UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Industrias

Biopreservación de pescado mediante el empleo de bacterias acido lácticas bacteriocinogénicas y de aceites esenciales en fase vapor

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Industrial

Lic. Sofía Belén Delcarlo

Directora de tesis: Dra. Carmen Adriana Campos
Directora Asistente: Dra. Laura Inés Schelegueda
Consejera de estudios: Marina De Escalada Pla

Lugar de trabajo: ITAPROQ (CONICET- Universidad de Buenos Aires), Buenos Aires Ciudad de Buenos Aires, 2022

Biopreservación de pescado mediante el empleo de bacterias acido lácticas bacteriocinogénicas y de aceites esenciales en fase vapor

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la aplicación de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas y de aceites esenciales en fase vapor a pescado refrigerado como estrategias para mejorar su conservación. Para ello, en una primera etapa, se aislaron cepas de bacterias ácido lácticas provenientes del medio marino patagónico, se seleccionaron las productoras de bacteriocinas, se las identificó fenotípica y genotípicamente a nivel de especie y se evaluó la ausencia de factores de virulencia. Se seleccionaron dos cepas con actividad antagonista contra la flora deteriorativa y patógena presente en pescado. Una de las cepas se utilizó como cultivo protector y la bacteriocina producida por la otra se purificó parcialmente. El cultivo protector se incorporó a pasta de merluza (*Merluccius hubbsi*) y la bacteriocina semipurificada a trozos de salmón rosado (*Oncorhynchus kisutch*).

En una segunda etapa, se evaluó la capacidad de aceites esenciales y de sus mezclas en fase vapor para inhibir el crecimiento de la flora deteriorativa y patógena presente en pescado. Se seleccionaron mezclas sinérgicas, se evaluó su composición y se aplicaron en filetes de merluza solos y junto con la cepa bacteriocinogénica como cultivo protector.

Todas las cepas bacteriocinogénicas aisladas resultaron ser *Enterococcus mundtii*, y ninguna presentó factores de virulencia siendo aptas para su aplicación en alimentos. Las cepas seleccionadas fueron *E. mundtii* STw38 y STw66. La cepa STw38, al ser incorporada como cultivo protector controló durante 6 días el crecimiento de la microbiota nativa presente en pasta de merluza refrigerada. La bacteriocina semipurificada de la cepa STw66 se aplicó mediante aspersión a filetes de salmón logrando controlar el crecimiento de *L. innocua* por 3 días.

Los aceites esenciales en fase vapor demostraron actividad antagonista sobre la flora nativa del pescado. Al ser aplicados en filetes de merluza, una mezcla sinérgica de orégano y lemongrass fue la más adecuada. Adicionalmente, esta mezcla tuvo una buena aceptabilidad sensorial. Finalmente, al combinar la mezcla de aceites esenciales junto con la cepa *E. mundtii* STw38 como cultivo protector, se obtuvo una disminución del recuento total de bacterias por 7 días.

Las estrategias de conservación aplicadas muestran resultados promisorios que contribuyen al mejoramiento de la conservación del pescado.

Palabras Clave: bacterias ácido lácticas, biopreservación, pescado, aceites esenciales en fase vapor.

Fish biopreservation by lactic acid bacteria and essential oils on vapor phase

ABSTRACT

The objective of the present study was the application of lactic acid bacteria (LAB) which produce bacteriocins and essential oils (EO) on vapor phase to refrigerated fish as strategies to improve its shelf life. To do so, on a first stage, LAB strains were isolated from the Patagonian marine environment, the bacteriocinogenic ones were selected, identified genotypically and phenotypically to a species level, and the presence of virulence factors was assessed. Two strains with antagonist activity were selected to inhibit the growth of spoilage and pathogenic bacteria present in fish. One of them was applied as a protective culture, and the other one's bacteriocins were partially purified. The protective culture was applied to hake paste (*Merluccius hubbsi*) and the semi purified bacteriocin was applied to pieces of pink salmon (*Oncorhynchus kisutch*).

On a second stage, the capacity of EO and mixtures on vapor phase were assessed to inhibit spoilage and pathogen microorganisms present in fish. Synergic mixtures were selected, their composition was assayed and were applied to hake fillets alone, and together with the bacteriocinogenic strain as protective culture.

All isolated bacteriocinogenic strains were *Enterococcus mundtii,* and none of them presented virulence factors, being safe to apply on food. The selected strains were *E. mundtii* STw38 y STw66. The strain STw38 when incorporated as protective culture could control the growth of fish indigenous biota. The semi purified bacteriocin produced by the strain STw66 was applied by aspersion to salmon fillets and controlled the growth of *L. innocua* for 3 days.

The EO in vapor phase showed antagonist activity on fish indigenous biota. When applied to hake fillets, a synergic mixture of oregano and lemongrass was the most adequate. Additionally, this synergic mixture had a good sensorial acceptability. Finally, when combining the EO mixture with the bacteriocinogenic strain *E. mundtii* STw38 as a protective culture, a diminishment of the total count of bacteria was obtained for 7 days.

The preservation techniques applied show promising results that contribute to the improvement of fish preservation.

