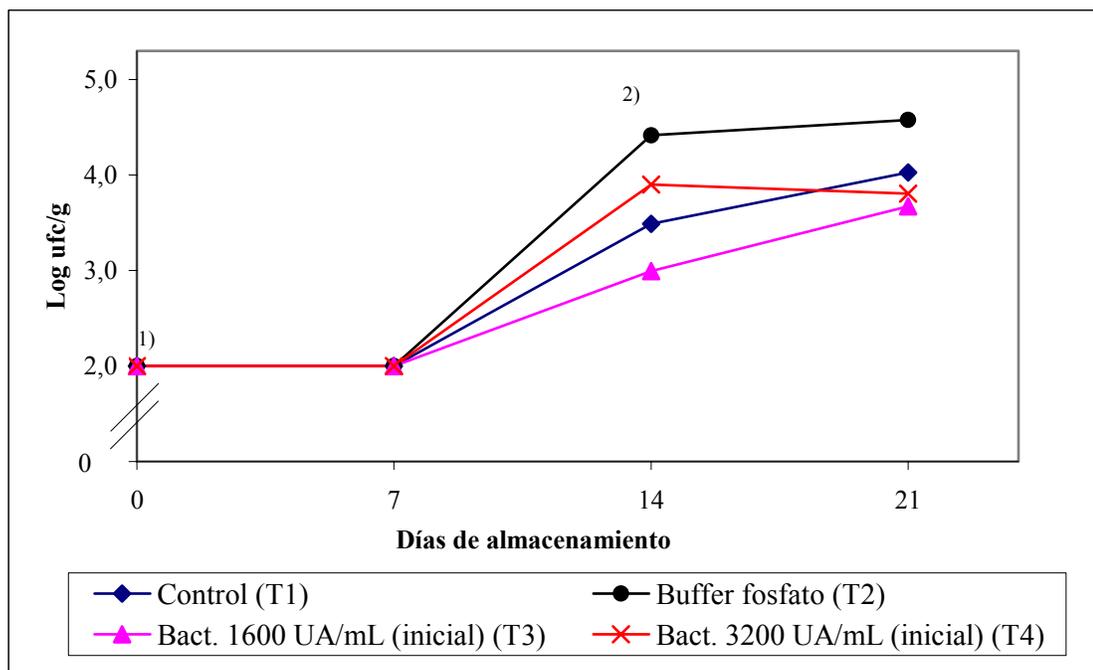
CUADRO 5 Recuento de BAL (log ufc/g) en trucha ahumada envasada al vacío, almacenada 21 días a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ .

	Tratamiento 1 (Control)	Tratamiento 2 (Buffer fosfato)	Tratamiento 3 (Bact. 1.600 UA/mL)	Tratamiento 4 (Bact. 3.200 UA/mL)
Día 0	< 2,0 a	< 2,0 a	< 2,0 a	< 2,0 a
Día 7	< 2,0 a	< 2,0 a	< 2,0 a	< 2,0 a
Día 14	3,49 <sup>1</sup> ab <sup>2</sup> b <sup>3</sup>	4,42 c b	2,99 a b	3,90 bc b
Día 21	4,03 a c	4,58 b b	3,67 a c	3,81 a b

<sup>1</sup> Valor corresponde al promedio de tres determinaciones

<sup>2</sup> Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa entre filas.

<sup>3</sup> Letras color rojo distintas indican diferencia significativa entre columnas.



<sup>1)</sup> Sensibilidad del método: log 2,0 ufc/g

<sup>2)</sup> Valores corresponden al promedio de tres determinaciones

**FIGURA 4** Recuento de BAL (log ufc/g) en filetes de trucha ahumada y envasada al vacío durante 21 días a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ .

**4.3.2 Análisis físicos y químicos.** La medición de pH (CUADRO 6 y FIGURA 5) de los filetes no arrojó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos para ninguno de los días de análisis (ANEXO 7). Además los tratamientos no presentaron variaciones significativas ( $p > 0,05$ ) en sus valores de pH en el tiempo.

En el CUADRO 7 y FIGURA 6 se observan los valores obtenidos en el análisis de nitrógeno básico volátil total (NBVT) en los cuatro tratamientos (ANEXO 8). En el día 7 se observa que los niveles de NBVT del control con buffer fosfato (T2) fueron menores ( $p < 0,05$ ) que los del control sin inoculación (T1) y del tratamiento 3 (inoculación con bacteriocina de 1.600 UA/mL). En el día 14 se produce un descenso en los valores del control sin inoculación llegando a ser significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) que el tratamiento 3. El control registra un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en sus valores de nitrógeno volátil en el día 7 desde un valor de 7,9 mg N/100g de muestra, aunque se presenta una disminución en el día 14, llegando finalmente hasta  $8,2 \pm 0,1$  mg

N/100g. Los tratamientos 2 y 3 también presentaron un aumento en sus valores ( $p < 0,05$ ) a partir de los días 7 y 14 respectivamente. El tratamiento 4 no presentó aumento ( $p > 0,05$ ) en sus niveles de NBVT durante los 21 días de experimento.

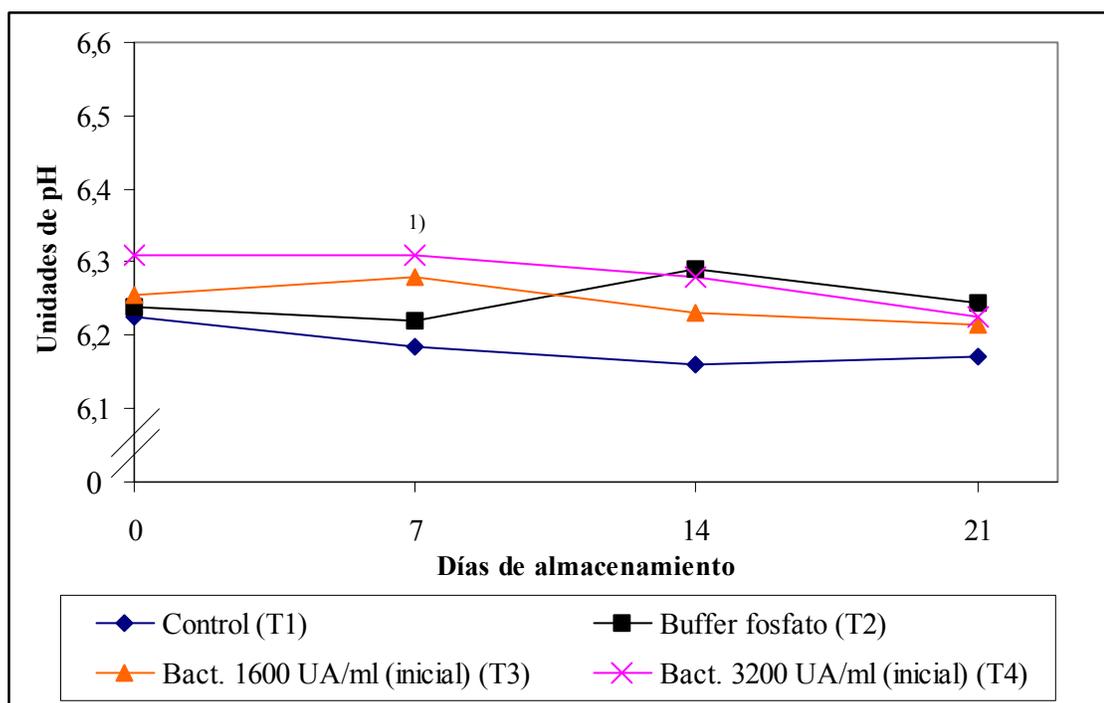
CUADRO 6 Medición de pH en trucha ahumada envasada al vacío, almacenada 21 días a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ .

	Tratamiento 1 (Control)	Tratamiento 2 (Buffer fosfato)	Tratamiento 3 (Bact. 1.600 UA/mL)	Tratamiento 4 (Bact. 3.200 UA/mL)
Día 0	6,23 <sup>1</sup> a <sup>2</sup> a <sup>3</sup>	6,24 a a	6,26 a a	6,31 a a
Día 7	6,19 a a	6,22 a a	6,28 a a	6,31 a a
Día 14	6,16 a a	6,29 a a	6,23 a a	6,28 a a
Día 21	6,17 a a	6,25 a a	6,22 a a	6,23 a a

<sup>1</sup> Valor corresponde al promedio de dos determinaciones

<sup>2</sup> Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa entre filas.

<sup>3</sup> Letras color rojo distintas indican diferencia significativa entre columnas.



<sup>1)</sup> Valores corresponden al promedio de dos determinaciones

FIGURA 5 Medición de pH en filetes de trucha ahumada, envasada al vacío durante 21 días a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ .

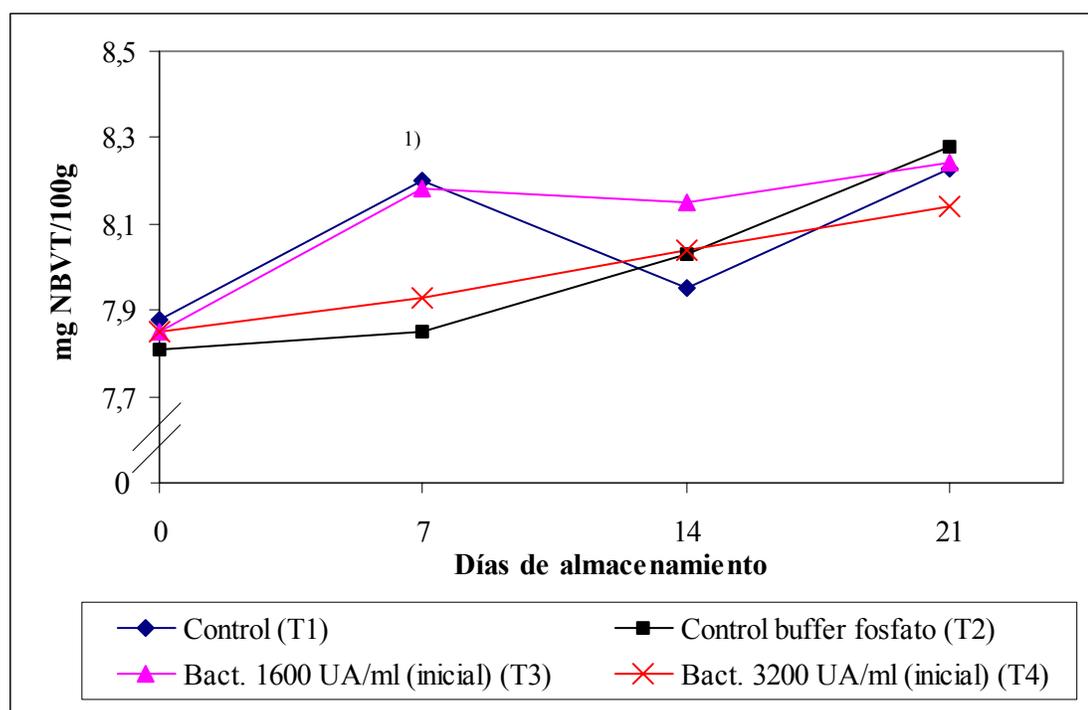
CUADRO 7 Medición de nitrógeno básico volátil total (mg N/100g) en trucha ahumada envasada al vacío, almacenada 21 días a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ .

	Tratamiento 1 (Control)	Tratamiento 2 (Buffer fosfato)	Tratamiento 3 (Bact. 1.600 UA/mL)	Tratamiento 4 (Bact. 3.200 UA/mL)
Día 0	7,88 <sup>1</sup> a <sup>2</sup> a <sup>3</sup>	7,81 a a	7,85 a a	7,85 a a
Día 7	8,20 b bc	7,85 a a	8,18 b b	7,93 ab a
Día 14	7,95 a ab	8,03 ab ab	8,15 b b	8,04 ab a
Día 21	8,23 a c	8,28 a b	8,24 a b	8,14 a a

<sup>1</sup> Valor corresponde al promedio de dos determinaciones

<sup>2</sup> Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa entre filas.

<sup>3</sup> Letras color rojo distintas indican diferencia significativa entre columnas.

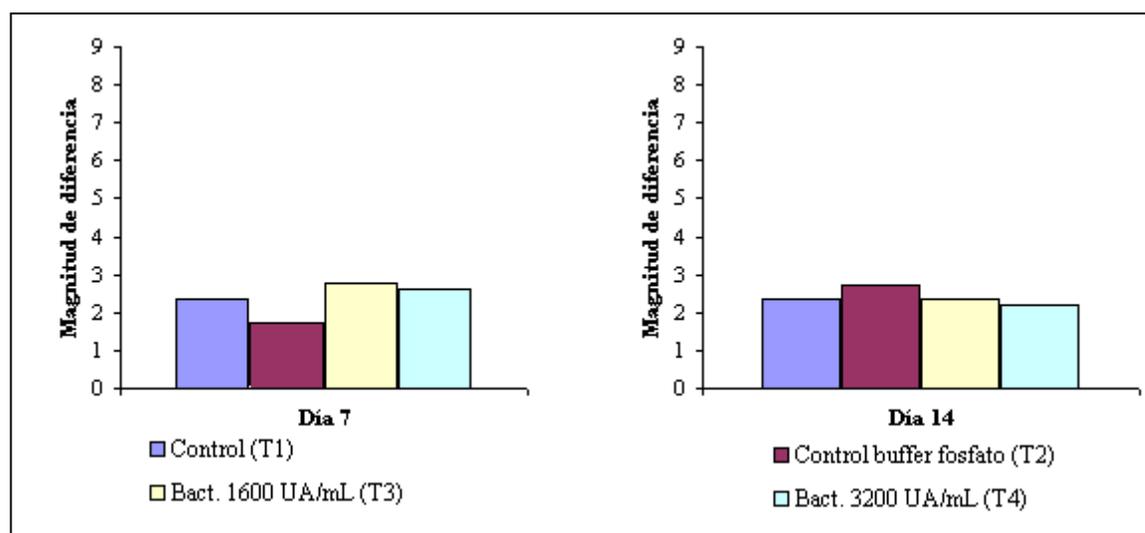


<sup>1)</sup> Valores corresponden al promedio de dos determinaciones

FIGURA 6 Determinación de nitrógeno básico volátil total (mg N/100g) en filetes de trucha ahumada, envasada al vacío y almacenada 21 días a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ .

