



# Nacameh

Vocablo náhuatl para "carnes"

Volumen 4, Número 2, Diciembre 2010

Difusión vía Red de Computo semestral sobre Avances  
en Ciencia y Tecnología de la Carne

Derechos Reservados<sup>©</sup> MMX

ISSN: 2007-0373

<http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/>



## Evaluación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto crudo de bacteriocina en combinación con conservadores químicos utilizados en la industria cárnica\*

Luis A. Aguado Bautista, Yenizey M. Álvarez Cisneros y Edith Ponce Alquicira ✉

*Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana. Av. San Rafael Atlixco N° 186, Colonia Vicentina, Delegación Iztapalapa, México, D.F., 09340. ✉ Autor para correspondencia: pae@xanum.uam.mx*

### Resumen

La bioconservación se puede definir como la extensión de la vida media de los alimentos mediante el uso de productos antibacterianos como las bacteriocinas. El uso de bacteriocinas como parte de la tecnología de barreras ha demostrado su efectividad en la conservación de productos cárnicos mínimamente procesados. Sin embargo, existen interrogantes sobre el uso combinado de bacteriocinas con otros aditivos empleados en la industria cárnica como una alternativa para reducir el uso de conservadores químicos. El objetivo fue determinar la efectividad de la bacteriocina producida por *E. faecium* MXVK29 en combinación con conservadores químicos contra microorganismos de deterioro y patógenos. En primera instancia se obtuvo un extracto crudo de bacteriocina, al que se le determinó la actividad antimicrobiana. Posteriormente, se realizó un diseño de mezclas de la bacteriocina junto con los conservadores evaluados para determinar el efecto combinado mediante isobologramas. La actividad de la bacteriocina fue de 46.34UA/•g de proteína. *Pseudomonas putida* no fue inhibida por ninguno de los conservadores utilizados en las condiciones evaluadas. Sin embargo, la respuesta fue diferente para otros microorganismos, ya que, todos los antimicrobianos en estudio presentaron un efecto sinérgico, cuando fueron combinados con la bacteriocina contra *Brochothrix thermosphacta* y *Escherichia coli*, con excepción de lactato de sodio que tuvo un efecto aditivo contra *Listeria innocua*.

---

\* Recibido 20 Septiembre 2010. Revisado 3 Noviembre 2010. Aceptado 8 Diciembre 2010.

## Introducción

Acorde con varios autores, los microorganismos presentes en alimentos de origen animal pueden ser clasificados en dos grandes grupos: aquellos responsables del deterioro como *Brochotrix thermosphacta*, y los microorganismo patógenos que pueden causar daño a la salud del consumidor como *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* (Jay, 2000; Adams y Moss, 2008). Existen diversos procesos encaminados al control de microorganismos, como el uso de tratamientos térmicos, la refrigeración y la congelación, así como la aplicación de conservadores. Sin embargo, algunos conservadores como el benzoato de sodio, el sorbato de potasio y los nitritos pueden producir reacciones alérgicas y toxicidad, por lo que existe un gran interés en la búsqueda de alternativas que permitan la eliminación o reducción del uso de compuestos potencialmente tóxicos (Lücke, Erich y Jager, 1999; Long y Barker, 1999; Bruhn, 2002; Davison, Juneja y Branen, 2002; Smith y Hong-Shum, 2003; Arysa, 2010).

Una alternativa a esta problemática es la bioconservación, la cual se puede definir como la extensión de la vida media y de la seguridad de los alimentos mediante el empleo controlado de microorganismos, o de la incorporación de metabolitos con actividad inhibitoria, como la ruterina y las bacteriocinas, entre otros. En particular, las bacteriocinas son péptidos, en su mayoría termoestables, con actividad antimicrobiana, sintetizados ribosomalmente como parte del mecanismo de defensa de la cepa productora. Por definición, las bacteriocinas son inactivadas por al menos una proteasa, y por tanto, inactivadas por las enzimas gastrointestinales, razón por la que se consideran inocuas para el consumidor (Klaenhammer, 1993; Nettles, 1993; Cotter, Hill y Ross, 2005). Dentro de la amplia gama de bacteriocinas reportadas, sólo la nisina ha sido reconocida como segura y aprobada para su uso de alimentos por la FDA y otras instancias gubernamentales. Aunque existen diversas aplicaciones comerciales para la industria cárnica y láctea que incluyen además de la nisina a otros extractos de bacteriocinas como la pediocina.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son por excelencia consideradas como agentes para la bioconservación, debido a que producen una amplia gama de metabolitos con propiedades antimicrobianas, además contribuyen al desarrollo de características organolépticas específicas en los productos donde se aplican (Shtenberg, 1973; FDA, 1988). Dentro de este grupo, las