Key words: lactic acid bacteria, biopreservation, fish, essential oils on vapor phase.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado la beca para realizar la presente tesis. A la Universidad de Buenos Aires, y en particular al ITAPROQ por permitir mi formación, y ser, por muchos años un segundo hogar.

A la Dra. Carmen Adriana Campos, mi gran directora, que sin importar cuántos errores no forzados aparecieran en el camino, siempre confió en mí impulsándome a encontrar mi mejor versión en el laboratorio, para que no bajara los brazos. A la Dra. Laura Inés Schelegueda, por ser mi directora asistente, y mi eterna compañera en el laboratorio; por su paciencia, dedicación e infinita capacidad de síntesis, por ser la persona con la mente más enfocada en objetivos que jamás haya conocido. A ambas, no sólo por lo que conlleva el trabajo académico estrictamente, sino también, por su calidez como seres humanos y su excelente predisposición, siempre accesibles, siempre colaborando, siempre las 3 siendo un gran equipo.

A la Dra. Marina de Escalada Pla, mi consejera de estudio, gracias por todos los consejos y ayudas a lo largo de toda la tesis.

A la Dra. Lía Noemí Gerschenson, directora del grupo de investigación, por su apoyo e interés constante.

A todos mis compañeros del LOCAP, sin ellos esta tesis no hubiera tenido ni la mitad de los colores y alegrías que representó el proceso. Porque gracias a ellos, días que parecían interminables se me pasaban rápido, siempre dispuestos a dar una mano, un mate, alguna técnica para cuantificar algo. Gracias por esta aventura compartida.

A la Dra. Marisol Vallejo y al Dr. Emilio Marguet por haberme recibido en su laboratorio y enseñarme tanto en mis primeros pasos en el doctorado, por la infinita calidez, paciencia y sentido del humor, hoy ya 6 años después, me acuerdo de cada día.

Ao pessoal do Brasil: Dra. Elaine de Martins, Marita, Evelyn, Marilla, Jefferson. Eu agradeço a todos pela ajuda todos os dias, a capacidade de mi ensinar coisas novas do laboratório, da língua portuguesa, do brasil e da vida. Sou muito grata por cada café e, principalmente por cada bolo compartilhado com vocês.

A toda mi familia, desde mis padres, mis hermanos, tíos, abuelos, primos; porque sin ellos no sería lo que soy hoy, y esta tesis jamás hubiera sucedido. Porque debo a mi familia la vida, y las infinitas posibilidades que conlleva. Gracias a todos por aguantarme en momentos buenos y malos, y por escuchar la palabra tesis y bacterias ácido lácticas hasta el hartazgo.

A mis amigos, a mi familia del corazón, a todos aquellos que formaron parte de mi vida por mucho tiempo, por semanas, por meses, por años. A todas las personas que me acompañan día a día, nutriéndome, dándome ganas de seguir creciendo y experimentando.

Por último, a Ale, gracias por aparecer en mi vida, por ser vos, por acompañarme y darme el lugar para que pueda ser mi mejor versión, en cada momento, con tantísimo amor y dulzura.

Gracias, gracias, gracias.

Lic. Sofía Belén Delcarlo

Índice

1. Introducción general 1

1.1 Preservación de alimentos 2

1.2 Pescado 4

1.2.1 Valor nutricional 5

1.2.2 Consumo en Argentina 5

1.2.3 Cambios *post mortem* 6

1.2.3.i Rigor mortis 6

1.2.3.ii Reacciones autolíticas 6

1.2.3.iii Reacciones de oxidación e hidrólisis lipídica 7

1.2.3.iv Reacciones mediadas por microorganismos 8

1.2.4 Métodos de preservación aplicados al pescado 10

2. Objetivos 16

2.1 Objetivos generales 17

2.2 Objetivos particulares 17

3. Materiales y Métodos Generales 19

3.1 Detalle del equipamiento utilizado 20

3.2 Detalle de reactivos y preservadores utilizados 20

3.3 Otros materiales 21

3.4 Medios de cultivo, condiciones de incubación y recuentos 21

3.4.1 Medios de cultivo 21

3.4.2 Suplementos de antibióticos 22

3.4.3 Medios de cultivo, condiciones de incubación y de conservación para cada bacteria utilizada 22

3.4.4 Técnica para la realización de recuentos 23

3.4.5 Medios de cultivo y condiciones de recuentos 23

3.5 Análisis estadístico de los resultados 24

Capítulo I: Del aislamiento de cepas bacteriocinogénicas a su aplicación 25

I.1 Introducción 26

I.1.1 Biopreservación mediante el uso de bacterias ácido lácticas 26

I.1.2 Compuestos con actividad antimicrobiana 27

I.1.3 Principales géneros de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas 27