**4.3.3 Análisis organoléptico.** A través de pruebas de reconocimiento de olores y sabores básicos se seleccionaron 9 panelistas, los cuales participaron en la evaluación de las muestras involucradas en el estudio.

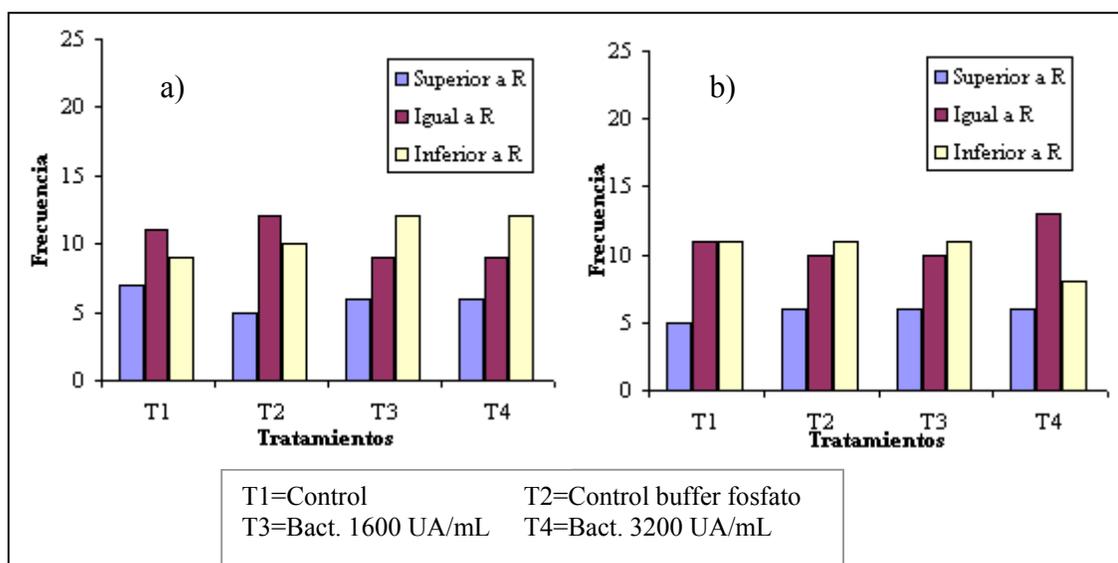
En el ANEXO 9 se muestran los datos arrojados por el panel de jueces sobre la magnitud de diferencia entre las muestras y R, los cuales se grafican en la FIGURA 7, encontrándose que no hubo diferencias significativas ( $p>0,05$ ), entre los distintos tratamientos evaluados, es decir los jueces no detectaron diferencias en el pescado al agregar bacteriocina. Tampoco se encontró diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre los días de análisis ni de las opiniones entre los jueces.



<sup>1)</sup> Valores corresponden al promedio de la opinión de nueve jueces y tres repeticiones  
**FIGURA 7 Resultado para magnitud de diferencia en los 4 tratamientos en el panel sensorial en los días 7 y 14 de análisis (escala de 0 a 9).**

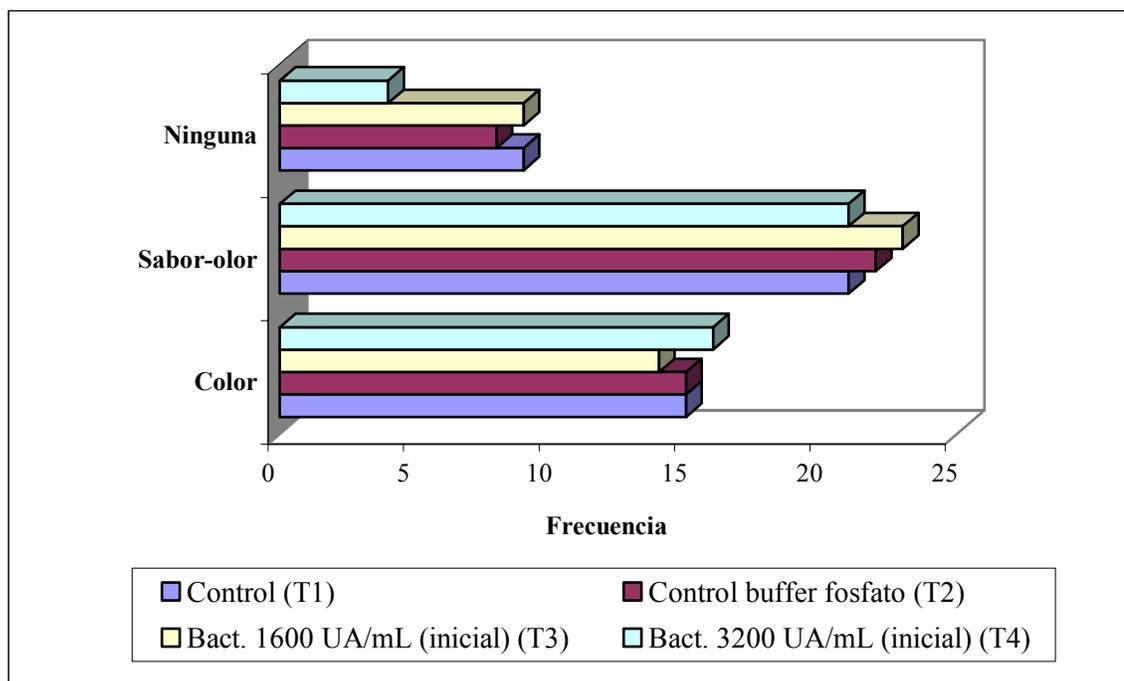
En cuanto a la apreciación general que los jueces tuvieron de las muestras inoculadas con respecto al control (FIGURA 8), los resultados (ANEXO 10) indicaron que no existieron diferencias ( $p>0,05$ ) entre las muestras al ser comparadas con el control sin inoculación, lo anterior se confirma al revisar las tablas de contingencia (ANEXO 10.1). Tampoco se registraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ) entre los resultados de ambos días de análisis (días 7 y 14), aunque si entre las opiniones de los jueces.

Los datos analizados en el ANEXO 10.2 y cuyos resultados se observan graficados en la FIGURA 9, indican que no existió influencia de ningún atributo sensorial particular sobre la calidad de los distintos tratamientos.



<sup>1)</sup> Valores corresponden al promedio de la opinión de 9 jueces y tres repeticiones.

**FIGURA 8** Resultado para calidad de las muestras en relación al control (R) en el panel sensorial para los días 7 (a) y 14 (b).



Dos días de muestreo y tres repeticiones por día, total de nueve panelistas

**FIGURA 9** Diferencia encontrada en las muestras de trucha evaluadas por el panel sensorial (2 días de muestreo y 3 repeticiones por día, total 9 panelistas).

#### 4.4 Estudio de la inhibición de *L. monocytogenes* por bacteriocina, sobre trucha ahumada en frío

Este experimento tenía por objeto estudiar la capacidad antagonista de la bacteriocina sobre una cepa sensible de *L. monocytogenes*, en trozos de trucha ahumada en frío envasado al vacío y almacenado a temperaturas de refrigeración.

Inicialmente se inoculó con un caldo diluido de  $10^5$  ufc/mL, con lo cual se obtuvo un recuento de alrededor de  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup> sobre la superficie del pescado. Los resultados de los recuentos de *L. monocytogenes* (CUADRO 8 y FIGURA 10) indican que existieron diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos (ANEXO 11); al aplicar la prueba de rangos múltiples se estableció que tal diferencia se encontraba entre el control y ambos tratamiento con bacteriocina, además no existieron diferencias entre los tratamientos con distintas actividades de bacteriocina. Una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el día 14 se registra entre los tres tratamientos, siendo los recuentos del control superiores ( $p < 0,05$ ). Además se puede mencionar los recuentos del tratamiento inoculado con 1.200 UA/mL (TB) fueron significativamente mayores que los del tratamiento con 1.600 UA/mL (TC). En el día 21 sólo el control fue significativamente más alto ( $p < 0,05$ ). El control sin bacteriocina alcanzó un recuento de  $\log 6,4 \pm 0,4$  ufc/cm<sup>2</sup>, lo que implica un aumento de 2,2 ciclos logarítmicos. El tratamiento B registro un aumento levemente superior a medio ciclo decimal en el día

**CUADRO 8 Recuento de *L. monocytogenes* (log ufc/cm<sup>2</sup>) en trucha ahumada envasada al vacío, almacenada 21 días a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ .**

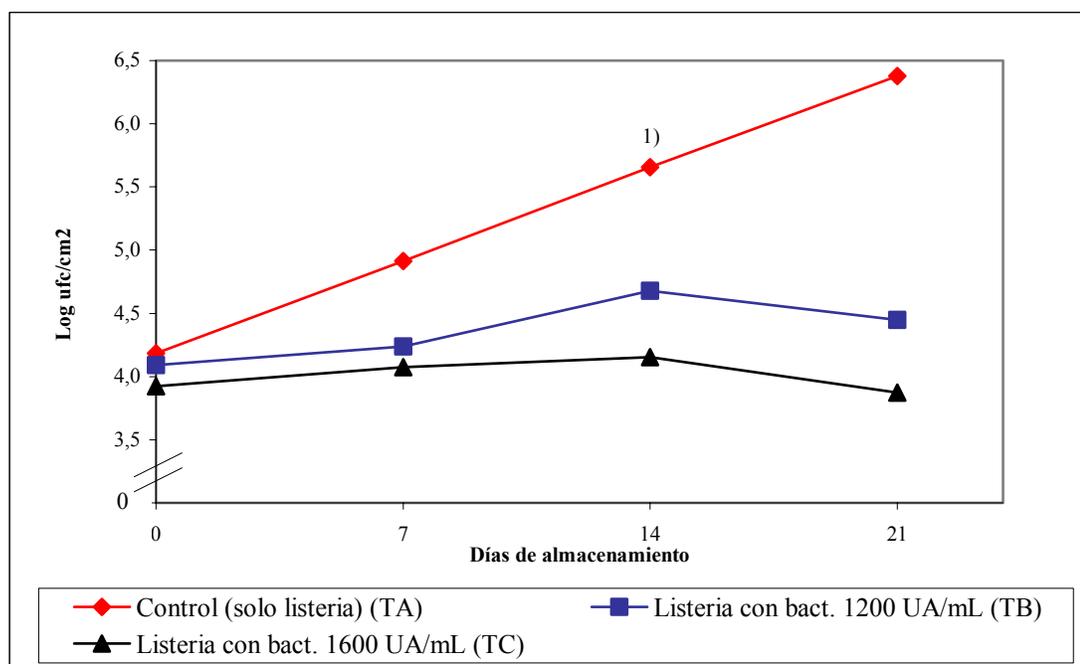
	<b>Tratamiento A (Control con listeria, sin bacteriocina)</b>	<b>Tratamiento B (listeria + Bact. 1.200 UA/mL)</b>	<b>Tratamiento C (listeria + Bact. 1.600 UA/mL)</b>
<b>Día 0</b>	4,18 <sup>1</sup> a <sup>2</sup> a <sup>3</sup>	4,09 a a	3,92 a a
<b>Día 7</b>	4,91 a ab	4,24 a a	4,07 a a
<b>Día 14</b>	5,65 a bc	4,68 b a	4,15 c a
<b>Día 21</b>	6,38 b c	4,45 a a	3,87 a a

<sup>1</sup> Valor corresponde al promedio de tres determinaciones

<sup>2</sup> Las letras minúsculas distintas indican diferencia significativa entre filas.

<sup>3</sup> Las letras color rojo distintas indican diferencia significativa entre columnas.

14, desde un valor inicial de  $4,1 \pm 0,4$  ufc/cm<sup>2</sup>, para finalmente disminuir a  $4,5 \pm 0,1$  ufc/cm<sup>2</sup> el día 21, variación que no fue estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Finalmente el tratamiento C tampoco se observó variación significativa ( $p > 0,05$ ) aunque tuvo un escaso aumento de 0,3 ciclos para luego volver a recuentos levemente inferiores a los iniciales ( $\log 3,9 \pm 0,1$  ufc/cm<sup>2</sup>).



<sup>1)</sup> Valores corresponden al promedio de tres determinaciones.

**FIGURA 10** Recuento de *L. monocytogenes* (log ufc/cm<sup>2</sup>) en trozos de trucha ahumada y envasada al vacío durante 21 días a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## 5. DISCUSION DE RESULTADOS

Las BAL tienen un largo historial de seguridad en alimentos por su capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias indeseables a través de la producción ácido, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas, de tal manera que son capaces de prolongar la vida útil e inhibir el desarrollo de bacterias patógenas (REQUENA y PELAEZ, 1995). Las bacteriocinas son capaces de controlar el desarrollo de bacterias Gram positivas y generalmente especies relacionadas taxonómicamente (JACK *et al.*, 1995).