bacterias del género enterococos son reconocidas por su alta frecuencia bacteriogénica en aislados procedentes de alimentos, lo cual indica que dichas cepas y sus bacteriocinas poseen un historial seguro, requisito imprescindible para su posible uso en sistemas alimentarios (Castro y col., 2004). En particular la cepa de *Enterococcus faecium* MXVK29 tiene la capacidad de producir una bacteriocina que inhibe el desarrollo de *Staphylococcus* sp, y *Listeria* sp., además por su naturaleza proteica, tolerancia a procesos térmicos de pasteurización y esterilización, y pertenencia a la clase IIa debido a que presenta la secuencia consenso YGNGV (Álvarez, 2008; Álvarez y col., 2010), resulta de interés como posible bioconservador en alimentos (Cleveland y col., 2001; Cotter, Hill y Ross, 2005; Drider y col., 2006). El uso combinado de bacteriocinas como parte de un tratamiento de barreras y no como agente de conservación único, puede ser una alternativa eficiente para reducir el uso de conservadores químicos, por ello el objetivo de este trabajo fue determinar la efectividad de esta bacteriocina en combinación con otros conservadores (benzoatos, sorbatos, nitritos y lactatos) contra microorganismos de deterioro y patógenos in vitro.

## **Materiales y Métodos**

### ***Condiciones de crecimiento de las cepas.***

La cepa productora de bacteriocina *Enterococcus faecium* MXVK29 fue aislada de chorizo mexicano por el Dr. Víctor Kuri y el Dr. M. Collins de la Queen's University of Belfast. Los microorganismos sensibles se obtuvieron de diferentes fuentes (Cuadro 1). Las cepas se conservaron en viales con glicerol al 50% a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y para su reactivación se colocó el contenido de un vial en un tubo con 9 mL del medio de propagación correspondiente. *E. faecium* fue cultivada en medio CGB (caldo caseína-glucosa: extracto de levadura 0.5%, Bioxón, México, peptona biotriptasa 2%, Bioxón, México, dextrosa 1%, Bioxón, México, sulfato de manganeso 0.005%, J.T. Baker, México, citrato de amonio 0.2%, J.T. Baker, México, fosfato disódico 0.2%, J.T. Baker, México, sulfato de magnesio 0.01% J.T. Baker, México, tween 80 Hycel, México 0.10%, pH 7) a  $37^{\circ}\text{C}$ . Los microorganismos *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* y *Pseudomonas putida* fueron incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  en caldo TSB (soya-tripticosa, Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

Cuadro 1. Cepas sensibles y clasificación

Cepa Sensible	Tipo de Bacteria
<i>Escherichia coli</i> JM P101 <sup>1</sup>	Gram (-)
<i>Brochothrix thermosphacta</i> NCIB-10018 <sup>2</sup>	Gram (+)
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090 <sup>2</sup>	Gram (+)
<i>Pseudomonas putida</i> <sup>2</sup>	Gram (-)

<sup>1</sup> Dr. M. Collins, Queen's University of Belfast, UK.

<sup>2</sup> Christian Hansen, Horsholm, Denmark.

### ***Extracción del compuesto antimicrobiano***

La obtención del extracto crudo de bacteriocina se realizó a partir de un cultivo de 16 horas de *Enterococcus faecium*, el cual fue sometido a un tratamiento térmico a 70 °C durante 30 minutos para la inactivación de las proteasas (Katla y col., 2003) que pudieran estar presentes en el medio, seguido de una centrifugación a 3100 x g durante 10 minutos a 4°C. Una vez centrifugado, el sobrenadante se colectó y se ajustó a pH 6.0; posteriormente se sometió a liofilización y se mantuvo a -20 °C hasta su uso. El liofilizado obtenido se denominó extracto crudo (EC).

### ***Determinación de la actividad inhibitoria.***

El EC se disolvió en buffer de fosfatos (0.1M pH 7) y se le determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad, California, USA), empleando un Biofotómetro Eppendorf® 6131. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas base dos. La actividad inhibitoria se midió por el método de difusión en placas de agar (Schillinger y Lücke, 1989) con modificaciones, utilizando *Listeria innocua* ATCC33090 como cepa sensible. La técnica consistió en depositar 30 µL del EC en pozos hechos con una pipeta Pasteur estéril en una capa de agar TSB semisólido (0.8% de agar bacteriológico), la cual se encontraba depositada sobre una capa del mismo medio pero con 1.5% de agar bacteriológico. El medio semisólido fue previamente inoculado con 70 µL de un cultivo de la cepa sensible en fase logarítmica 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> ufc/mL con 0.3 unidades de densidad óptica a 600nm (DO<sub>λ=600nm</sub>). La actividad antimicrobiana de la bacteriocina se evaluó determinando el diámetro del halo de inhibición formado, una vez incubada la placa a 37 °C durante 24 h para el desarrollo de la cepa sensible. Para determinar la actividad de los extractos crudos, las cepas

productoras se incubaron en condiciones de anaerobiosis, para descartar presencia de halos derivados de la producción de peróxido de hidrógeno. La actividad de extracto crudo de bacteriocina se reportó en Unidades Arbitrarias por gramo de extracto liofilizado (UA/g) y en Unidades Específicas (UA/ $\mu$ g de proteína), expresando la actividad en función de la concentración de proteína obtenida en el extracto de bacteriocina. La unidad arbitraria por mililitro (UA/mL) está definida como el inverso de la máxima dilución (base 2) a la cual se obtiene un halo de inhibición de 2 mm de diámetro entre el volumen del compuesto antimicrobiano colocado en cada pozo por el factor de conversión (Ecuación 1, Bhunia y col., 1991; Chikindas, Chi-Zhang y Yam, 2004):

$$UA = \frac{D}{V} \times F_D \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

UA= unidades arbitrarias en un mililitro.