I.1.3.i Evaluación de su seguridad para la aplicación en alimentos 28

I.1.4 Género *Enterococcus* 29

I.1.5 Clasificación de bacteriocinas 32
I.1.6 Técnicas *in vitro* para la detección de bacteriocinas 35
I.1.6.i Técnicas de difusión en agar 35
I.1.6.ii Técnicas de dilución en medio líquido 36
I.1.7 Aplicación de bacterias ácido lácticas en la preservación de pescado como cultivos protectores 36
I.2 Objetivos 39
I.2.1 Objetivos generales ..... **¡Error! Marcador no definido.**
I.2.2 Objetivos particulares 39
I.3 Materiales y Métodos 41
I.3.1 Aislamiento y selección de bacterias ácido lácticas con actividad antagonista frente a *L. innocua* 41
I.3.1.i Aislamiento de bacterias ácido lácticas de la costa patagónica 41
I.3.1.ii Selección de cepas con actividad antimicrobiana 43
I.3.1.ii.a Producción del sobrenadante libre de células 43
I.3.1.ii.b Ensayo de difusión en agar 44
I.3.2 Identificación fenotípica y genotípica de las bacterias ácido lácticas seleccionadas 45
I.3.3 Determinación de factores de virulencia de las cepas seleccionadas 46
I.3.4 Caracterización de la actividad antagonista y selección de cepas 49
I.3.4.i Detección de genes que codifican para la producción de bacteriocinas 49
I.3.4.ii Contribución del peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos a la actividad antagonista de los sobrenadantes libre de células 50
I.3.4.iii Sensibilidad a enzimas 51
I.3.4.iv Determinación de la actividad del sobrenadante libre de células sobre *L. innocua* y flora deteriorativa de pescado 51
I.3.4.v Selección de cepas con mayor actividad antagonista: cuantificación de la actividad del sobrenadante libre de células 52
I.3.5 Optimización de la producción del sobrenadante libre de células 52
I.3.6 Determinación del tipo de interacción existente entre sobrenadantes libres de células de las cepas seleccionadas 53
I.3.7 Selección de bacterias ácido lácticas para aplicación como cultivo protector: crecimiento y producción de bacteriocinas durante el almacenamiento a 4 °C 55
I.3.8 Aplicación de *E. mundtii* STw38 para la preservación de pasta de merluza 56
I.3.8.i Preparación de la pasta de merluza 56
I.3.8.ii Preparación de los sistemas 57
I.3.8.iii Análisis microbiológicos 58
I.3.8.iv Determinación de producción de bacteriocinas *in situ* 58
I.3.9 Análisis estadístico 59

I.4 Resultados y discusión 60
I.4.1 Aislamiento y preselección de bacterias ácido lácticas con actividad antagonista frente a *L. innocua* 60
I.4.2 Identificación fenotípica y genotípica de las bacterias seleccionadas 64
I.4.3 Determinación de factores de virulencia 66
I.4.4 Caracterización de la actividad antagonista 67
1.4.4.i Determinación de genes que codifican para la producción de bacteriocinas 67
I.4.4.ii Producción de peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos y sensibilidad a enzimas 69
I.4.4.iii Actividad de los sobrenadantes libes de células contra microorganismos indicadores 69
I.4.4.iv Selección de cepas con mayor actividad antagonista: Cuantificación de actividad inhibitoria contra *L. innocua* y *L. plantarum* 71
I.4.5 Condiciones óptimas de producción del sobrenadante libre de células 73
I.4.6 Interacción entre los sobrenadantes libres de células de las cepas seleccionadas 76
I.4.7 Selección de bacterias ácido lácticas para utilizar como cultivo protector en condiciones de refrigeración 77
I.4.8 Aplicación de *E. mundtii* STw38 para la preservación de pasta de merluza 81
I.5 Conclusiones 86
Capítulo II: Semipurificación de bacteriocinas para su aplicación en piezas de salmón 88
II.1 Introducción 89
II.1.1 Purificación de bacteriocinas: ventajas y desventajas 89
II.1.2 Medios de cultivo utilizados para producir bacteriocinas 90
II.1.3 Perspectiva actual de la producción y aplicación de bacteriocinas en alimentos 90
II.1.4 Técnicas de purificación de bacteriocinas 91
II.1.4.i Técnicas utilizadas en las primeras etapas 92
II.1.4.ii Técnicas utilizadas en las etapas intermedias 93
II.1.4.iii Técnicas usadas en las etapas finales 93
II.1.4.iv Confirmación de la purificación de la bacteriocina 94
II.1.5 Aplicaciones de bacteriocinas purificadas o semipurificadas en productos de la pesca 94
II.2 Objetivos 97
II.2.1 Objetivos generales 97
II.2.2 Objetivos particulares 97
II.3 Materiales y Métodos 98
II.3.1. Selección de la cepa para realizar la purificación parcial del sobrenadante libre de células 98