En el presente trabajo se estudió el efecto, que tenía sobre la calidad de la trucha ahumada, envasada al vacío y refrigerada a  $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , la aplicación de un compuesto de tipo bacteriocina activo en contra de *L. monocytogenes*. Se diseñó un sistema de aplicación por aspersión para la bacteriocina, cuyos principales parámetros de funcionamiento fueron establecidos y estandarizados, teniendo en cuenta que pudiese ser utilizado en una planta procesadora de salmones. La aplicación se llevó a cabo antes del proceso de ahumado para que la bacteriocina fuese absorbida durante el proceso de ahumado; considerando además que, la cantidad de líquido inoculada fuese baja ( $65 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ ). El sistema de aplicación planteado en este trabajo cumple los requerimientos de una utilización a nivel de laboratorio. Para los requerimientos de una aplicación industrial se debe pensar en la utilización de varios aspersores en una cinta transportadora por donde pasaran los filetes, a fin de aplicar la bacteriocina en un proceso continuo. Este sistema para aplicación industrial debe mantener los parámetros ya fijados a fin de obtener resultados similares.

En la literatura existe escasa información sobre la utilización de bacteriocinas en productos alimenticios. MARUGG *et al.* (1992), inhibieron *L. monocytogenes* en carne refrigerada, reduciendo sus recuentos entre 1 y 2,5 ciclos logarítmicos. DUFFES *et al.* (1999), aplicaron con éxito bacterias productoras de bacteriocinas y sus respectivas

bacteriocinas en salmón ahumado. EINARSSON y LAUZON (1995), inocularon camarón en salmuera con bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos.

El primero de los experimentos realizados en este trabajo correspondió a la evaluación de la variación de las características de calidad de la trucha ahumada como consecuencia de la utilización de una bacteriocina producida por *C. piscicola* L103. Para este ensayo se utilizó un control sin inoculación, es decir, el producto tal como se elabora normalmente; y además se aplicaron dos actividades de bacteriocina (3.200 y 1.600 AU/mL) y un control de inoculación en el cual el volumen utilizado de solución de bacteriocina fue reemplazado por buffer fosfato. Con estos tratamientos se buscaba establecer si existía algún efecto sobre las características de calidad, relacionado con la utilización de la bacteriocina y sus actividades aplicadas. El control con buffer fosfato permitiría establecer un posible efecto producto del volumen de líquido aplicado.

La presencia de bacteriocina no influyó sobre los recuentos de bacterias psicrótrofas al agregar bacteriocina a la trucha ahumada. EINARSSON y LAUZON (1995), aplicaron carnocina U149, producida por *C. piscicola* U149, en camarón en salmuera, almacenado a  $4,5 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ , y encontraron que los recuentos de bacterias psicrótrofas no registraron variación al ser comparados con un control sin inoculación. Los autores si encontraron diferencia en el producto inoculado con nisina Z y bavaracina A, en cuyos casos se llegó a recuentos algo inferiores, pero después de 59 y 16 días de almacenamiento, respectivamente. Esto último encuentra su explicación en el amplio rango de acción que muestra la nisina en contra de bacterias gram positivas, el cual varía considerablemente de una bacteriocina a otra (TAGG **et al.**, 1976; JACK **et al.**, 1996). Además EINARSSON y LAUZON (1995), compararon la vida útil del camarón en presencia de las tres bacteriocinas mencionadas, incluyendo además benzoato y un control sin adición de ningún compuesto preservante. La vida útil con carnocina U149 fue similar a la del control, es decir no se logró un efecto preservante, mientras que con nisina Z se llegó a 31 días, con bavaracina A 16 días y con benzoato la vida de guarda del camarón en salmuera se consiguió extender hasta los 59 días.

En cuanto al desarrollo de bacterias ácido lácticas (BAL) no hubo una diferencia entre el control y los dos tratamientos con bacteriocinas, pero si en el caso del control

con buffer fostato, donde los niveles fueron significativamente más altos a partir del día 14. Esto coincide con un aumento en los valores de pH para este tratamiento. En general los resultados permiten concluir que la bacteriocina de *C. piscicola* L103 no tuvo un efecto inhibitor sobre la flora láctica presente en la trucha, lo que es confirmado por BORQUEZ (2000), quien aplicó la misma bacteriocina con actividades de 200 y 800 UA/mL (inóculo inicial), en salmón fresco y envasado al vacío, durante un período de 15 días a  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Sus resultados mostraron la misma tendencia, un crecimiento relativamente lento de las BAL al principio, seguido de un fuerte aumento para finalmente volver a disminuir su velocidad de desarrollo. SCHÖBITZ **et al.** (1999), inocularon bacteriocina de *C. piscicola* L103 en carne de vacuno envasa al vacío almacenado por 21 días a  $4^{\circ}\text{C}$ , y obtuvieron un rápido crecimiento de la flora láctica durante la primera semana para luego alcanzar un nivel máximo de  $\log 8,0 \text{ ufc/cm}^2$ , que se mantuvo hasta el final del estudio. En ese trabajo tampoco se observó un efecto inhibitor de las bacteriocinas sobre las BAL naturales de la carne. Por otra parte EINARSSON y LAUZON (1995), en camarón en salmuera, muestran que la carnocina U149 sólo inhibió escasamente las BAL. Las BAL llegan a convertirse en la flora dominante en los productos envasados al vacío incluyendo carne y salmón ahumado, lo cual es necesario para una adecuada conservación, por lo tanto no es deseable que la bacteriocina provoque su inhibición (SCHILLINGER y LÜCKE, 1991; GARCIA **et al.**, 1995). LEROI **et al.** (1998), encontraron que luego de 35 días a  $8^{\circ}\text{C}$ , estas bacterias fueron la microflora dominante en salmón ahumado.

Los valores de pH fluctuaron escasamente durante los 21 días para cada tratamiento, manteniéndose cada uno en valores muy cercanos a los iniciales que fluctuaron alrededor de 6,2, sin que se registren variaciones significativas. Tampoco existieron diferencias entre tratamientos durante el experimento. LEROI y JOFFRAUD (2000), explican que la aplicación de sal y humo producen una disminución en los valores de pH en el salmón ahumado en frío, y que estos valores se mantienen muy similares durante el almacenamiento al vacío, incluso después de 6 semanas. En un estudio previo LEROI **et al.** (1998), obtuvieron una variación de 6,0 a 6,3 en los valores de pH en salmón ahumado, luego de 35 días a  $8^{\circ}\text{C}$ . BORQUEZ (2000), tampoco

encontró un efecto sobre el pH que se pueda relacionar a la aplicación de bacteriocina en salmón fresco envasado al vacío.

Existe escasa información sobre el efecto de la aplicación de una bacteriocina en los valores de nitrógeno básico volátil total (NBVT) en productos marinos, que permitan comparar los resultados aquí obtenidos, los cuales establecen que no se encontró una diferencia significativa al aplicar la bacteriocina. DELGADO (2001), que evalúa el efecto de la bacteriocina de *C. piscicola* L103 con 800 y 1.600 UA/mL, sobre salmón fresco almacenado a  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  no se encontraron diferencias en los valores de NBVT debido a la inoculación con la bacteriocina. La medición de NBVT es frecuentemente utilizada para estimar la calidad de pescado. Su evaluación involucra la determinación de compuestos como trimetilamina, dimetilamina y amoníaco. Altos niveles de esos compuestos se asocia con la presencia de olores y sabores típicamente asociados al pescado en estado de deterioro (Gram et al., citados por LEROI y JOFFRAUD, 2000).

Los nueve panelistas seleccionados no lograron detectar diferencia significativa entre el control y los restantes tratamientos ( $p > 0,05$ ). Para esa prueba se les presentó un control ciego el cual correspondía al propio tratamiento sin inoculación, esto para eliminar un efecto placebo. DUFFES **et al.** (1998), no detectaron ningún daño en salmón ahumado al aplicar de cepas lácticas productoras de bacteriocina, demostrado por un panel sensorial de jueces a través de pruebas de olor. Menos claro son los resultados obtenidos por EINARSSON y LAUZON (1995), para camarón en salmuera, quienes valoraron la magnitud de daño y la aceptabilidad del producto con la aplicación de bacteriocinas. Esos investigadores concluyen que la evaluación sensorial tuvo una buena correlación con el comportamiento de la calidad microbiológica, es decir, la nisina Z logró extender la vida útil del camarón en salmuera, mientras carnocina U149 no produjo un cambio con respecto al control.

Al observar los resultados de los análisis microbiológicos, físicos, químicos y organolépticos, se puede afirmar, que no hubo ningún efecto sobre la calidad de la trucha ahumada en frío, producto de la aplicación de la bacteriocina de *C. piscicola* L103 durante 21 días de almacenamiento a  $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

En el experimento de coinoculación de *Listeria* y bacteriocina en trucha ahumada se buscó comprobar que la bacteriocina, en las condiciones de aplicación, efectivamente era capaz de inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes*. Al producto elaborado en las mismas condiciones que en el caso anterior se le inoculó *Listeria* y la bacteriocina en dos concentraciones, 1.600 y 1.200 UA/mL. Cabe destacar que en este segundo experimento la inoculación de *Listeria* y bacteriocina se hizo sobre filetes de trucha previamente ahumados, a diferencia de lo que realizó en el primero, donde la bacteriocina se aplicó en los filetes antes del ahumado.

Por otra parte, este estudio permitió establecer que la bacteriocina producida por *C. piscicola* L103 tuvo un efecto bacteriostático sobre *Listeria* al ser aplicado en trucha ahumada, efecto que parece ser independiente de la actividad de bacteriocina, en el rango utilizado en el estudio. Tal conclusión es compartida por BORQUEZ (2000) y DELGADO (2001), quienes también aplican una bacteriocina de *C. piscicola* L103. Otro estudio que emplea la misma bacteriocina es el realizado por SCHÖBITZ **et al.** (1999), en este caso la bacteriocina se utilizó purificada resultando en una acción bactericida sobre *Listeria* en carne de vacuno. EINRSSON y LASON (1995), aplican nisina Z y carnocina UI49 en forma purificada y sin purificar en camarones en salmuera, no obtuvieron diferencia en la conservación de este producto entre las bacteriocinas purificadas y crudas.

NIELSEN **et al.** (1990), por otro lado encuentran que la bacteriocina producida por *Pediococcus acidolactici* tenía un efecto bactericida sobre *L. monocytogenes* en carne a 5°C y con dependencia tanto de la actividad de bacteriocina como del número de *Listeria* presente en el alimento, siendo más efectiva cuanto más alta era la actividad de bacteriocina utilizada y más baja la de bacteria.

Si bien originalmente se afirmaba que las bacteriocinas tenían un modo de acción bactericida (TAGG, 1976), son muchos los estudios donde se produjo un efecto bacteriostático. Schlyter, citado por MEDINA **et al.** (1992), observó una reducción cercana a un ciclo logarítmico en relación a los recuentos iniciales en carne de pavo y una disminución de 3 ciclos logarítmicos en comparación con el control después de 7 días a 4°C. Estos resultados contrastan con los efectos bactericidas obtenidos en estudios

de inhibición realizados en caldo de cultivo, como MESSI **et al.** (2001), quienes lograron una inhibición de casi 4 ciclos en *L. monocytogenes* NCC 10890 en 120 min seguida a la aplicación de plantaricina 35d, al igual que GONZALEZ **et al.** (1994), autores que observaron el mismo efecto bactericida.

DUFFES **et al.** (1999), compararon el efecto sobre *Listeria*, en co-cultivo con cepas productoras de bacteriocina versus la utilización de su bacteriocina. Estos autores muestran el efecto de *C. piscicola* V1 y su bacteriocina a 4 y 8°C durante 21 días, en salmón ahumado en frío. Al inocular sobre salmón el sobrenadante con bacteriocina, obtuvieron sólo un retardo en el crecimiento de *Listeria* a 8°C y una fuerte inhibición a 4°C. Lo contrario ocurrió al inocular la bacteria productora, cuyo efecto fue mayor a 8°C que a 4°C. Esto se explica debido a que a 4°C el crecimiento de la cepa productora es menor, y por ende también lo es su producción de bacteriocina. Además este efecto lo atribuyen a la presencia de enzimas proteolíticas propias del pescado, las cuales son más activas a 8°C que a 4°C.

Otra tendencia observada fue un menor recuento de *Listeria* el día 21 en comparación con los del día 14, si bien este descenso no fue significativo para los filetes inoculados con 1.200 UA/mL, fue la constante en ambos tratamientos con bacteriocina. Esto podría deberse a los altos niveles de BAL presente, apoyado en los resultados del experimento anterior. Las BAL podrían producir inhibición por producción de ácidos y otros compuestos antimicrobianos incluyendo otras bacteriocinas potenciando la actividad de la bacteriocina inoculada (MEDINA, **et al.** 1992; REQUENA y PELAEZ, 1995).

Autores como MULET **et al.** (1998), dan directrices respecto de aplicaciones de bacteriocina en alimentos, estos comparan la acción de varios pares de bacteriocinas, que incluyen pediocina AcH, nisina y lactacina F, consiguiendo efectos sinérgicos y antagónicos para algunas combinaciones en contra de *L. monocytogenes*. Esto lleva a pensar en la posibilidad de una aplicación combinada de bacteriocinas a fin de potenciar la acción antilisterial. Nisina, por ejemplo, por su amplio espectro inhibitorio es capaz de aumentar la vida útil en algunos productos marinos (EINARSSON y LAUZON, 1995). La utilización de una combinación de dos o más bacteriocinas permite, además, evitar

perder efectividad por la aparición de poblaciones resistentes a una de ellas (TAGG **et al.**, 1976). NIELSEN **et al.** (1990) estudiaron la capacidad de *Listeria* para adherirse a la superficie de carne previamente inoculada con bacteriocina y la compararon con el desarrollo de la bacteria al realizar la contaminación antes de aplicar la bacteriocina, siendo en el primer caso más efectiva. Por otra parte estudios sobre comportamiento y fuentes de *Listeria* en plantas procesadoras de salmónes, hacen hincapié en la importancia de evitar el ingreso de la bacteria a las instalaciones y la dificultad de su erradicación una vez que la contaminación se produce (ASSANTA **et al.**, 1990; GUYER y JEMMI, 1991; AUTIO **et al.**, 1999; RØRVIK **et al.**, 2000).