D= inverso de la dilución base 2.

V= volumen de bacteriocina en cada pozo (30  $\mu$ L).

F<sub>D</sub>= factor de conversión de microlitros a mililitros (1000  $\mu$ L/1 mL).

### ***Pruebas de susceptibilidad utilizando las combinaciones de antimicrobianos.***

Se empleó un ensayo de tablero de ajedrez para evaluar todas las combinaciones de los diferentes conservadores con la bacteriocina (Berenbaum, 1978). Los antimicrobianos se disolvieron en buffer de citratos (pH 5.6) con excepción del lactato, en las siguientes concentraciones en  $\mu$ g/mL: sorbato de potasio y benzoato de sodio 100, 200 y 400; nitrato de sodio: 50, 100 y 200; lactato de sodio, 100, 200, 400, 500 y 10000 (las últimas dos concentraciones sólo se utilizaron para los cultivos de *B. thermosphacta*); bacteriocina, 3125, 6250 y 12500 (3.33, 6.66 y 13.32 UA/mL). Las diferentes combinaciones se probaron para cada una de las cepas sensibles (*Listeria innocua*, *E. coli*, *Pseudomonas putida* y *B. thermosphacta*) en cajas petri con agar TSA pH 5.6, adicionado con las diferentes soluciones de antimicrobianos. Para cada combinación se utilizaron 2.5 mL de antimicrobiano A (bacteriocina), 2.5 mL de antimicrobiano B (sorbato de potasio, benzoato de sodio, nitrato de sodio o

lactato de sodio) y 5 mL de agar TSA. Se utilizó un control negativo (sin antimicrobianos) y dos controles positivos probando por separado cada uno de los antimicrobianos evaluados. Las cajas preparadas con las diferentes combinaciones fueron divididas en secciones y en cada sección se colocaron 10  $\mu$ L del inóculo de los diferentes microorganismos sensibles a una  $DO_{\lambda 600\text{nm}} = 0.1$  para *E. coli*, *Pseudomona putida* y *B. thermosphacta*, ó a una  $DO_{\lambda 600\text{nm}} = 0.15$  para *Listeria innocua*, posteriormente las cajas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas. La concentración mínima bactericida (CMB) fue definida como la mínima concentración que presentó una inhibición completa.

#### ***Evaluación de las interacciones antimicrobianas.***

Las CMB de cada uno de los antimicrobianos solos y en combinación fueron graficados para formar un isoblograma y se calculó el índice de la concentración fraccional inhibitoria (CFII); éste último se define como la concentración necesaria de cada antimicrobiano que en combinación producen la inhibición, y es calculado como una proporción de la CMB de cada uno de los antimicrobianos (Ecuación 2). La interacción entre dos antimicrobianos puede ser de tipo sinérgica cuando el  $CFII < 1$ , aditiva si el  $CFII = 1$ , o antagonista cuando el  $CFII > 1$  (Davidson y Parish, 1989).

$$CFII_1 = \frac{CMB_{Ac}}{CMB_A} + \frac{CMB_{Bc}}{CMB_B}$$

Ecuación 2

Donde:

CFII=índice de la concentración fraccional inhibitoria.

$CMB_{Ac}$ =concentración del antimicrobiano A en combinación.

$CMB_A$ = concentración del antimicrobiano A solo.

$CMB_{Bc}$ = concentración del antimicrobiano B en combinación.

$CMB_B$ = concentración del antimicrobiano B solo.

## Resultados y Discusión:

### *Extracción y actividad de la bacteriocina.*

La actividad se evaluó determinando la dilución más alta en la que se observó un halo de inhibición cuando se disuelven 500mg de bacteriocina por mL de buffer. El EC de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* presentó halos de inhibición hasta la dilución 16, dando una actividad de 1066.7UA/g de extracto crudo liofilizado (533.3 UA/mL de extracto) y una concentración de proteína de 11.33·g/mL de extracto, que expresado en unidades específicas correspondió a 47UA/·g de proteína (Figura 1).