II.3.2 Purificación parcial del sobrenadante libre de células seleccionado por medio de una columna de intercambio iónico y un cartucho de extracción en fase sólida..... 99
II.3.2.i Pruebas de estabilidad de la actividad del sobrenadante libre de células en presencia de los solventes a utilizar y del ajuste de pH a 2,0..... 99
II.3.1.ii Purificación por medio de una columna con relleno de interacción hidrofóbica .. 100
II.3.1.ii.a Evaporación del solvente de las alícuotas con actividad……..101
II.3.1.ii.b *Evaluación de la composición de la primera etapa de purificación*…….101
II.3.2.iii Purificación por medio de un cartucho de extracción en fase sólida 102
II.3.2.iv Técnicas empleadas en el seguimiento de la purificación..... 103
II.3.2.iv.a *Formación del perfil cromatográfico de la purificación*……103
II.3.2.iv.b *Evaluación de la actividad antagonista de las alícuotas eluidas de la columna de purificación*……...103
II.3.2.iv.c *Determinación del perfil proteico por medio de geles de poliacrilamida*...104
II.3.2.iv.c.1 *Tinción de plata para proteínas*……105
II.3.2.iv.d *Determinación de la concentración de proteínas de las muestras por medio de la técnica de Bradford*……106
II.3.2.v Cálculo de rendimientos de la purificación..... 106
II.3.2.vi Aproximación del peso molecular de las bacteriocinas presentes en el SLC . 107
II.3.3 Purificación parcial por medio de le técnica de adsorción-desorción.....109
II.3.3.i Obtención del SLC y el pellet 109
II.3.3.ii Etapas del proceso de purificación parcial..... 109
II.3.3.iii Evaluación preliminar del pH de adsorción de las bacteriocinas a las células productoras…… 112
II.3.3.iii.a Acondicionamiento de las células…….…….. 112
II.3.3.iii.b Optimización del pH de adsorción…….. 112
II.3.3.iv Selección del pH de adsorción y desorción 113
II.3.3.v Análisis de la temperatura y proporción bacteria-sobrenadante libre de células, para optimizar la extracción de bacteriocinas..... 114
II.3.3.vi Técnica de Lowry para la cuantificación de proteínas..... 115
II.3.4 Aplicación de las bacteriocinas semipurificadas en piezas de salmón rosado 116
II.3.4.i Optimización de las condiciones de aplicación del pulverizador 116
II.3.4.ii Preparación de las muestras 117
II.3.4.iii Masa de bacteriocina aplicada..... 118
II.3.4.iv Análisis microbiológicos..... 118
II.3.5 Análisis estadístico.....118
II.4 Resultados y discusión..... 119
II.4.1 Selección de bacterias ácido lácticas para la purificación del sobrenadante libre de células 119

II.4.2 Purificación parcial del sobrenadante libre de células de la cepa seleccionada por medio de una columna de interacción hidrofóbica y un cartucho de extracción en fase sólida 121
II.4.2.i Estabilidad de las bacteriocinas en presencia de diferentes solventes y a pH 2,0. 121
II.4.2.ii Purificación en una columna de interacción hidrofóbica..... 121
II.4.2.iii Determinación del perfil proteico en cromatografía líquida AKTA..... 125
II.4.2.iv Purificación en un cartucho de extracción en fase sólida..... 126
II.4.2.v Tabla de purificación 127
II.4.2.vi Estimación del peso molecular de la bacteriocina..... 128
II.4.3 Purificación parcial por medio de la técnica de adsorción desorción 131
II.4.3.i Evaluación preliminar del pH de adsorción..... 131
1.4.3.ii Selección del pH de adsorción y desorción 132
II.4.3.ii Elección de la temperatura y proporción del sobrenadante libre de células:bacterias 133
II.4.3.iii Concentración de proteínas en cada etapa de la purificación y tabla de purificación..... 135
II.4.4 Comparación de las técnicas de purificación evaluadas 138
II.4.5 Aplicación de bacteriocinas semipurificadas en piezas de salmón 139
II.4.5.i Condiciones de aplicación del pulverizado 139
II.4.5.ii Masa de bacteriocinas semipurificadas aplicada 140
II.4.5.iii Calidad microbiológica..... 140
II.5 Conclusiones 142
Capítulo III: Determinación de la actividad antagonista de aceites esenciales en fase vapor y su aplicación en filetes de merluza frescos 143
III.1 Introducción 144
III.1.1 Generalidades sobre la composición química de los aceites esenciales..... 144
III.1.2 Funcionalidad de los aceites esenciales en alimentos 145
III.1.3 Interacción de los aceites esenciales con componentes presentes en los alimentos . 149
III.1.4 Formas de aplicación en alimentos..... 150
III.1.5 Combinación de los aceites esenciales con otras técnicas de preservación..... 150
III.1.6 Aplicación de aceites esenciales en productos de la pesca..... 151
III.2 Objetivos..... 153
III.2.1 Objetivos generales 153
III.2.2 Objetivos particulares 153
III.3 Materiales y Métodos 155
III.3.1 Evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro*..... 155
III.3.1.i Screening de la actividad antimicrobiana..... 155
III.3.1.ii Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales..... 155