## 6. CONCLUSIONES

- La estandarización de los parámetros para la aplicación de la bacteriocina mediante un sistema de aspersión se fijaron en 20 psi de presión, por 2 seg, a una distancia de 30 a 35 cm, con un diámetro de 8 cm, lo que dio como resultado un volumen de 65  $\mu\text{L}$  de bacteriocina por  $\text{cm}^2$  a una presión y tiempo definidos.
- La presencia de la bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* L103 no influyó sobre el crecimiento de las bacterias que crecen en forma natural en la trucha ahumada envasada al vacío y almacenada a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ , como son las bacterias psicrótrofas y ácido lácticas.
- Los resultados del análisis de nitrógeno básico volátil total y determinación de pH indicaron que la inoculación de trucha ahumada con bacteriocina, no afectó estos parámetros de manera significativa.
- No se observó diferencias entre los filetes de trucha ahumada como resultado de la aplicación de bacteriocina de *C. piscicola* L103, al ser comparados con una muestra de referencia sin inocular.
- La presencia de bacteriocina en dos niveles de actividad no afectó los parámetros de conservación estudiados para la trucha ahumada.
- La bacteriocina presentó un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante los 21 días de almacenamiento a  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ , el que fue independiente de las unidades de actividad de la bacteriocina aplicada.

## 7. RESUMEN

Este trabajo estudió el efecto de una sustancia de tipo bacteriocina, producida por *Carnobacterium piscicola* L103, parcialmente purificada, sobre la conservación de filetes de trucha ahumada, almacenada durante 21 días a 2°C. El estudio se realizó a través de análisis microbiológicos, incluyendo recuento de bacterias psicrótrofas y ácido lácticas, determinaciones de pH y nitrógeno básico volátil total (NBVT) y la evaluación sensorial. Se aplicaron dos actividades de bacteriocina, 1.600 y 3.200 UA/mL, un control sin inoculación y un control con buffer fosfato. Para la inoculación de la bacteriocina se estandarizó un sistema de aplicación por aspersión, que fue fijado en 20 psi de presión de aire, a una distancia de 30 cm, obteniéndose un diámetro de aplicación de 8 cm, durante un tiempo de 2 seg, aplicándose un volumen de 65  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . En un segundo experimento la bacteriocina fue inoculada en los filetes junto con *Listeria monocytogenes* Lm82, cepa sensible a la bacteriocina, almacenándose por 21 días a 2°C. Se inocularon 1.200 y 1.600 UA/mL, y un control que sólo contenía *Listeria*

Los resultados de los recuentos microbiológicos indicaron que la bacteriocina no influyó sobre el comportamiento de las bacterias psicrótrofas y ácido lácticas naturales de la trucha durante los 21 días del experimento, al no observarse diferencias significativas con el control sin inoculación. Los valores de pH y NBVT tampoco se vieron afectados por la inoculación de bacteriocina. El mismo comportamiento se observó en las características organolépticas de la trucha ahumada, donde los panelistas no detectaron diferencias en relación a un control sin inoculación. Se concluye que la inoculación de bacteriocina de *C. piscicola* L103 no influyó sobre el estado de conservación de los filetes de trucha ahumada y por lo tanto no afectó su vida útil.

Los resultados del experimento de inoculación con *Listeria* mostraron que en el control aumentó los recuentos de *Listeria* en 2,2 ciclos logarítmicos. El tratamiento con 1.200 UA/mL registró un leve aumento el día 14, para luego volver a los valores iniciales. Los recuentos del tratamiento con 1.600 AU/mL se mantuvieron sin variación. Se concluye que la bacteriocina presentó un efecto bacteriostático sobre la *Listeria*, comportamiento que fue independiente de la actividad de bacteriocina utilizada.

## SUMMARY

This work to study the effect of a partially purified bacteriocin-like substance, produced by *Carnobacterium piscicola* L103, on the quality of smoked trout fillets, stored during 21 days at 2°C. The study was carried out through microbiological analysis, that included psychrotrophic bacteria counts of and lactic acid bacteria, pH measurement and total volatile basic nitrogen (NBVT) determination, as well as sensory evaluation of the smoked trout. Two bacteriocin activities, 1.600 and 3.200 UA/mL were applied, also a control without inoculum and a control with phosphate buffer were included. For the inoculation an application system was standardized for aspersion of the bacteriocin. The parameters were fixed in 20 psi of air pressure, a distance of application of 30 cm, obtaining a diameter of application of 8 cm, during a time of 2 seg, being applied this way a volume of 65  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . In a second experiment the semipurified bacteriocin was inoculated in the trout fillets together with *Listeria monocytogenes* Lm82, sensitive strain to the bacteriocin, and stored during 21 days at  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ . 1.200 and 1.600 UA/mL were inoculated, and a control with *Listeria* alone was included.

The results of the microbiological counts indicated that the present of the bacteriocin did not influence the growth of the natural psychrotrophic and lactic acid bacteria of the trout during the 21 days of the experiment. No significant differences were observed among treatment and the control without inoculation. The pH and NBVT neither were affected by the bacteriocin inoculation. The same behaviour was observed in the organoleptic characteristics of the smoked trout. It is concluded that the inoculation with bacteriocina of *C. piscicola* L103 did not produce noticeable changes on the state of conservation smoked trout and therefore did not affect the shelf life.

The results of the inoculation experiment with *Listeria* showed that in the control, counts of *Listeria* increased in 2,2 logarithmic cycles. The treatment with 1.200 UA/mL registered a light increase the day 14, and then dropped to the initial values, The counts of the treatment with 1.600 AU/mL stayed without variation throughout the 21 days. It was concluded that the bacteriocin presented a bacteriostatic effect on *Listeria*, behaviour that was independent of the activity used bacteriocin.

**BIBLIOGRAFIA**

- ABEE, T., KROCKEL, L. y HILL, C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Food Microbiol.* 28: 162-185.
- AHAMAD, N., y MARTH, E. 1990. Acid-injury of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 53:26-29.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1992. Standard methods for the examination for dairy products. 16<sup>a</sup> Edición. Editorial R.T. Marshall. Washington D.C., American Public Health Association. 546 pp.
- AUTIO, T., HIELM, S., MIETTINEN, M., SJÖBERG, A., AARNISALO, K., BJÖRKROTH, J., MATTILA-SANDHOLM, T. y KORKEALA, H. 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(1):150-155.
- ASSANTA, A., ROY, D., GOULET, J. y MAGNY, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and surfaces after short contact times. *J. Food Prot.* 53(9):742-746.
- AYMERICH, M., HUGAS, M. y MONFORT, J. 1998. Review: bacteriocigenic lactic acid bacteria associated with meat products. *Food Science and Technol. Int.* 4:141-158.
- BOERLIN, P., BOERLIN, F., BANNERMAN, E., BILLE, J. y JEMMI, T. 1997. Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human listeriosis cases. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(4):1338-1343.
- BORQUEZ, P. 2000. Producción continua y purificación parcial de la bacteriocina producida de *Carnobacterium piscicola* L103 utilizando un fermentador modular. Tesis de Grado. Escuela de Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile.
- BRUNO, M. y MONTVILLE, T. 1993. Common mechanistic actino of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(9):3003-3010.
- BUCHANAN, R. y KLAWITTER, L. 1992. Characterization of lactic acid bacterium, *Carnobacterium piscicola* LK5, with activity against *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Food Safety* 12:199-217.

- (CDC) CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2000. Multistate outbreak of listeriosis – United States, 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 49:1129-1130.
- CHILE, FUNDACION CHILE, 2001. Balance de la acuicultura del año 2000: se consolida el crecimiento. *Aquanoticias* 7(65):6-18.
- CHILE, SERVICIO NACIONAL DE PESCA (SERNAPESCA). 2000. PROGRAMA DE LABORATORIOS. Norma Técnica Sección 2: Métodos de Análisis Químico para Productos Pesqueros de Exportación. Santiago, Chile.
- COLLINS, M., FARROW, A., PHILLIPS, B., FERUSI, S. y JONES, D. 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37(4):310-316.
- CONNEL, J. y SHEWAN, J. 1980. Past, present and future of fish science. En: *Advances in fish science and technology*. Fishing News Book Ltd, Surrey, England. p. 56-65.
- COVENTRY, M., GORDON, J., ALEXANDER, M., HICKEY, M y WAN, J. 1996. A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocin of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5):1764-1769.
- DELGADO, R. 2001. Efecto de una bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* parcialmente purificada sobre salmón fresco refrigerado. Tesis de Grado. Escuela de Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile.
- DILLON, R. y PATEL, T. 1992. Listeria in seafood: a review. *J. Food Prot.* 55(12):1009-1015.
- DUFFES, F., CORRE, C., LEROI, F., DOUSSET, X. y BOYAVAL, P. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium spp.* on vacuum-packed cold-smoked salmon. *J. Food Prot.* 62(12):1394-1403.
- EIJSSINK, V., SKEIE, M., MIDDELHOVEN, P., BRURBERG, M. y NES, I. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9):3275-3281.
- EINARSSON, H., y LAUZON, H. 1995. Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(2):669-676.

- ENNAHAR, S., SASHIHARA, T., SONOMOTO, K. y ISHIZAKI, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:85-106.
- ERICSSON, H. 1997. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by Rainbow Trout. *J. Clinical Microbiol.* 35(11): 2904–2907.
- FARBER, J. 1992. Current research on *Listeria monocytogenes* in food: an overview. *J. Food Prot.* 56(7):640-643.
- FARBER, J. y PETERKIN, P. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55(3):476-511.
- FIELDS, F. 1996. Use of bacteriocins in food: regulatory considerations. *J. Food Prot. (Suppl.):*72-77.
- FUCHS, R. 1999. *Listeria monocytogenes* – a new microbiological hazard in seafood? En: *Aquaculture and biotechnology*. Science Publishers, Inc. Plymouth, UK. Pp.13-32.
- GARCIA, T.; MARTIN, R.; SANZ, B. y HERNANDEZ, P. 1995. Extensión de la vida útil de la carne fresca. I: envasado en atmósferas modificadas y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. *Revista española de Ciencia y Tecnología de los alimentos.* 35(1):1-18.
- GESCHE, E. y FERRER, J. 1995. Detección de *Listeria monocytogenes* en agua de mar y pescado proveniente de áreas de recolección de productos marinos. *Alimentos* 20(3,4):87-92.
- GONZALEZ, B., ARCA, P., MAYO, B. y SUAREZ, J. 1994. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2158-2163.
- GUYER, S. y JEMMI, T. 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(5):1523-1527.
- HEBARD, CH., FLICK, G., y MARTIN, R. 1982. Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. En: *Chemistry and biochemistry of marine food products*. Avi Publishing Company, Inc. Westport, USA. Pp. 149-304
- HITCHINS, A. 1992. *Listeria monocytogenes*. En: *Bacteriological Analytical Manual*. Food and Drug Administration. 7ª Edición. AOAC International. Arlington, U.S.A. pp. 141 - 152.