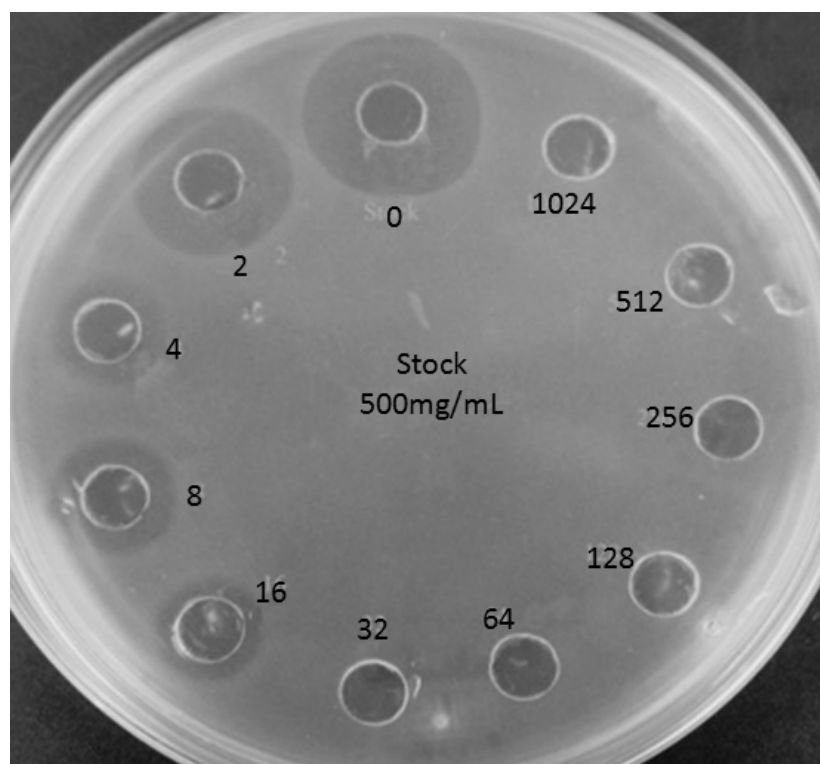


Figura 1. Determinación de actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar.



### ***Combinación de la bacteriocina con los conservadores.***

De los cuatro microorganismos estudiados, *Pseudomonas putida* no fue inhibida por ninguno de los conservadores utilizados a las diferentes concentraciones evaluadas. Se reconoce que las bacteriocinas producidas por BAL poseen una actividad inhibitoria reducida contra bacterias Gram negativas, lo que explica la nula inactivación por parte de este metabolito (Cotter, Hill y Ross, 2005). Asimismo, algunos estudios han demostrado que las pseudomonas pueden sintetizar una permeasa inducible al benzoato que le permite catabolizar a este antimicrobiano, y que posiblemente le confiera resistencia a conservadores cuyo mecanismo de acción es la acidificación del citoplasma celular (Thayer y Wheelis, 1976, 1982; Jeffrey y col., 1992).

La bacteriocina demostró tener un efecto bactericida para todas las cepas en estudio (excepto *P. putida*), cuando se utilizó a una concentración de 12500  $\cdot$ g/mL, lo cual resulta importante ya que incluso inhibió a *E. coli*. La actividad observada contra bacterias Gram negativas es inusual (Alvarado y col., 2005; Martín-Platero y col., 2006), aunque existen algunos reportes de bacteriocinas producidas por BAL que inhiben a estos microorganismos (De Kwaadsteniet y col., 2005; Line y col., 2008). Algunos autores (Tominaga y Hatakeyama, 2006; Line y col. 2008) indican que esta diferencia en la actividad se puede deber al número de residuos de cisteína que contiene el péptido, ya que la presencia de este aminoácido se asocia a un mayor número de puentes disulfuro, los cuales participan en la formación de poros en la membrana de las células sensibles. El benzoato de sodio y el sorbato de potasio presentaron un efecto bactericida para todas las cepas en estudio cuando se aplicaron a concentraciones mayores de 400  $\mu$ g/mL.

Las pruebas realizadas mostraron que las combinaciones de benzoatos y bacteriocina tienen un efecto sinérgico contra tres de los microorganismos en estudio (*B. thermosphacta*, *E. coli* y *L. innocua*) con una CFII < 1 (0.3, 0.6 y 0.5, respectivamente). Los isobogramas corroboraron este hecho, ya que indicaron de forma cualitativa que existe un efecto sinérgico entre la bacteriocina y el conservador contra los microorganismos evaluados. Para visualizar estas interacciones, los isobogramas se construyen utilizando los datos de las CMB reportadas para cada interacción. Una línea recta implica que el efecto es aditivo (línea de aditividad), si la curva es desviada por debajo y hacia la izquierda de la línea recta el efecto es sinérgico, y

cuando la línea es desviada por encima y a la derecha, el efecto es antagónico (Tompking, 2005).

En la Figura 2 se observa que existe un efecto sinérgico entre la bacteriocina y el benzoato de sodio contra *B. thermosphacta*, *E. coli* y *L. innocua*, además el isoblograma indica que la actividad antimicrobiana se incrementa en las combinaciones con concentraciones bajas de bacteriocina (3125 y 6250  $\mu\text{g/mL}$ ) y benzoato de sodio (100 y 200  $\cdot\text{g/mL}$ ).

Las combinaciones de sorbato de potasio y bacteriocina tienen un efecto sinérgico contra *B. thermosphacta* y *L. innocua*, pero al ser probados contra *E. coli* sólo se demostró este efecto únicamente en la primera mitad del isoblograma (0 a 6250  $\mu\text{g/mL}$ ), en tanto que en la otra mitad se observó un efecto aditivo (Figura 3). Además podemos observar que la concentración fraccional inhibitoria obtenida contra *B. thermosphacta* cuando se utiliza la combinación de bacteriocina con sorbato de potasio o benzoato de sodio es la misma (CFII= 0.3), lo cual se puede deber a que el mecanismo de acción de ambos conservadores es a nivel de pared celular en su forma disociada (Lück, Erich y Jager, 1999). Por otra parte, *L. innocua* presentó un perfil diferente cuando se probó la combinación con el sorbato de potasio, ya que además de tener una CFII mayor (0.65), sólo se encontró una combinación con efecto sinérgico (100 y 6260  $\mu\text{g/mL}$ ). Finalmente el uso de esta combinación demostró tener dos tipos de efectos frente a *E. coli*: uno de tipo sinérgico, que se observa en las concentraciones más bajas de ambos conservadores (200 y 3125  $\mu\text{g/mL}$ ) y otro de tipo aditivo a partir de 6250  $\mu\text{g/mL}$ . Este último efecto indica que cuando se utilizan cualquiera de los dos conservadores en combinación, la suma de los efectos de cada compuesto es aproximadamente igual al uso de cada uno de forma independiente (Tompking, 2005).