III.3.1.iii Concentración fraccionaria inhibitoria de mezclas de aceites esenciales contra *L. innocua* y *S. putrefaciens* 156
III.3.1.iv Acción de los AE sobre la hidrofobicidad de la pared celular de *L. innocua* y *S. putrefaciens* 157
III.3.1.v Evaluación de la supervivencia de *E. mundtii* STw38 y su capacidad para inhibir el crecimiento de *L. innocua* en presencia de aceites esenciales en fase vapor 158
III.3.2 Análisis químico de la composición de los aceites esenciales seleccionados 159
III.3.3 Aplicación de los antimicrobianos estudiados en filetes de merluza 160
III.3.3.i Preparación de los sistemas 160
III.3.3.ii Análisis microbiológicos 161
III.3.3.iii Análisis sensorial 161
III.3.4 Análisis estadístico 162
III.4 Resultados y discusión 163
III.4.1 Evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro* 163
III.4.1.i Screening de actividad antimicrobiana *in vitro* y concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales 163
III.4.1.ii Concentración fraccionaria inhibitoria de mezclas de aceites esenciales sobre *L. innocua* y *S. putrefaciens* 164
III.4.1.iii Acción de los aceites esenciales sobre la hidrofobicidad superficial de *L. innocua* y *S. putrefaciens* 165
III.4.1.iv Evaluación de *E. mundtii* STw38 para aplicar como cultivo protector en presencia de aceites esenciales en fase vapor 166
III.4.2 Análisis químico de la composición de los aceites esenciales seleccionados 167
III.4.3 Aplicación de los antimicrobianos estudiados en filetes de merluza 169
III.4.3.i Análisis microbiológico 169
III.4.3.ii Análisis sensorial 171
III.5 Conclusiones 173
Conclusiones 174
Bibliografía 179

Introducción general

1. Introducción general

1.1 Preservación de alimentos

La preservación de alimentos se entiende como los procesos o técnicas utilizadas para mantener bajo control los factores intrínsecos y extrínsecos que permiten el desarrollo de microorganismos patógenos o causantes de deterioro. Su principal objetivo es extender la vida útil, manteniendo los valores nutricionales y las propiedades sensoriales del alimento conservado (Amit *et al.,* 2017). Este concepto, si bien es relevante *per se* en cuanto a la inocuidad alimentaria, también, en una escala mayor, puede prevenir la generación de desperdicios en la industria productora de alimentos y contribuir a la adecuada nutrición de todos los individuos (Corrado y Sala, 2018).

Existen numerosas técnicas para preservar alimentos, dentro de las cuales se puede destacar la refrigeración y la congelación, el envasado al vacío o en atmósferas modificadas y controladas, el uso de aditivos, o estrategias que provienen de la antigüedad, tales como el salado, la fermentación o la adición de hierbas y especias (Rasooli, 2017). De esta manera lo que se ha logrado a lo largo del tiempo son productos con una mayor vida útil, pero en muchos casos a expensas de grandes cambios con relación a los alimentos sin procesar. Esto representa una limitación ya que, en la actualidad, los consumidores prefieren productos menos procesados y con las características sensoriales del alimento fresco.

La tendencia en el presente se vuelca hacia la aplicación de distintos factores de conservación en forma combinada. Esto es debido a que el uso de un solo factor de conservación severamente puede dañar el valor nutricional y las propiedades sensoriales del alimento, como ocurre en el caso de un alimento comercialmente estéril (Ortiz *et al.,* 2014). La preservación por medio de factores combinados se basa en poner en riesgo la homeostasis de las células bacterianas, utilizando diferentes factores de preservación con un nivel de severidad menor tal que actúen de forma aditiva o sinérgica (Alzamora *et. al.*, 2016). Así, los microorganismos deben generar diferentes ajustes metabólicos para mantener la homeostasis. Esto conlleva a un gasto de energía que dificulta su crecimiento, extendiendo su fase de latencia o bien, si no logran realizar los ajustes metabólicos necesarios, se producirá la muerte celular. En la Figura 1, se puede observar un ejemplo de la tecnología de obstáculos aplicada a pescado, que será el alimento que se busca preservar en esta tesis. Adicionalmente, las técnicas seleccionadas pueden ser dirigidas a ciertos microorganismos, como, por ejemplo, una disminución leve de la actividad de agua,

que afecta severamente el desarrollo de bacterias patógenas. Algunos ejemplos de estas técnicas incluyen la adición de atmósfera modificada junto con refrigeración y adición de antimicrobianos de origen natural, o tratamientos térmicos moderados junto con descenso de pH o actividad de agua (Tsironi *et al.,* 2020).

Figura 1: Esquema de la tecnología de obstáculos aplicada a pescado y su acción sobre los microorganismos.

La técnica de obstáculos resulta también de interés para minimizar el uso de conservantes sintéticos, reemplazando su alta efectividad por medio de una sumatoria de técnicas naturales. Esto es de gran importancia ya que, si bien los conservantes sintéticos cumplen con su función, pueden generar problemas en la salud de los consumidores (Gelboin, 2012). Por ejemplo, los sulfitos pueden generar respuestas pseudo alérgicas moderadas o severas. Desde el año 1986 la Food and Drug Administration (FDA) prohibió su aplicación en frutas frescas, pero aún siguen estando permitidos en otros alimentos, aunque su uso se debe informar con el nombre completo en el rótulo (Johnston *et al.,* 1994). Otros ejemplos incluyen a los nitritos, los que bajo determinadas condiciones conducen a la formación de nitrosaminas que son compuestos carcinogénicos (Luther, 2006). Finalmente, cabe mencionar los antioxidantes sintéticos Butilhidroxianisol (BHA) y Butilhidroxitolueno (BHT) que pueden generar reacciones alérgicas y son potenciales carcinogénicos (Gupta *et al.,* 2011).