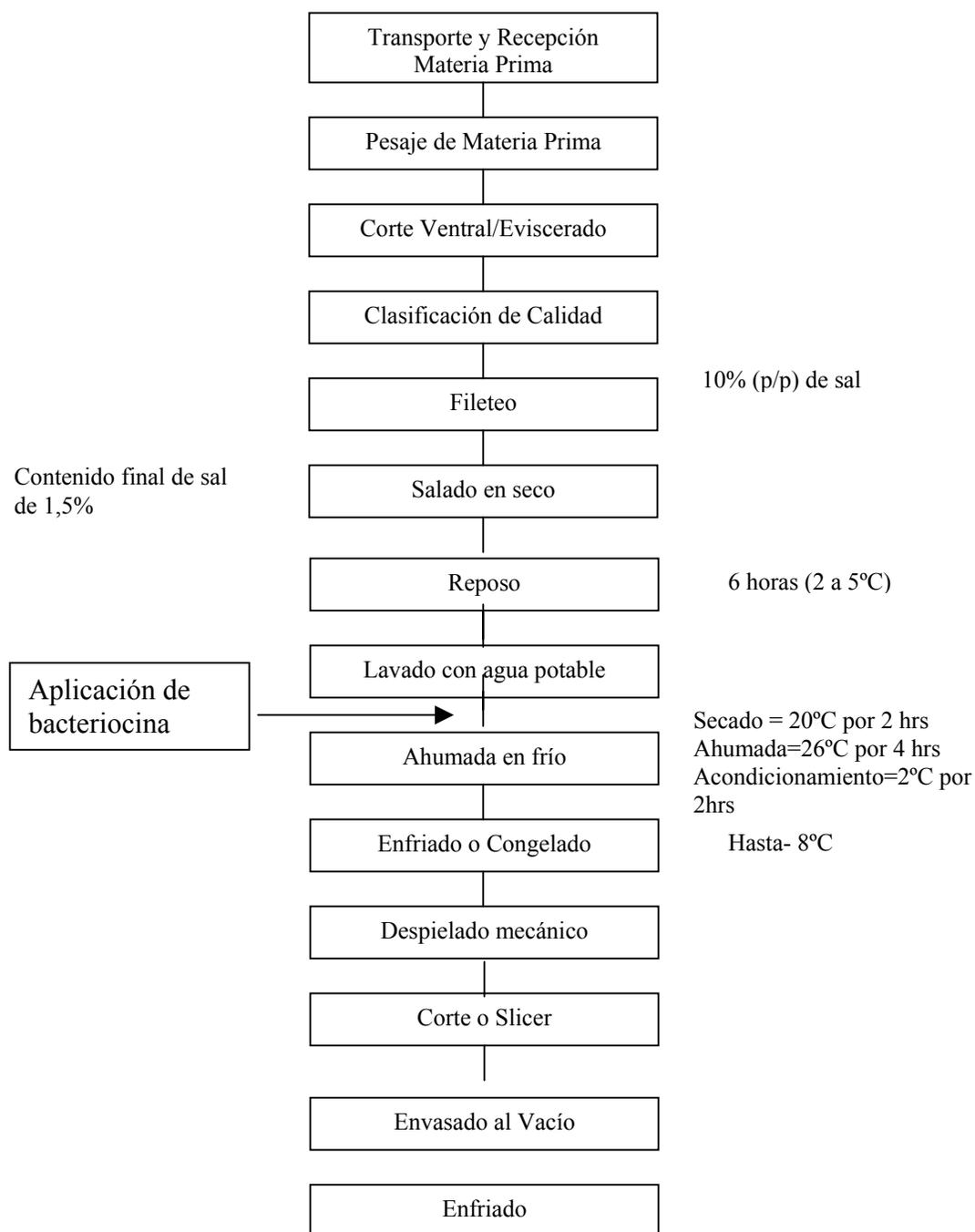
- HUSS, H. 1998. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 202 p.
- JACK, R., TAGG, J. y RAY, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev.* 52(2):171-200.
- JACK, R. 1996. Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin Produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8): 2897–2903.
- JAY, J. 1992. Alimentos fermentados. En: *Microbiología moderna de los alimentos*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp. 441-448.
- JEMMI, T. 1993. *Listeria monocytogenes* in smoked fish. *Arch. Leb. Hyg.* 44:10-13.
- KLAENHAMMER, T. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie.* 70:337-349.
- LARPENT, J. 1994. Las bacterias lácticas. En: *Microbiología Alimentaria*. Vol II: Fermentaciones alimentarias. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- LEROI, F. y JOFFRAUD, J. 2000. Salt and smoke simultaneously affect chemical and sensory quality of cold-smoked salmon during 5°C storage predicted using factorial design. *J. Food Prot.* 63(9):1222-1227.
- LEROI, F., JOFFRAUD, J., CHEVALIER, F. y CARDINAL, M. 1998. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *Int. J. Food Microbiol.* 39:111-121.
- MAFU, A., ROY, D., GOULET, J. y MAGNY, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* o stainless steel, glass, polypropylene, an rubber surfaces after short contact times. *J. Food Prot.* 53(9):724-746.
- MARUGG, J., GONZALEZ, C., KUNKA, B., LEDEBOER, A., PUCCI, M., TOONEN, M., WALKEN, S., ZOETMULDER, L., y VANDERBERGH, P. 1992. Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin form *pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2360-2367.
- McMULLEN, L. y STILES, M. 1996. Potencial for use of bacteriocin-producing lactic Acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot. (Supl.):*64-79.
- MEDINA, M., GAYA, P. y NUÑEZ, M. 1992. Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. *Revista española de Lechería* 12(2):28-32.

- MESSI, P., BONDI, C., BATTINI, R. y MANICARDI. 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Int. J. Food Microbiol.* 64:193-198.
- MESSINA, M., AHMAD, H., MARCHELLO, J., GERBA, C., y PAQUETTE, M. 1988. The effect of liquid smoke on *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 51(8):629-631, 638.
- MÖHLER, K. 1980. El ahumado. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 74 p.
- MOIR, C. y EYLES M. 1992. Inhibition, injury, and inactivation of four psychrotrophic foodborne bacteria by the preservatives methyl p-hydroxybenzoate and potassium sorbate. *J. Food Prot.* 55(5):360-366.
- MONTVILLE, T y CHEN, Y. 1998. Mechanistic action of pediocin an nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnology.* 50:511-519.
- MULET, N., LACOSTE. A., VIÑAS. M. y BUOCHBERG. S. 1998. Interactions between pairs of bacteriocins from lactid bacteria. *J. Food Protec.* 61(9):1210-1212.
- MURIANA, P. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J. Food Protec.* (Suppl.):54-63.
- NIELSEN, J., DICKSON, J. y CROUSE, J. 1990. Use of the bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2142-2145.
- NILSSON, L., GRAM, L. y HUSS, H. 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *J. Food Prot.* 62 (4):336-342.
- PELROY, G., PETERSON, M., PARANJPYE, R., ALMOND, J. y EKLUND, M. 1994. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-process (smoked) salmon by sodium nitrite and packaging method. *J. Food Prot.* 57(2):114-119.
- PILET, M., DOUSSET, X., BARRE, R., NOVEL, G., DESMAZEAUD, M. y PIARD, J. 1995. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish active against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 58 (3):256-262.
- REQUENA, T. y PELAEZ, C. 1995. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista española de ciencia y tecnología de los Alimentos.* 35(1):19-44.

- RØRVIK, L.; AASE, B.; ALVESTAD, T. y CAUGANT, D. 2000. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in seafoods and seafood-processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(11):4779-4784.
- SCHILLINGER, U. y LÜCKE, F. 1991. El empleo de bacterias láctica como cultivos Protores en productos cárnicos. *Fleischwirtsch (español)*. :35-40.
- SCHLESINGER, G. 1993. Estudio de la perecibilidad de salmón fresco envasado al vacío. *Alimentos* 18(2):24-32.
- SCHÖBITZ, R., ZAROR, T., LEÓN, O. y COSTA, M.. 1999. A bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* for the control of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged meat. *Food Microbiol.* 16:249-255.
- STOFFELS, G., SAHL, H. y GUDMUNSDOTTIR, A. 1993. Carnocin U149, a potencial 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.
- TAGG, J., DAJANI, A. y WANNAMAKER, L. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40(2):722-756.
- THURETTE, J., MEMBRE, J., CHING, L., TAILLIEZ, R., Y CATTERAU, M. 1998. Behavior of *Listeria* spp. in smoked fish products affected by liquid smoked, NaCl concentration, and temperature. *J. Food Prot.* 61(11):1475-1479.
- VAZ-VELHO, M., DUARTE, G., y GIBBS, P. 1998. Note. Occurrence of *Listeria* spp. in trout (*Onchorhynchus mykiss*) and salmon (*Salmo salar*). *Food Sci. Tech. Int.* 4(2):121-125.
- VILLALOBOS, K. 2000. *Listeria monocytogenes* en productos pesqueros elaborados y su relación con indicadores bacterianos. Tesis de grado. Escuela de Pedagogía. Facultad de Filosofía y Humanidades. Universidad Austral de Chile.
- WESSELS, S. y HUSS, H. 1996. Suitability of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 as a Protive culture for lightly preserved fish products. *Food Microbiol.* 13:323-332.
- YANG, R., JOHNSON, C. y RAY, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(10):3355-3359.

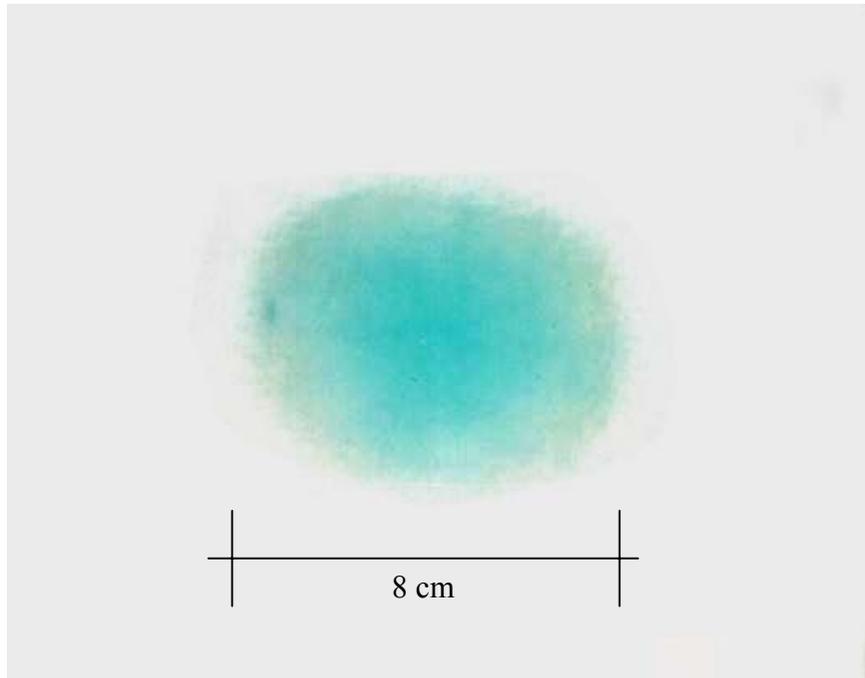
**ANEXOS**

**ANEXO 1: Diagrama de flujo de trucha ahumada en frío (Cultivos Marinos Chiloé Ltda.).**



**ANEXO 2: Estandarización de los parámetros para la aplicación de la bacteriocina.**

**ANEXO 2.1: Area de aspersión obtenida por la pistola atomizadora a una distancia de 30 cm, con una presión de 20 psi.**



**ANEXO 2.2: Tabla con valores de diámetros de aplicación con la pistola atomizadora con varios niveles de abertura de la tobera.**

Presión (psi)	Abertura de boquilla	Diámetros Medido (cm)			Diámetro Promedio (cm)
25	0,5	7,3	7,3	7,1	7,2
	1	7,6	7,5	7,5	7,5
	1,5	7,8	7,8	7,7	7,8
	2	8,5	8,4	8,3	8,4
	2,5	9,6	9,2	9,4	9,4
	3	10,1	10,3	10,3	10,2
	3,5	12,1	12,2	12,4	12,2
20	0,5	7,7	7,7	7,5	7,6
	1	8,0	8,1	7,9	8,0
	1,5	8,2	8,2	8,5	8,3
	2	8,9	9,0	8,7	8,9
	2,5	10,1	9,8	9,8	9,9
	3	10,5	10,9	10,7	10,7
	3,5	12,5	13,0	12,8	12,8

**ANEXO 2.3: Mediciones del volumen de líquido atomizado (mL) en 2 seg, con el sistema de aspersion con los parámetros de aplicación estandarizados.**

Volumen (mL)			
6,8	6,8	6,8	6,1
6,6	6,4	6,8	6,8
6,3	6,2	6,5	6,7
6,2	6,8	6,3	6,3
6,5	6,2	6,7	6,5
6,6	6,4	6,7	6,9
6,2	6,4	6,5	6,4
6,7	6,5	6,4	6,7
6,3	6,0	6,4	6,7
6,5	6,8	6,6	6,9
6,6	6,1	6,4	6,1
6,8	6,0		
<b>Promedio 6,5 ± 0,3 mL</b>			

Los 6,5 mL de líquido fueron aplicados sobre un área de 100 cm<sup>2</sup>, por lo tanto equivalen a: 65 µL/cm<sup>2</sup>

**ANEXO 3: Test de comparación pareada.**

Nombre: .....

Fecha: .....

A continuación se le presentan 4 muestras de trucha ahumada, las cuales deberán ser comparadas con un control marcado como **R**. Deguste primero la marcada con la letra **R**, luego cada una de las muestras codificadas, evaluando si existe o no diferencia con **R**. Marque en la escala el tamaño la magnitud de dicha diferencia.

--	--	--	--

<b>No hay diferencia = 0</b>	_____	_____	_____	_____
<b>1</b>	_____	_____	_____	_____
<b>2</b>	_____	_____	_____	_____
<b>3</b>	_____	_____	_____	_____
<b>4</b>	_____	_____	_____	_____
<b>5</b>	_____	_____	_____	_____
<b>6</b>	_____	_____	_____	_____
<b>7</b>	_____	_____	_____	_____
<b>8</b>	_____	_____	_____	_____
<b>Extremadamente diferente = 9</b>	_____	_____	_____	_____

La apreciación general de la muestra es que esta es:

<b>Superior a R</b>	_____	_____	_____	_____
<b>Igual a R</b>	_____	_____	_____	_____
<b>Inferior a R</b>	_____	_____	_____	_____

La diferencia se basa en (seleccione una o más opciones, si lo considera pertinente):

<b>Color</b>	_____	_____	_____	_____
<b>Sabor - Olor</b>	_____	_____	_____	_____
<b>Ninguna</b>	_____	_____	_____	_____

**ANEXO 4: Tabla con las dimensiones de los trozos de trucha ahumada en frío utilizados para recuento de *L. monocytogenes*.**

	<b>Tratamiento A</b> (sólo listeria)		<b>Tratamiento B</b> (listeria + bact 1200 UA/mL)		<b>Tratamiento C</b> (listeria + bact 3200 UA/mL)	
	<b>Repetición</b>	<b>Area (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Repetición</b>	<b>Area (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Repetición</b>	<b>Area (cm<sup>2</sup>)</b>
<b>Día 0</b>	TA-1	24,998	TB-1	24,442	TC-1	24,401
	TA-2	24,059	TB-2	26,992	TC-2	24,562
	TA-3	24,450	TB-3	25,351	TC-3	23,533
<b>Día 7</b>	TA-1	24,947	TB-1	25,240	TC-1	21,527
	TA-2	25,500	TB-2	22,511	TC-2	23,471
	TA-3	25,000	TB-3	25,373	TC-3	23,280
<b>Día 14</b>	TA-1	24,304	TB-1	23,620	TC-1	22,881
	TA-2	23,594	TB-2	24,005	TC-2	21,738
	TA-3	23,359	TB-3	22,085	TC-3	23,329
<b>Día 21</b>	TA-1	23,317	TB-1	23,084	TC-1	23,616
	TA-2	22,985	TB-2	21,265	TC-2	23,503
	TA-3	22,848	TB-3	24,032	TC-3	23,587