El lactato de sodio presentó un efecto bactericida para *B. thermosphacta* cuando se trabajó a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , a diferencia de *E. coli* y *L. innocua* que necesitaron una menor concentración para obtener el efecto deseado (400  $\mu\text{g/mL}$ ). En la Figura 4 se observa que el efecto de las combinaciones de lactato de sodio y bacteriocina es de tipo sinérgico contra *B. thermosphacta* y *E. coli*, mientras que para *L. innocua* demostraron un efecto aditivo en todas las concentraciones utilizadas. *B. thermosphacta* presenta una CFII= 0.32, encontrando dos combinaciones en las que se tiene

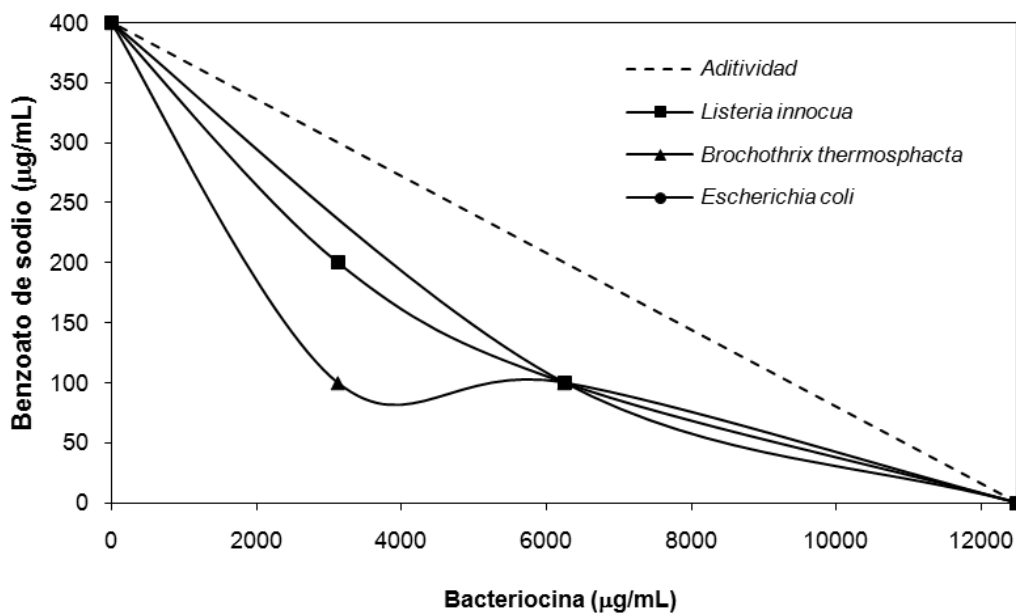


Figura 2. Isoblograma de la combinación benzoato de sodio-bacteriocina para *B. thermosphacta*, *E. coli* y *L. innocua*.

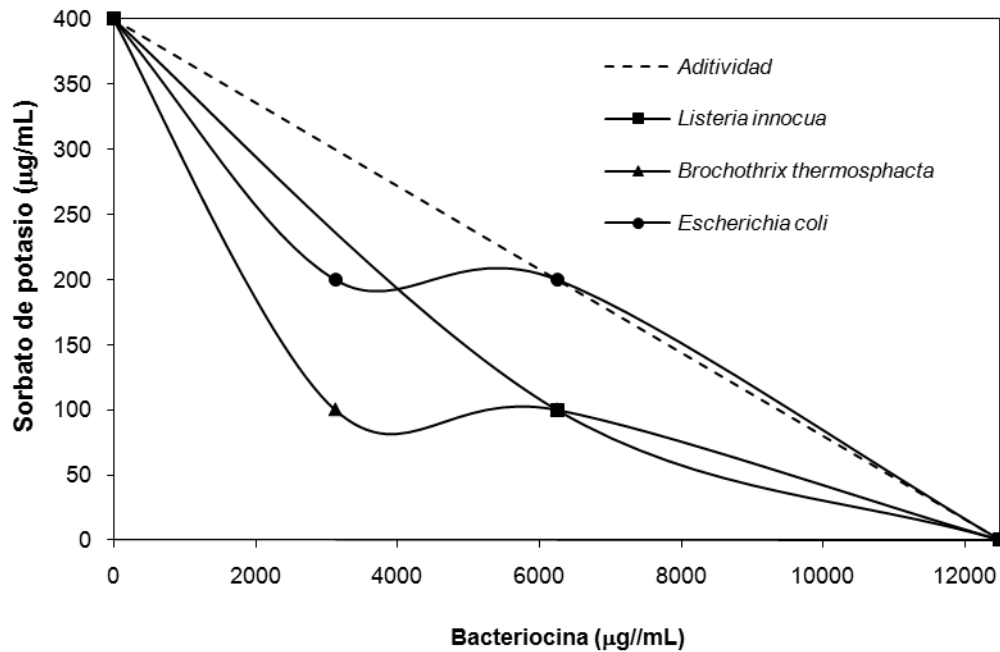


Figura 3. Isoblograma de la combinación sorbato de potasio-bacteriocina para *B. thermosphacta*, *E. coli* y *L. innocua*.