Además de los efectos adversos en la salud provocados por los conservantes químicos, existe una tendencia de la población a buscar productos más naturales. Una encuesta realizada por *Nielsen Global Health and Wellness* (2015), en 60 países e involucrando más de 30.000 consumidores, reveló que los atributos más deseables a la hora de elegir qué alimentos consumir eran: la frescura, aspecto natural y mínimo procesamiento. A su vez, se destaca que la percepción “como natural”, involucra tanto la falta de aditivos, como la forma de cultivo, es decir, una producción “a la vieja usanza” (Román *et al.,* 2017).

Con la finalidad de cumplir con las demandas de los consumidores y de mejorar la inocuidad de los alimentos, desde la década de los 90 el concepto de la biopreservación viene cobrando relevancia. Esta puede ser definida como la aplicación de compuestos producidos o pertenecientes a microorganismos, plantas o animales para extender la vida útil de los alimentos. Los mismos poseen la ventaja de considerarse, en muchos casos, aptos para el consumo humano debido a un historial de uso seguro y pueden aportar al alimento, un valor agregado debido a propiedades tales como: antioxidantes, probióticos o prebióticos (Aymerich *et al.,* 2019;; Gómez-Sala *et al.,* 2016; Schelegueda *et al.,* 2015). Estos compuestos pueden ejercer múltiples funciones, por ejemplo, los microorganismos o bien los metabolitos que ellos producen pueden actuar como antimicrobianos y probióticos. Los extractos de especímenes vegetales pueden ejercer actividad antimicrobiana, antioxidante y en algunos casos presentan actividad anti carcinogénica, antiinflamatoria, antihipertensiva, hipocolesterolémica e inmunomodulatoria, entre otras funciones biológicas (Görgüç *et al.,* 2020; Lešnik *et al.,* 2021; Szopa *et al.,* 2017). Finalmente, los antimicrobianos de origen animal tales como el quitosano, pueden promover el descenso de peso, disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y modular el sistema inmune (Dong *et al.,* 2019). Es decir que, el uso de la biopreservación, puede contribuir tanto a mejorar la vida útil de los alimentos, así como su calidad.

Dado el panorama mencionado, en la presente tesis se empleará la biopreservación utilizando bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de bacteriocinas y aceites esenciales para prolongar la vida útil de pescado, alimento cuyas características se comentan a continuación.

1.2 Pescado

El pescado, junto a otros organismos acuáticos, son de gran relevancia económica y proveen la seguridad alimentaria a muchas poblaciones costeras. El Código Alimentario Argentino (CAA) en el artículo 270 del Capítulo VI define como productos de pesquería, a: “los peces, crustáceos, moluscos, batracios (ranas), quelonios (tortugas) y las conservas y preparados elaborados con ellos o partes de los mismos, debiendo pertenecer a especies comestibles”.

Dentro de los productos cárnicos son los que más desafíos presentan para su preservación, ya que su deterioro comienza inmediatamente después de la captura debido a las reacciones autolíticas *post mortem* junto con el rápido desarrollo microbiano. Como consecuencia, es de esencial importancia diseñar nuevas técnicas de preservación ya que constituye un alimento de alto valor nutricional y sus desperdicios pueden ser de hasta un

30 % del total de la pesca, únicamente debido al deterioro causado por el desarrollo de microorganismos (Mei *et al.,* 2019).

1.2.1 Valor nutricional

El pescado se considera de un valor nutricional elevado. Considerando una composición aproximada, su carne posee entre un 18 y un 22 % de proteínas y entre un 2 % hasta un 20 % de lípidos. La humedad ronda entre un 70 y un 60 % y el contenido de carbohidratos normalmente es muy bajo. La carne de pescado también se caracteriza por poseer un alto contenido de minerales, que ronda entre un 0,6 y un 1,5 %, dentro de los cuales se destacan macroelementos como potasio, magnesio, calcio, hierro, y microelementos tales como iodo, flúor, magnesio y selenio (Venugopal y Shahidi, 1996). En cuanto a su contenido lipídico, la mayoría de los ácidos grasos presentes son insaturados y poseen una alta cantidad de ácidos grasos de los grupos Ω3 y Ω6, los cuales son imprescindibles para las funciones vitales del organismo. Particularmente, dentro de los ácidos grasos esenciales se encuentran el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA), los cuales participan en cambios tanto bioquímicos como fisiológicos en humanos (Narayan *et al.,* 2006).