**ANEXO 5: Bacterias psicrótrofas.****ANEXO 5.1: Recuentos de bacterias psicrótrofas (log ufc/g) para las muestras de trucha ahumada.**

	Tratamiento 1 (Control)			Prom.	Desv estand	Tratamiento 2 (Buffer fofato)			Prom.	Desv estand
Día 0	2,29	2,30	2,47	<b>2,35</b>	0,10	2,87	2,70	3,19	<b>2,92</b>	0,25
Día 7	3,20	3,04	3,52	<b>3,25</b>	0,24	2,18	3,42	2,95	<b>2,85</b>	0,63
Día 14	5,85	5,58	5,96	<b>5,79</b>	0,20	4,63	4,38	4,88	<b>4,63</b>	0,25
Día 21	5,45	5,92	5,65	<b>5,67</b>	0,23		5,45	5,67	<b>5,56</b>	0,15

	Tratamiento 3 (Bact. 1.600 UA/mL)			Prom.	Desv estand	Tratamiento 4 (Bact. 3.200 UA/mL)			Prom.	Desv estand
Día 0	2,47	2,70	2,62	<b>2,60</b>	0,12	2,13	2,78	2,46	<b>2,46</b>	0,33
Día 7	3,15	2,81	3,06	<b>3,01</b>	0,17	2,70	3,11	3,48	<b>3,10</b>	0,39
Día 14	4,06	4,53	3,85	<b>4,15</b>	0,35	4,77	4,58	4,78	<b>4,71</b>	0,11
Día 21	4,42	4,99	4,14	<b>4,52</b>	0,44	6,05	5,31	5,42	<b>5,59</b>	0,40

**ANEXO 5.2: Análisis de varianza para recuento de bacterias psicrótrofas de los cuatro tratamientos.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	Razón F	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	3,12551	3	1,04184	5,39	0,0033
B:DIAS	62,1452	3	20,7151	107,10	0,0000
RESIDUAL	7,73647	40	0,193412		
TOTAL (CORREGIDO)	73,0668	46			

**ANEXO 5.3: Análisis de varianza para recuento de bacterias psicrótrofas en trucha ahumada en frío, por tratamiento.****ANEXO 5.3.1: Trucha sin inocular (control)**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:DIAS	27,0218	3	9,00728	240,57	0,0000
B:REPETICION	0,103017	2	0,0515083	1,38	0,3223
RESIDUAL	0,22465	6	0,0374417		
TOTAL (CORREGIDO)	27,3495	11			

Prueba de rangos múltiples para recuento de bacterias psicrótrofas para trucha sin inocular (control), Tukey HSD 95,0%.

Días	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
0	3	2,35333	X
7	3	3,25333	X
14	3	5,67333	X
21	3	5,79667	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 7	*-0,9	0,545114
0 - 14	*-3,44333	0,545114
0 - 21	*-3,32	0,545114
7 - 14	*-2,54333	0,545114
7 - 21	*-2,42	0,545114
14 - 21	0,123333	0,545114

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

### ANEXO 5.3.2: Trucha con buffer fosfato

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:DIAS	11,9385	3	3,97949	27,29	0,0016
B:REPETICION	0,32765	2	0,163825	1,12	0,3954
RESIDUAL	0,72915	5	0,14583		
TOTAL (CORREGIDO)	14,3248	10			

Prueba de rangos múltiples para recuento de bacterias psicrótrofas para trucha con buffer fosfato, Tukey HSD 95,0%

Días	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
7	3	2,85	X
0	3	2,92	X
14	3	4,63	X
21	2	5,44	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 7	0,07	1,15057
0 - 14	*-1,71	1,15057
0 - 21	*-2,52	1,28637
7 - 14	*-1,78	1,15057
7 - 21	*-2,59	1,28637
14 - 21	-0,81	1,28637

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 5.3.3: Trucha con bacteriocina 1.600 UA/mL**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:DIAS	7,4802	3	2,4934	32,14	0,0004
B:REPETICION	0,241617	2	0,120808	1,56	0,2853
RESIDUAL	0,46545	6	0,077575		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>8,18727</b>	<b>11</b>			

Prueba de rangos múltiples para recuento de bacterias psicrótrofas para trucha con bacteriocina 1.600 UA/mL, Tukey HSD 95,0%

Días	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
0	3	2,59667	X
7	3	3,00667	X
14	3	4,14667	X
21	3	4,51667	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 7	-0,41	0,78464
0 - 14	*-1,55	0,78464
0 - 21	*-1,92	0,78464
7 - 14	*-1,14	0,78464
7 - 21	*-1,51	0,78464
14 - 21	-0,37	0,78464

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 5.3.4: Trucha con bacteriocina 3.200 UA/mL**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:DIAS	18,7067	3	6,23556	45,20	0,0002
B:REPETICION	0,0322167	2	0,0161083	0,12	0,8918
RESIDUAL	0,827783	6	0,137964		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>19,5667</b>	<b>11</b>			

Prueba de rangos múltiples para recuento de bacterias psicrótrofas para trucha con bacteriocina 3.200 UA/mL, Tukey HSD 95,0%.

Días	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
0	2	2,50167	X
7	3	3,09667	X
14	3	4,71	X
21	3	5,59333	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 7	-0,64	1,04639
0 - 14	*-2,25333	1,04639
0 - 21	*-3,13667	1,04639
7 - 14	*-1,61333	1,04639
7 - 21	*-2,49667	1,04639
14 - 21	-0,883333	1,04639

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

#### **ANEXO 5.4: Análisis de varianza para recuento de bacterias psicrótrofas en trucha ahumada en frío, por días de análisis.**

##### **ANEXO 5.4.1: Tiempo cero.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	0,547367	3	0,182456	4,31	0,0607
B:REPETICION	0,128867	2	0,0644333	1,52	0,2919
RESIDUAL	0,253933	6	0,0423222		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>0,930167</b>	<b>11</b>			

##### **ANEXO 5.4.2: Día 7.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	0,256167	3	0,0853889	0,59	0,6415
B:REPETICION	0,407317	2	0,203658	1,42	0,3134
RESIDUAL	0,862483	6	0,143747		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>1,52597</b>	<b>11</b>			

**ANEXO 5.4.3: Día 14.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	4,36636	3	1,45545	19,45	0,0017
B:REPETICION	0,0202667	2	0,0101333	0,14	0,8760
RESIDUAL	0,449067	6	0,0748444		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>4,83569</b>	<b>11</b>			

Prueba de rangos múltiples para recuento de bacterias psicrótrofas para el día 14, Tukey HSD 95,0%

Tratamientos	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
3	3	4,14667	X
2	3	4,63	X
4	3	4,71	X
1	3	5,79667	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	*1,16667	0,770707
1 - 3	*1,65	0,770707
1 - 4	*1,08667	0,770707
2 - 3	0,483333	0,770707
2 - 4	-0,08	0,770707
3 - 4	-0,563333	0,770707

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 5.4.4: Día 21.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	2,65869	3	0,886231	5,97	0,0416
B:REPETICION	0,0873514	2	0,0436757	0,29	0,7572
RESIDUAL	0,742249	5	0,14845		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>3,47927</b>	<b>10</b>			

**ANEXO 6: Bacterias ácido lácticas.****ANEXO 6.1: Recuento de BAL (log ufc/g) para las muestras de trucha ahumada**

	Tratamiento 1 (Control)			Prom.	Desv estand	Tratamiento 2 (Buffer fofato)			Prom.	Desv estand
Día 0	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0		< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0	
Día 7	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0		< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0	
Día 14	3,49	3,38	3,61	<b>3,49</b>	0,12	4,36	4,06	4,83	<b>4,42</b>	0,39
Día 21	3,89	4,18	4,01	<b>4,03</b>	0,15	4,57	4,46	4,70	<b>4,58</b>	0,12

	Tratamiento 3 (Bact. 1.600 UA/mL)			Prom.	Desv estand	Tratamiento 4 (Bact. 3.200 UA/mL)			Prom.	Desv estand
Día 0	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0		< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0	
Día 7	< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0		< 2,0	< 2,0	< 2,0	< 2,0	
Día 14	2,88	3,04	3,06	<b>2,99</b>	0,10	3,81	4,04	3,85	<b>3,90</b>	0,12
Día 21	3,46	3,75	3,81	<b>3,67</b>	0,19	3,60	3,67	4,15	<b>3,81</b>	0,30

**ANEXO 6.2: Análisis de varianza para recuento de BAL en trucha ahumada en frío, para los cuatro tratamientos.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	Razón F	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	2,05993	3	0,686642	8,45	0,0002
B:DIAS	41,791	3	13,9303	171,47	0,0000
RESIDUAL	3,24956	41	0,0812391		
TOTAL (CORREGIDO)	47,205	47			

Prueba de rangos múltiples para recuento de BAL en trucha ahumada en frío para los 4 tratamientos por tratamiento, Tukey HSD 95,0%.

Tratamiento	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
3	12	2,66667	X
1	11	2,89565	X
4	12	2,92667	X
2	12	3,24833	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	*-0,352683	0,318939
1 - 3	0,228984	0,318939
1 - 4	-0,0310163	0,318939
2 - 3	*0,581667	0,311929
2 - 4	*0,321667	0,311929
3 - 4	-0,26	0,311929

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

### ANEXO 6.3: Análisis de varianza para BAL en trucha ahumada en frío, por tratamiento

#### ANEXO 6.3.1: Trucha sin inocular (control)

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:DIAS	9,71947	3	3,23982	317,98	0,0000
B:REPETICION	0,0078	2	0,0039	0,38	0,6975
RESIDUAL	0,0611333	6	0,0101889		
TOTAL (CORREGIDO)	9,7884	11			

Prueba de rangos múltiples para recuento de BAL para trucha sin inocular (control), Tukey HSD 95,0%

Días	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
7	3	2,0	X
0	3	2,0	X
14	3	3,49333	X
21	3	4,02667	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 7	0,0	0,284363
0 - 14	*-1,49333	0,284363
0 - 21	*-2,02667	0,284363
7 - 14	*-1,49333	0,284363
7 - 21	*-2,02667	0,284363
14 - 21	*-0,533333	0,284363

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 6.3.2: Trucha con buffer fosfato**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:DIAS	18,7337	3	6,24455	186,33	0,0000
B:REPETICION	0,129074	2	0,0645371	1,93	0,2259
RESIDUAL	0,201085	6	0,0335142		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>19,0638</b>	<b>11</b>			

Prueba de rangos múltiples para recuento de BAL para trucha con buffer fosfato, Tukey HSD 95,0%

Días	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
0	3	2,0	X
7	3	2,0	X
14	3	4,41667	X
21	3	4,57607	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 7	0,0	0,515732
0 - 14	*-2,41667	0,515732
0 - 21	*-2,57607	0,515732
7 - 14	*-2,41667	0,515732
7 - 21	*-2,57607	0,515732
14 - 21	-0,1594	0,515732

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 6.3.3: Trucha con bacteriocina 1.600 UA/mL**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:DIAS	6,02693	3	2,00898	247,43	0,0000
B:REPETICION	0,0408167	2	0,0204083	2,51	0,1611
RESIDUAL	0,0487167	6	0,00811944		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>6,11647</b>	<b>11</b>			

Prueba de rangos múltiples para recuento de BAL para trucha con bacteriocina 1.600 UA/mL, Tukey HSD 95,0%

Días	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
0	3	2,0	X
7	3	2,0	X
14	3	2,99333	X
21	3	3,67333	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 7	0,0	0,253847
0 - 14	*-0,993333	0,253847
0 - 21	*-1,67333	0,253847
7 - 14	*-0,993333	0,253847
7 - 21	*-1,67333	0,253847
14 - 21	*-0,68	0,253847

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

#### ANEXO 6.3.4: Trucha con bacteriocina 3.200 UA/mL

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:DIAS	10,3176	3	3,4392	124,35	0,0000
B:REPETICION	0,0435167	2	0,0217583	0,79	0,4973
RESIDUAL	0,16595	6	0,0276583		
TOTAL (CORREGIDO)	10,5271	11			

Prueba de rangos múltiples para recuento de BAL para trucha con bacteriocina 3.200 UA/mL, Tukey HSD 95,0%

Días	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
7	3	2,0	X
0	3	2,0	X
21	3	3,80667	X
14	3	3,9	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 7	0,0	0,468514
0 - 14	*-1,9	0,468514
0 - 21	*-1,80667	0,468514
7 - 14	*-1,9	0,468514
7 - 21	*-1,80667	0,468514
14 - 21	0,0933333	0,468514

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 6.4: Análisis de varianza para recuento de BAL en trucha ahumada en frío, por días de análisis.**

**ANEXO 6.4.1: Día 14.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	3,28709	3	1,0957	24,78	0,0009
B:REPETICION	0,112117	2	0,0560583	1,27	0,3473
RESIDUAL	0,265283	6	0,0442139		
TOTAL (CORREGIDO)	3,66449	11			

Prueba de rangos múltiples para recuento de BAL para el día 14, Tukey HSD 95,0%

Tratamientos	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
3	3	2,99333	X
1	3	3,49333	X X
4	3	3,9	X X
2	3	4,41667	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	*-0,923333	0,592364
1 - 3	0,5	0,592364
1 - 4	-0,406667	0,592364
2 - 3	*1,42333	0,592364
2 - 4	0,516667	0,592364
3 - 4	*-0,906667	0,592364