un mayor efecto antimicrobiano (200 y 3125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 200 y 6250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Por otra parte, para *E. coli* se obtuvo una CFII= 0.4, con dos combinaciones de efecto sinérgico en las concentraciones más bajas (100 y 3125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 100 y 6250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Un perfil que llama la atención es el presentado por *L. innocua*, ya que como se mencionó tiene un efecto aditivo, acorde al valor de la concentración fraccional inhibitoria que este presenta (CFII=1), además como se aprecia en el isoblograma las combinaciones utilizadas para este microorganismo caen en la línea de aditividad. Este efecto aditivo indica que la efectividad del antimicrobiano no se reduce ni mejora en la presencia de un segundo compuesto (Davidson y Parish, 1989), es decir que se puede utilizar el lactato de sodio o la bacteriocina de forma individual, ya que no hay una mejora en la actividad inhibitoria por la adición de la mezcla de estos compuestos sobre *L. innocua*, en las concentraciones del estudio. Tanto la bacteriocina como el lactato de sodio pueden inhibir el desarrollo de listeria, acorde con resultados preliminares (Álvarez y col., 2010) y lo señalado por Glass y col. (2002), respectivamente. Éstos últimos autores han reportado que *Listeria* sp. puede ser inhibida por cualquier sal de lactato sin la necesidad de incorporar otro método de conservación.

Los resultados obtenidos con este conservador pueden indicar que la bacteriocina favorece la actividad inhibitoria del lactato contra *B. thermosphacta* y *E. coli*, lo que puede proporcionar buenos resultados en alguna aplicación en productos cárnicos, ya que además de que ambos conservadores son naturales, se disminuye la sensación de consumir productos con un alto contenido de conservadores químicos.

El nitrato de sodio presentó un efecto bactericida para las tres cepas en estudio (*B. thermosphacta*, *E. coli* y *L. innocua* cuando se utilizó la concentración más alta (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). En la figura 5 se demuestra que la combinación de nitrito de sodio con la bacteriocina es de tipo sinérgico con una CFII=0.25, además el perfil de los tres microorganismos en estudio fue el mismo en presencia de los conservadores, encontrándose dos combinaciones en las que se tiene el efecto antimicrobiano (50 y 3125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 50 y 6250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los resultados obtenidos en estas combinaciones se encuentran a la mitad del límite máximo permitido de 100  $\mu\text{g}/\text{g}$  de nitritos o nitratos adicionados a la formulación total de un producto, de acuerdo al panel de expertos en nitritos y nitrosaminas (Food Safety and Quality Service, 1978).

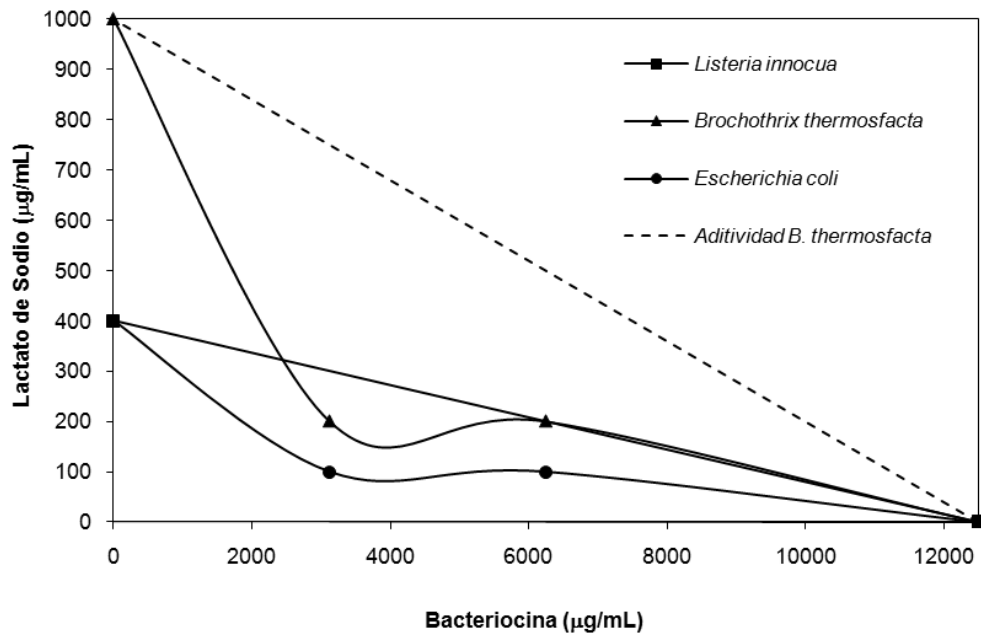


Figura 4. Isoblograma de la combinación lactato de sodio-bacteriocina para *B. thermosphacta*, *E. coli* y *L. innocua*.