1.2.2 Consumo en Argentina

En Argentina el pescado es el tipo de carne menos consumida, a pesar de su economía pesquera activa debido a la extensión del mar argentino y su gran reserva hídrica dulce. El consumo mundial promedio de pescado es de 20 kg/año per cápita, mientras que el argentino es de apenas 5 kg (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2021). Esta cifra resulta aún más llamativa, ya que el consumo anual per cápita de carne es de 70 kg, y el pescado representa menos de un 10 % (Rearte, 2010). Anualmente, durante los últimos 5 años, se exportaron entre 1,5 y 2 millones de toneladas en comparación con el consumo interno que es de apenas de 226.000 toneladas anuales.

El gobierno nacional, en 2018, lanzó un programa llamado “el 19 se come pescado” para incentivar su consumo, pero no se generaron mejoras significativas. Esto es, en parte, debido a la tendencia cultural hacia el consumo de carnes rojas, aunque también pueda existir una falta de conocimiento de los consumidores sobre su elevado valor nutricional, limpieza, preparación, almacenamiento y las recomendaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) sobre su consumo (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2021).

1.2.3 Cambios *post mortem*

Los cambios *post mortem* generados en el pescado suceden de forma muy rápida. Los principales son reacciones autolíticas y mediadas por microorganismos. En el transcurso de estas reacciones se degradan algunos compuestos y se generan otros, que son los responsables de los cambios en el flavor y la textura de la carne de pescado.

1.2.3.i Rigor mortis

Al producirse la muerte del espécimen, se detiene la circulación sanguínea en los músculos, lo cual lleva a que las células utilicen todo el adenosín trifosfato (ATP) de reserva que aún tienen almacenado. Al finalizarse éste, comienza una glicólisis anaeróbica en la cual se degrada el glucógeno a glucosa a ácido láctico, generándose un descenso de pH que desencadena el *rigor mortis,* el cual se vuelve más marcado debido a la unión entre las fibras de miosina y actina. En este proceso, el tejido muscular se vuelve rígido y se contrae, generando desgarros en el fileteado o pérdida de agua en la cocción, dañando la textura (Dunajski *et al.,* 1980). En el caso de proceder al fileteado del espécimen antes del rigor mortis, los filetes adquirirían rigidez y, sin la presencia de la estructura ósea o cartilaginosa, los filetes resultarán de un tamaño mucho menor con malas propiedades texturales (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1999). Con el transcurso del tiempo, el *rigor mortis* se resuelve, ya que la acción de proteasas (principalmente catepsina y calpaína) permite la relajación del músculo que recupera la flexibilidad, pero no la elasticidad. El tiempo que la fibra muscular se encuentre en este estado dependerá del tamaño del pez, nivel de agotamiento al momento de la captura y temperatura a la cual se mantiene (Huss, 1995).

1.2.3.ii Reacciones autolíticas

Luego de la resolución del *rigor mortis*, comienzan las reacciones autolíticas, las cuales están mediadas por enzimas pertenecientes al pescado. En primera instancia, comienza la degradación de compuestos relacionados con el ATP (degradación de nucleótidos) (Figura 2). En esta etapa, se genera hipoxantina y formaldehido, pero no se generan, inicialmente, los componentes con característico aroma a “pescado en mal estado”. Estas reacciones se llevan a cabo de forma totalmente autolítica ya que no se encontraron diferencias entre especímenes al ser esterilizados o no, descartándose así la acción de microorganismos (Fraser *et al.,* 1998). La velocidad de las reacciones autolíticas también está relacionada con la manipulación del pescado, ya que las enzimas se encuentran compartimentadas dentro de las células y a mayor manipulación se liberarán más fácilmente.

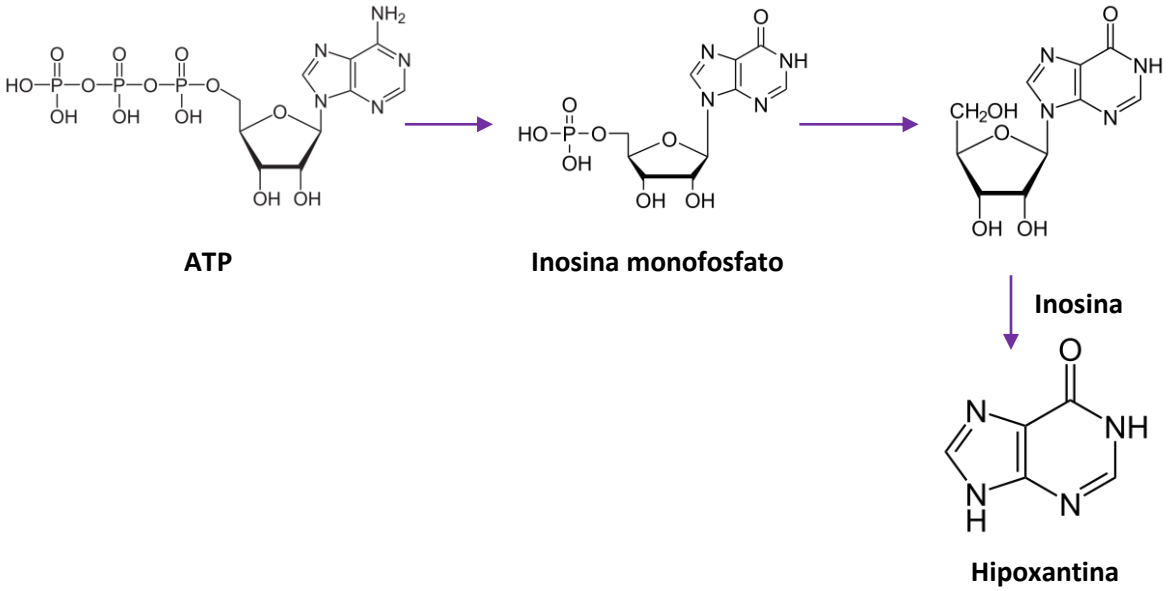


Figura 2: Degradación de ATP en procesos post mortem en el músculo del pescado (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1995).