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 6.4.2: Día 21.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	1,42483	3	0,474942	18,42	0,0020
B:REPETICION	0,166024	2	0,0830119	3,22	0,1122
RESIDUAL	0,154669	6	0,0257782		
TOTAL (CORREGIDO)	1,74552	11			

Prueba de rangos múltiples para recuento de BAL para el día 21, Tukey HSD 95,0%

Tratamientos	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
3	3	3,67333	X
4	3	3,80667	X
1	3	4,02667	X
2	3	4,57607	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	*-0,549401	0,452309
1 - 3	0,353333	0,452309
1 - 4	0,22	0,452309
2 - 3	*0,902734	0,452309
2 - 4	*0,769401	0,452309
3 - 4	-0,133333	0,452309

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 7: Medición de pH.****ANEXO 7.1: Valores de pH en trucha ahumada en frío.**

	Tratamiento 1 (Control)		Prom.	Desv. Estand.	Tratamiento 2 (Buffer fofato)		Prom.	Desv. Estand
<b>Día 0</b>	6,16	6,29	<b>6,23</b>	0,09	6,13	6,35	<b>6,24</b>	0,16
<b>Día 7</b>	6,24	6,13	<b>6,19</b>	0,08	6,29	6,15	<b>6,22</b>	0,10
<b>Día 14</b>	6,23	6,09	<b>6,16</b>	0,10	6,37	6,21	<b>6,29</b>	0,11
<b>Día 21</b>	6,08	6,26	<b>6,17</b>	0,13	6,14	6,35	<b>6,25</b>	0,15

	Tratamiento 3 (Bact. 1.600 UA/mL)		Prom.	Desv. Estand	Tratamiento 4 (Bact. 3.200 UA/mL)		Prom.	Desv. Estand
<b>Día 0</b>	6,18	6,33	<b>6,26</b>	0,11	6,4	6,22	<b>6,31</b>	0,13
<b>Día 7</b>	6,36	6,2	<b>6,28</b>	0,11	6,2	6,42	<b>6,31</b>	0,16
<b>Día 14</b>	6,3	6,16	<b>6,23</b>	0,10	6,18	6,38	<b>6,28</b>	0,14
<b>Día 21</b>	6,27	6,16	<b>6,22</b>	0,08	6,28	6,17	<b>6,23</b>	0,08

**ANEXO 7.2: Análisis de varianza para medición de pH en trucha ahumada en frío, para los cuatro tratamientos.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	Razón F	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	0,038625	3	0,012875	2,64	0,0699
B:REPETICION	0,0028125	1	0,0028125	0,58	0,4543
RESIDUAL	0,131763	27	0,00488009		
TOTAL (CORREGIDO)	0,1732	31			

Prueba de rangos múltiples para medición de pH en trucha ahumada en frío para los 4 tratamientos por tratamiento, Tukey HSD 95,0%

Tratamiento	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
1	8	6,185	X
3	8	6,245	X X
2	8	6,24875	X X
4	8	6,28125	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	-0,06375	0,0956053
1 - 3	-0,06	0,0956053
1 - 4	*-0,09625	0,0956053
2 - 3	0,00375	0,0956053
2 - 4	-0,0325	0,0956053
3 - 4	-0,03625	0,0956053

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

### ANEXO 7.3: Análisis de varianza para determinación de pH en trucha ahumada en frío, por tratamiento.

#### ANEXO 7.3.1: Trucha sin inocular (control)

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:DIAS	0,0049	3	0,00163333	0,48	0,7200
B:REPETICION	0,00125	1	0,00125	0,37	0,5880
RESIDUAL	0,01025	3	0,00341667		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0382875	7			

#### ANEXO 7.3.2: Trucha con buffer fosfato

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:DIAS	0,0052375	3	0,00174583	0,16	0,9174
B:REPETICION	0,0001125	1	0,0001125	0,01	0,9258
RESIDUAL	0,0329375	3	0,0109792		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0382875	7			

**ANEXO 7.3.3: Trucha con bacteriocina de 1.600 UA/mL.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:DIAS	0,0049	3	0,00163333	0,16	0,9195
B:REPETICION	0,00845	1	0,00845	0,81	0,4355
RESIDUAL	0,03145	3	0,0104833		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0448	7			

**ANEXO 7.3.4: Trucha con bacteriocina de 3.200 UA/mL.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:DIAS	0,0096375	3	0,0032125	0,38	0,7759
B:REPETICION	0,0001125	1	0,0001125	0,01	0,9154
RESIDUAL	0,0253375	3	0,00844583		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0350875	7			

**ANEXO 7.4: Análisis de varianza para la determinación de pH en trucha ahumada, por días de análisis.****ANEXO 7.4.1: Tiempo cero.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	0,00825	3	0,00275	0,40	0,7622
B:REPETICION	0,00605	1	0,00605	0,89	0,4156
RESIDUAL	0,02045	3	0,00681667		
TOTAL (CORREGIDO)	0,01675	7			

**ANEXO 7.4.2: Día 7.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	0,0192375	3	0,0064125	0,76	0,5868
B:REPETICION	0,0105125	1	0,0105125	1,24	0,3459
RESIDUAL	0,0253375	3	0,00844583		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0550875	7			

**ANEXO 7.4.3: Día 14.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	0,0212	3	0,00706667	1,05	0,4846
B:REPETICION	0,005	1	0,005	0,74	0,4522
RESIDUAL	0,0202	3	0,00673333		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0464	7			

**ANEXO 7.4.4: Día 21.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	0,0060375	3	0,0020125	0,27	0,8437
B:REPETICION	0,0001125	1	0,0001125	0,02	0,9097
RESIDUAL	0,0222375	3	0,0074125		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0283875	7			

**ANEXO 8: Nitrógeno básico volátil total en trucha ahumada en frío.**

**ANEXO 8.1: Tabla con datos de determinación de nitrógeno básico volátil total en trucha ahumada en frío, para los 4 tratamientos.**

	Tratamiento 1 (Control)		Prom.	Desv. Estand.	Tratamiento 2 (Buffer fofato)		Prom.	Desv. Estand
<b>Día 0</b>	7,88	7,88	<b>7,88</b>	0,00	7,78	7,84	<b>7,81</b>	0,04
<b>Día 7</b>	8,20	8,20	<b>8,20</b>	0,00	7,80	7,90	<b>7,85</b>	0,07
<b>Día 14</b>	8,00	7,90	<b>7,95</b>	0,07	8,08	7,98	<b>8,03</b>	0,07
<b>Día 21</b>	8,18	8,28	<b>8,23</b>	0,07	8,28	8,28	<b>8,28</b>	0,00

	Tratamiento 3 (Bact. 1.600 UA/mL)		Prom.	Desv. Estand	Tratamiento 4 (Bact. 3.200 UA/mL)		Prom.	Desv. Estand
<b>Día 0</b>	7,80	7,90	<b>7,85</b>	0,07	7,90	7,80	<b>7,85</b>	0,07
<b>Día 7</b>	8,18	8,18	<b>8,18</b>	0,00	7,98	7,88	<b>7,93</b>	0,07
<b>Día 14</b>	8,20	8,10	<b>8,20</b>	0,07	8,04	8,04	<b>8,04</b>	0,00
<b>Día 21</b>	8,20	8,28	<b>8,24</b>	0,06	8,18	8,10	<b>8,14</b>	0,06

**ANEXO 8.2: Análisis de varianza para determinación de nitrógeno básico volátil total para los cuatro tratamientos.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	Razón F	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	0,0767375	3	0,0255792	2,85	0,0579
B:DIAS	0,562837	3	0,187612	20,87	0,0000
RESIDUAL	0,224712	25	0,0089885		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>0,864287</b>	<b>31</b>			

**ANEXO 8.3: Análisis de varianza para determinación de nitrógeno básico volátil total en trucha ahumada en frío, por tratamiento.**

**ANEXO 8.3.1: Trucha sin inocular (control)**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:DIAS	1858,0	3	619,333	18,58	0,0193
B:REPETICION	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
RESIDUAL	100,0	3	33,3333		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>0,1958</b>	<b>7</b>			

Prueba de rangos múltiples para determinación de nitrógeno básico volátil total para trucha sin inocular (control), Tukey HSD 95,0%

Días	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
0	2	7,88	X
14	2	7,95	X X
7	2	8,2	X X
21	2	8,23	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 7	*-0,32	0,278549
0 - 14	-0,07	0,278549
0 - 21	*-0,35	0,278549
7 - 14	0,25	0,278549
7 - 21	-0,03	0,278549
14 - 21	*-0,28	0,278549

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 8.3.2: Trucha con buffer fosfato**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:DIAS	0,27535	3	0,0917833	24,26	0,0132
B:REPETICION	0,00045	1	0,00045	0,12	0,7529
RESIDUAL	0,01135	3	0,00378333		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>0,28715</b>	<b>7</b>			

Prueba de rangos múltiples para determinación de nitrógeno básico volátil total para trucha con buffer fosfato, Tukey HSD 95,0%

Días	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
0	2	7,81	X
7	2	7,85	X
14	2	8,03	X X
21	2	8,28	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 7	-0,04	0,296756
0 - 14	-0,22	0,296756
0 - 21	*-0,47	0,296756
7 - 14	-0,18	0,296756
7 - 21	*-0,43	0,296756
14 - 21	-0,25	0,296756

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

### ANEXO 8.3.3: Trucha con bacteriocina de 1.600 UA/mL.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:DIAS	0,1818	3	0,0606	14,66	0,0269
B:REPETICION	0,0008	1	0,0008	0,19	0,6897
RESIDUAL	0,0124	3	0,00413333		
TOTAL (CORREGIDO)	0,195	7			

Prueba de rangos múltiples para determinación de nitrógeno básico volátil total para trucha con bacteriocina de 1.600 UA/mL, Tukey HSD 95,0%

Días	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
0	2	7,85	X
14	2	8,15	X X
7	2	8,18	X
21	2	8,24	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 7	*-0,33	0,310179
0 - 14	-0,3	0,310179
0 - 21	*-0,39	0,310179
7 - 14	0,03	0,310179
7 - 21	-0,06	0,310179
14 - 21	-0,09	0,310179

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 8.3.4: Trucha con bacteriocina de 3.200 UA/mL.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:DIAS	0,0964	3	0,0321333	28,35	0,0106
B:REPETICION	0,0098	1	0,0098	8,65	0,0605
RESIDUAL	0,0034	3	0,00113333		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>0,1096</b>	<b>7</b>			

Prueba de rangos múltiples para determinación de nitrógeno básico volátil total para trucha con bacteriocina de 3.200 UA/mL, Tukey HSD 95,0%

Días	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
0	2	7,85	X
7	2	7,93	X X
14	2	8,04	X X
21	2	8,14	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 7	-0,08	0,162421
0 - 14	*-0,19	0,162421
0 - 21	*-0,29	0,162421
7 - 14	-0,11	0,162421
7 - 21	*-0,21	0,162421
14 - 21	-0,1	0,162421

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 8.4: Análisis de varianza para la determinación de nitrógeno básico volátil total en trucha ahumada, por días de análisis.****ANEXO 8.4.1: Tiempo cero.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	0,00495	3	0,00165	0,44	0,7434
B:REPETICION	0,00045	1	0,00045	0,12	0,7529
RESIDUAL	0,01135	3	0,00378333		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>0,01675</b>	<b>7</b>			

**ANEXO 8.4.2: Día 7.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	0,1868	3	0,0622667	18,68	0,0191
B:REPETICION	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
RESIDUAL	0,01	3	0,00333333		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>0,1968</b>	<b>7</b>			

Prueba de rangos múltiples para la determinación de nitrógeno básico volátil total para el día 7, Tukey HSD 95,0%

Tratamientos	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
2	2	7,85	X
4	2	7,93	X X
3	2	8,18	X
1	2	8,2	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	*0,35	0,278549
1 - 3	0,02	0,278549
1 - 4	0,27	0,278549
2 - 3	*-0,33	0,278549
2 - 4	-0,08	0,278549
3 - 4	0,25	0,278549

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 8.4.3: Día 14.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	0,0658	3	0,0219333	13,16	0,0312
B:REPETICION	0,005	1	0,005	3,00	0,1817
RESIDUAL	0,005	3	0,00166667		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>0,0758</b>	<b>7</b>			

Prueba de rangos múltiples para recuento de BAL para el día 14, Tukey HSD 95,0%

Tratamientos	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
1	2	7,95	X
2	2	8,03	X X
4	2	8,04	X X
3	2	8,2	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	-0,08	0,196964
1 - 3	*-0,25	0,196964
1 - 4	-0,09	0,196964
2 - 3	-0,17	0,196964
2 - 4	-0,01	0,196964
3 - 4	0,16	0,196964

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

#### ANEXO 8.4.4: Día 21.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	0,02095	3	0,00698333	2,06	0,2835
B:REPETICION	0,00125	1	0,00125	0,37	0,5862
RESIDUAL	0,01015	3	0,00338333		
TOTAL (CORREGIDO)	0,03235	7			

**ANEXO 9: Resultado del panel sensorial para magnitud de diferencia en los 4 tratamientos (escala de 0=No hay diferencia a 9=Extremadamente diferente).**