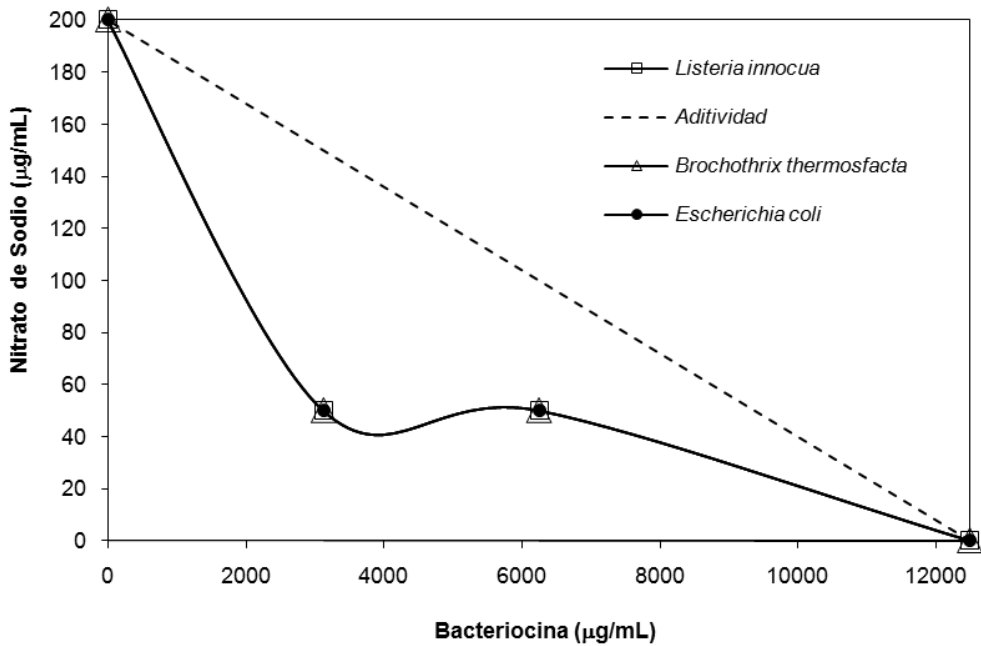


Figura 5. Isoblograma de la combinación de nitrato de sodio-bacteriocina para *B. thermosphacta*, *E. coli* y *L. innocua*.

## Conclusiones

Todos los antimicrobianos en estudio presentaron un efecto sinérgico, cuando fueron combinados con la bacteriocina contra *Brochothrix thermosphacta* y *Escherichia coli*, con excepción de lactato de sodio que tuvo un efecto aditivo contra *Listeria innocua*. Finalmente se puede decir que la construcción de isobogramas es una herramienta de fácil interpretación comparada con otras metodologías similares empleadas en el área de alimentos, por lo que tiene un gran potencial para aplicarla en el diseño de mezclas de conservadores.

## Agradecimientos

Este estudio forma parte del proyecto “Caracterización molecular de bacteriocinas y su inclusión en el diseño de empaques biodegradables con actividad antimicrobiana”, apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, SEP-CONACYT, con el número de registro 2008-105870.

## Bibliografía

- ADAMS, M.R., MOSS, M.O. 2008. Bacterial agents of food-borne. Capítulo 7 en: Food microbiology, Guildford, RSC Publishing, pp. 216-218.
- ALVARADO, C., GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.E., MARTIN, S.E., REGALADO, C. 2005. Anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan Mexican-style cheese. Current Microbiology 51: 110-115.
- ÁLVAREZ CISNEROS, Y.M. 2008. Identificación de bacteriocinas producidas por *Enterococcus* sp. aislados de productos cárnicos. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, México.
- ÁLVAREZ-CISNEROS, Y. M., FERNANDEZ, F.J., WACHER-RODARTE, C., AGUILAR, M.B., SAINZ-ESPUÑES, T.R., PONCE-ALQUICIRA, E. 2010. Biochemical characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Enterococcus faecium* MXVK29, isolated from Mexican traditional sausage. Journal of Science Food and Agriculture 90: 2475-2481.
- ARYSA ARGENTINA S.A. 2010 Aditivos para la industria alimentaria. URL: <http://www.arysa.com.ar/productos.html>. Fecha de Actualización: 20/04/2008, fecha de acceso: 02/03/2010.

- BERENBAUM, M.C. 1978. A method for testing for synergy with any number of agents. *The Journal of infectious diseases* 137:122-130.
- BHUNIA, A.K., JOHNSON, M.C., RAY, B., KALCHAYANAD, N. 1991. Mode of action of pediocinACh on sensitive bacterial strains. *Journal of Applied Bacteriology* 70: 25:33.
- BRUHN, C.M. 2002. Consumer attitudes toward food additives. Capítulo 6 en: *Food additives*. A.L. Branen, P.M. Davidson y S. Salminen (Editores), New York, Marcel Dekker. pp 101 - 120.
- CASTRO, A., BEN OMAR, N., LUCAS, R., ABRIOUEL, H., GARCÍA, M. T., MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M., PÉREZ-PULIDO, R., GRANDE, M.J., GÁLVEZ, A. 2004. El género *Enterococcus* en microbiología de alimentos, Universidad de Jaen. pp 81-82.
- CHIKINDAS, M.L, CHI-ZHANG, Y., YAM, K.L. 2004. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *International Journal of Food Microbiology* 59: 3577-3584.
- CLEVELAND, J., MONTVILLE, T.J., NES, I.F., CHIKINDAS, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1-20.
- COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, R.P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Microbiology Reviews* 3: 777-788.
- DAVIDSON, P.M. Y PARISH, M.E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology* 43: 148-155.
- DAVIDSON, P.M., JUNEJA, V.K.,BRANEN, J.K. 2002. Antimicrobials Agents. Capítulo 20 en: *Food additives*. A.L. Branen, P.M. Davidson y S. Salminen (Editores), New York, Marcel Dekker, pp 582 - 591.
- DE KWAADSTENIET, M., TODOROV, S.D. KNOETZE, H., DICKS, L.M.T. 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus munditii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 105: 433-444.
- DRIDER, D., FIMLAND, G., HÉCHARD, Y., MCMULLEN, L.M., PRÉVOST, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 564-582.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION 1988. Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as direct human food ingredient. *Federal Register*. 53, April 6.

- FOOD SAFETY AND QUALITY SERVICE. 1978. Final report on nitrites and nitrosamines. Report to the secretary of agriculture by the expert panel on nitrites and nitrosamines. U. S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- GLASS, K. A., GRANBERG, D. A., SMITH, A.L., MCNAMARA, A. M., HARDIN, M., MATTIAS, J., LADWING, K., JOHNSON, E.A. 2002. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by sodium diacetate and sodium lactate on wieners and cooked bratwurst. *Journal of Food Protection* 65:116-123.
- JAY, J.M. 2000. *Modern Food Microbiology*, Maryland, Aspen Publishers Inc, pp. 20-24, 294, 325, 334, 394, 485.
- JEFFREY, W.H., CUSKEY, S.M., CHAPMAN, P.J., RESNICK, S., OLSEN, R.H. 1992. Characterization of *Pseudomonas putida* mutants unable to catabolize benzoate: cloning and characterization of *Pseudomonas* genes involved in benzoate catabolism and isolation of a chromosomal DNA fragment able to substitute for *xy/S* in activation of the TOL lower-pathway promoter. *Journal of Bacteriology* 174: 4986-4989.
- KATLA T., NETERSATD K., VANCANNEYT M., SWINGS J., AXELSSON L. 2003. Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to Sakacin P, Sakacin A, Pediocin PA-1, and Nisin. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4431-4473.
- KLAENHAMMER, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12: 39-86.
- LINE, J.E., SVETICH, E.A., ERUSLANOV, B.V., PERELYGIN, V.V., MITSEVICH, E.V. MITSEVICH, I.P., LEVEHUK, V.P., SVETICH, O.E., SEAL, B.S., SIRAGUSA, G.R., STERN, N.J. 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 1094-1100.
- LONG, A.R., BARKER, S.A. 1999. Antimicrobial compounds en: *Wiley encyclopedia of food science and technology*. F.J. Francis (Editor). U.S.A. Wiley and Sons, pp. 65-66.
- LÜCK, ERICH, JAGER M. 1999. Nitritos. Capitulo 10 en: *Conservación química de los alimentos*. Editorial Acribia, España, pp 111-118.
- MARTÍN-PLATERO, A.M., VALDIVIA, E., RUIZ-RODRÍGUEZ, M., SOLER, J.J., MARTÍN-VIVALDI, M., MAQUEDA, M. Y MARTÍNEZ-BUENO, M. 2006. Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the



- hoopoe (*Upupaepops*). *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4245-4249.
- NETTLES, C.G. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 56: 338-356.
- SCHILLINGER, U., LÜCKE, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 1901-1906.
- SHTENBERG, A.I. 1973. Toxicity of nisin. *Food and Cosmetic Toxicology* 11: 352.
- SMITH, J., HONG-SHUM, L. 2003. *Food additives data book*. Blackwell, Great Britain, pp. 732-815.
- THAYER, R. R., WHEELIS, M.L. 1976. Characteristics of a benzoate permease mutant of *Pseudomonas putida*. *Archives of Microbiology* 110: 37-40.
- THAYER, R. R., WHEELIS, M.L. 1982. Active transport of benzoate in *Pseudomonas putida*. *Journal of General Microbiology* 128: 1749-1752.
- TOMINAGA, T., HATAKEYAMA, Y. 2006. Determination of essential and variable residues in pediocin PA-1 by NNK scanning. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1141-1147.
- TOMP KING R.B. 2005. Nitrite. Capítulo 6 en: *Antimicrobials in food*. P.M. Davison, J.N. Sofos yA.L. Branen (Editores), Florida, Taylor and Francis Group, pp. 171-218.