		<b>DIA 7</b>											
<b>Panelistas</b>	<b>Tratamiento 1 (Control)</b>			<b>Tratamiento 2 (Buffer fofato)</b>			<b>Tratamiento 3 (Bact. 1.600 UA/mL)</b>			<b>Tratamiento 4 (Bact. 3.200 UA/mL)</b>			
	<b>1</b>	1	5	2	1	0	0	4	5	1	2	3	1
<b>2</b>	3	3	0	0	0	5	0	4	1	5	3	3	
<b>3</b>	3	3	3	0	0	2	0	4	4	5	3	4	
<b>4</b>	4	0	0	0	3	4	0	0	5	2	4	0	
<b>5</b>	7	5	1	6	2	3	1	6	2	3	2	2	
<b>6</b>	2	0	0	2	2	0	0	0	2	0	2	2	
<b>7</b>	2	1	0	2	0	2	6	6	6	4	5	3	
<b>8</b>	6	4	3	0	3	5	7	4	0	5	0	2	
<b>9</b>	0	0	5	2	3	0	4	0	3	0	3	2	
<b>Desv. Est.</b>	2,09			1,81			2,41			1,55			

		<b>DIA 14</b>											
<b>Panelistas</b>	<b>Tratamiento 1 (Control)</b>			<b>Tratamiento 2 (Buffer fofato)</b>			<b>Tratamiento 3 (Bact. 1.600 UA/mL)</b>			<b>Tratamiento 4 (Bact. 3.200 UA/mL)</b>			
	<b>1</b>	1	2	2	1	0	0	2	2	1	2	0	0
<b>2</b>	4	4	3	5	3	2	0	3	3	0	3	3	
<b>3</b>	2	0	4	0	1	0	0	0	3	3	1	1	
<b>4</b>	4	3	0	3	2	3	0	1	0	0	1	0	
<b>5</b>	1	4	4	5	3	5	7	5	2	6	5	1	
<b>6</b>	2	2	1	2	0	5	3	3	4	2	2	2	
<b>7</b>	4	3	0	6	2	0	5	3	2	5	0	4	
<b>8</b>	3	4	0	7	3	3	5	0	1	6	2	1	
<b>9</b>	0	0	6	2	3	7	4	3	2	3	0	6	
<b>Desv. Est.</b>	1,71			2,16			1,86			2,02			

**ANEXO 9.1: Análisis estadísticos para la magnitud de diferencia en la evaluación organoléptica de las muestras de trucha ahumada, envasada al vacío.**

**ANEXO 9.1.1: Análisis de varianza para grado de diferencia entre las muestras de trucha ahumada en el día 7.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	Razón F	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	20,5463	3	6,84877	1,52	0,2215
B:PANELISTA	69,0185	8	8,62731	1,9	0,0796
C:REPETICION	3,85185	2	1,92593	0,43	0,6548
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	116,537	24	4,85571	1,08	0,4018
AC	23,2593	6	3,87654	0,86	0,5311
BC	49,1481	16	3,07176	0,68	0,7974
RESIDUAL	216,407	48	4,50849		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>498,769</b>	<b>107</b>			

**ANEXO 9.1.2: Análisis de varianza para grado de diferencia entre las muestras de trucha ahumada en el día 14.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	Razón F	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	5,28704	3	1,76235	0,54	0,6595
B:REPETICION	15,9074	2	7,9537	2,42	0,0995
C:PANELISTA	110,074	8	13,7593	4,19	0,0007
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	12,6852	6	2,1142	0,64	0,6947
AC	55,6296	24	2,3179	0,71	0,8208
BC	133,759	16	8,35995	2,55	0,0064
RESIDUAL	157,648	48	3,28434		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>490,991</b>	<b>107</b>			

**ANEXO 9.1.3: Análisis de varianza para grado de diferencia entre las muestras de trucha ahumada en ambos días de análisis.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	Razón F	Valor F
<b>EFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	5,2963	3	1,76543	0,44	0,7275
B:PANELISTA	124,593	8	15,5741	3,85	0,0004
C:DIA	0,166667	1	0,166667	0,04	0,8395
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	104,704	24	4,36265	1,08	0,3741
AC	20,537	3	6,84568	1,69	0,1709
BC	54,5	8	6,8125	1,68	0,1059
RESIDUAL	680,13	168	4,04839		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>989,926</b>	<b>215</b>			



**ANEXO 10.1: Análisis estadístico de la aceptación en la evaluación organoléptica de las muestras de trucha ahumada con respecto al control.**

**ANEXO 10.1.1: Análisis de varianza para aceptación entre las muestras de trucha ahumada con respecto al control en el día 7.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	Razón F	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	0,0740741	3	0,0246914	0,05	0,9871
B:PANELISTA	14,1667	8	1,77083	3,25	0,0049
C:REPETICION	0,166667	2	0,0833333	0,15	0,8588
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	9,75926	24	0,406636	0,75	0,7797
AC	1,98148	6	0,330247	0,61	0,7247
BC	4,33333	16	0,270833	0,50	0,9368
RESIDUAL	26,1852	48	0,545525		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>56,6667</b>	<b>107</b>			

**ANEXO 10.1.2: Análisis de varianza para aceptación entre las muestras de trucha ahumada con respecto al control en el día 14.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	Razón F	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	0,333333	3	0,111111	0,26	0,8542
B:PANELISTA	11,5	8	1,4375	3,36	0,0039
C:REPETICION	0,888889	2	0,444444	1,04	0,3620
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	13,8333	24	0,576389	1,35	0,1878
AC	3,77778	6	0,62963	1,47	0,2085
BC	10,1111	16	0,631944	1,48	0,1487
RESIDUAL	20,5556	48	0,428241		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>61,0</b>	<b>107</b>			

**ANEXO 10.1.3: Análisis de varianza para aceptación entre las muestras de trucha ahumada con respecto al control para los dos días de análisis.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	Razón F	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAM	0,203704	3	0,0679012	0,14	0,9353
B:DIA	0,166667	1	0,166667	0,35	0,5571
C:PANELISTA	10,9167	8	1,36458	2,83	0,0056
<b>INTERACTIONS</b>					
AB	0,203704	3	0,0679012	0,14	0,9353
AC	10,713	24	0,446373	0,93	0,5653
BC	14,75	8	1,84375	3,83	0,0004
RESIDUAL	80,8796	168	0,481426		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>117,833</b>	<b>215</b>			

**ANEXO 10.1.4: Tabla de contingencia para la aceptación entre las muestras de trucha ahumada con respecto al control en el día 7.**

Test de Chi-Cuadrado

Chi-Cuadrado	g.l.	Valor P
4,03	6	0,6729

**ANEXO 10.1.5: Tabla de contingencia para la aceptación entre las muestras de trucha ahumada con respecto al control en el día 14.**

Test de Chi-Cuadrado

Chi-Cuadrado	g.l.	Valor P
1,33	6	0,9697

**ANEXO 10.1.6: Tabla de contingencia para la aceptación entre las muestras de trucha ahumada con respecto al control para los dos días de análisis.**

Frequency Table

	T1	T2	T3	T4	Row Total
Row_1	8	11	12	12	43
	3,70	5,09	5,56	5,56	19,91
Row_2	26	22	19	22	89
	12,04	10,19	8,80	10,19	41,20
Row_3	20	21	23	20	84
	9,26	9,72	10,65	9,26	38,89
Column Total	54	54	54	54	216
	25,00	25,00	25,00	25,00	100,00

## Test de Chi-Square

Chi-Cuadrado	g.l.	Valor P
2,40	6	0,8797

**ANEXO 10.2: Tabla de contingencia para naturaleza de la diferencia entre muestras en la evaluación organoléptica de muestras de trucha ahumada con respecto al control para los dos días de análisis.**

Frequency Table

	T1	T2	T3	T4	Row Total
Row_1	13	13	14	13	53
	7,39	7,39	7,95	7,39	30,11
Row_2	21	22	23	27	93
	11,93	12,50	13,07	15,34	52,84
Row_3	9	8	9	4	30
	5,11	4,55	5,11	2,27	17,05
Column	43	43	46	44	176
Total	24,43	24,43	26,14	25,00	100,00

## Test de Chi-Cuadrado

Chi-Cuadrado	g.l.	Valor P
3,08	6	0,7985

**ANEXO 11: Resultados de recuento de *L. monocytogenes* en trucha ahumada en frío, para los 3 tratamientos.**

	Tratamiento A (sólo listeria)			Prom.	Desv estand	Tratamiento B (listeria + bact 1200 UA/mL)			Prom.	Desv estand
	<b>Día 0</b>	4,22	4,15	4,18	<b>4,18</b>	0,04	4,54	3,78	3,96	<b>4,09</b>
<b>Día 7</b>	4,82	5,28	4,64	<b>4,91</b>	0,33	4,54	4,17	4,00	<b>4,24</b>	0,27
<b>Día 14</b>	5,58	5,59	5,79	<b>5,65</b>	0,12	4,49	4,78	4,76	<b>4,68</b>	0,16
<b>Día 21</b>	6,46	6,00	6,68	<b>6,38</b>	0,35	4,88	3,95	4,51	<b>4,45</b>	0,47

	Tratamiento C (listeria + bact 1600 UA/mL)			Prom.	Desv estand
	Día 0	4,10	3,80	3,87	<b>3,92</b>
Día 7	3,96	3,99	4,27	<b>4,07</b>	0,17
Día 14	3,82	4,31	4,34	<b>4,15</b>	0,29
Día 21	3,87	3,43	4,32	<b>3,87</b>	0,45

**ANEXO 11.1: Análisis de varianza para recuento de *L. monocytogenes* en trucha ahumada en frío, para los 3 tratamientos.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	Razón F	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:TRATAMIENTO	10,3993	2	5,19966	22,83	0,0000
B:DIAS	4,08703	3	1,36234	5,98	0,0025
RESIDUAL	6,83193	30	0,227731		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>21,3183</b>	<b>35</b>			

Prueba de rangos múltiples para recuento de *L. monocytogenes* en trucha ahumada en frío para los 3 tratamientos , Tukey HSD 95,0%

Tratamientos	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
3	12	4,00667	X
2	12	4,36333	X
1	12	5,2825	X
Contraste	Diferencia	+/- Limites	
1 - 2	*0,919167	0,480398	
1 - 3	*1,27583	0,480398	
2 - 3	0,356667	0,480398	

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 11.2: Análisis estadísticos para estudio del efecto de la aplicación de bacteriocina sobre *L. monocytogenes*. Recuento de *L. monocytogenes* por tratamiento.**

**ANEXO 11.2.1: Trucha con *L. monocytogenes* (control).**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:DIAS	8,05942	3	2,68647	33,64	0,0004
B:REPETICION	0,01005	2	0,005025	0,06	0,9396
RESIDUAL	0,47915	6	0,0798583		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>8,54862</b>	<b>11</b>			

Prueba de rangos múltiples para recuento de *L. monocytogenes* para control (sólo *Listeria*), Tukey HSD 95,0%

Días	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
0	3	4,18333	X
7	3	4,91333	X X
14	3	5,65333	X X
21	3	6,38	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 7	-0,73	0,796103
0 - 14	*-1,47	0,796103
0 - 21	*-2,19667	0,796103
7 - 14	-0,74	0,796103
7 - 21	*-1,46667	0,796103
14 - 21	-0,726667	0,796103

\*Indica una diferencia estadísticamente significativa.

**ANEXO 11.2.2: Trucha con bacteriocina 1.200 UA/mL y *L. monocytogenes*.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:DIAS	0,5822	3	0,194067	2,12	0,1987
B:REPETICION	0,410317	2	0,205158	2,24	0,1872
RESIDUAL	0,54855	6	0,091425		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>1,54107</b>	<b>11</b>			

**ANEXO 11.2.3: Trucha con bacteriocina 1.600 UA/mL y *L. monocytogenes*.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:DIAS	0,155	3	0,0516667	0,70	0,5864
B:REPETICION	0,230317	2	0,115158	1,56	0,2854
RESIDUAL	0,44395	6	0,0739917		
TOTAL (CORREGIDO)	0,829267	11			

**ANEXO 11.3: Análisis de varianza para recuento de *L. monocytogenes* en trucha ahumado en frío, por días de análisis.****ANEXO 11.3.1: Tiempo cero.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	0,1046	2	0,0523	1,53	0,3202
B:REPETICION	0,230867	2	0,115433	3,39	0,1378
RESIDUAL	0,136333	4	0,0340833		
TOTAL (CORREGIDO)	0,4718	8			

**ANEXO 11.3.2: Día 7.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	1,19016	2	0,595078	6,31	0,0579
B:REPETICION	0,0514889	2	0,0257444	0,27	0,7743
RESIDUAL	0,377311	4	0,0943278		
TOTAL (CORREGIDO)	1,61896	8			

**ANEXO 11.3.3: Día 14.**

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	3,46429	2	1,73214	105,55	0,0003
B:REPETICION	0,185356	2	0,0926778	5,65	0,0684
RESIDUAL	0,0656444	4	0,0164111		
TOTAL (CORREGIDO)	3,71529	8			

Prueba de rangos múltiples para recuento de *L. monocytogenes* para el día 14, Tukey HSD 95,0%

Tratamiento	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
3	3	4,15667	X
2	3	4,67667	X
1	3	5,65333	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	*0,976667	0,372721
1 - 3	*1,49667	0,372721
2 - 3	*0,52	0,372721

\* Indica una diferencia estadísticamente significativa.

#### ANEXO 11.3.4: Día 21.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-calc	Valor F
EFECTOS PRINCIPALES					
A:TRATAMIENTO	10,3499	2	5,17493	109,45	0,0003
B:REPETICION	0,8862	2	0,4431	9,37	0,0309
RESIDUAL	0,189133	4	0,0472833		
TOTAL (CORREGIDO)	11,4252	8			

Prueba de rangos múltiples para recuento de *L. monocytogenes* para el día 14, Tukey HSD 95,0%

Tratamiento	Count	Promedio LS	Grupos Homogéneos
2	3	4,46	X
1	3	5,07	X X
3	3	5,17	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
1 - 2	0,61	0,632658
1 - 3	-0,1	0,632658
2 - 3	*-0,71	0,632658

Indica una diferencia estadísticamente significativa.