Las reacciones autolíticas que suceden en segunda instancia son debidas a enzimas proteolíticas -normalmente alojadas en el estómago de los peces- que entran en contacto con las proteínas de la sangre. Ejemplos de estas proteasas serían la catepsina y la calpaína que se encuentran presentes en las células, y se liberan luego del *rigor mortis*, siendo las principales enzimas relacionadas en su resolución. La acción de estas enzimas puede llevar a la producción de bases volátiles libres y también de aminas biogénicas bajo malas condiciones de preservación. Las bases volátiles libres son las responsables del aroma “a podrido” característico del pescado y constituyen un indicador general de su calidad para el consumo (Gram y Dalgaard, 2002). La ocurrencia de proteólisis al generar aminoácidos libres en el músculo del pescado favorece el desarrollo de microorganismos (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2005).

1.2.3.iii Reacciones de oxidación e hidrólisis lipídica

En cuanto a la degradación de los lípidos existen dos mecanismos principales: la oxidación y la hidrólisis. Estos procesos son significativos en pescados con alto contenido de lípidos, ya que en su composición predominan los ácidos grasos insaturados, los cuales son altamente propensos a la oxidación y pueden ser hidrolizados con facilidad (Ikape, 2018).

La oxidación se produce por medio de un proceso de radicales libres en tres etapas: iniciación, propagación y terminación. En la iniciación se generan radicales libres debido a la catálisis por calor, iones metálicos o irradiación, los cuales reaccionan con el oxígeno para

generar radicales peróxido. Durante la propagación, estos últimos interaccionan con otras moléculas lipídicas para formar hidroperóxidos y un nuevo radical libre. Finalmente, la terminación ocurre cuando dos radicales libres reaccionan para dar un compuesto no radicalario. Este proceso puede darse debido a factores abióticos como ya se mencionó, o puede deberse a la acción de enzimas tanto presentes en los tejidos del pescado, como generadas por microorganismos. Los hidroperóxidos que se generan en grandes cantidades en las primeras etapas de la oxidación no generan aromas desagradables. Como resultado de este mecanismo de deterioro se forman ácidos grasos libres, los cuales son responsables de aromas rancios junto con productos tardíos de la oxidación, tales como aldehídos, cetonas, alcoholes y alcanos de bajo peso molecular (Undeland *et al.,* 2005).

En cuanto a la hidrólisis de los compuestos lipídicos, ésta puede originarse por la acción de enzimas endógenas o microbianas generando ácidos grasos libres, al igual que en la oxidación, como se mencionó anteriormente. Las principales enzimas endógenas son lipasas pertenecientes al tracto gastrointestinal, por lo cual resulta de una importancia vital eviscerar los especímenes de pescado inmediatamente después de su captura. La presencia de estos lípidos de cadenas medianas y cortas, pueden generar sabores "jabonosos" (Alexandraki *et al.,* 2013).

1.2.3.iv Reacciones mediadas por microorganismos

El desarrollo de microorganismos sucede de manera muy rápida debido a la alta proporción de compuestos nitrogenados libres de fácil fermentación presentes en el tejido (Zhuang *et al.,* 2021).

La composición de la flora del pescado fresco dependerá de las condiciones del agua donde éste se capture, tales como la temperatura, concentración salina y nivel de contaminación. La microbiota perteneciente al pescado es predominantemente Gram negativa, con excepción de la de los peces capturados en climas tropicales que suelen tener una mayor predominancia de bacterias Gram positivas (Al Bulushi *et al.,* 2010). En general, la mayoría son psicrófilas o psicrótrofas y los recuentos totales pueden ir desde 10^2 hasta 10^7 UFC/cm^2 en el momento de la captura (Cahill, 1990). La composición de la flora del pescado se modifica de una forma muy rápida. Por ejemplo, al ser el pescado almacenado en hielo se favorece el crecimiento de bacterias psicrófilas y, en dos días, pueden llegar a ser predominantes en la flora bacterias de los géneros *Shewanella* y *Pseudomonas.* Contrariamente, en pescado almacenado al vacío la bacteria que resulta predominante es *Photobacterium phosphoreum* (Sivertsvik *et al.,* 2002).

Dentro de la flora nativa de interés para la preservación de pescado se encuentran las bacterias deteriorativas. Es posible destacar bacterias de los géneros *Pseudomonas, Alcaligenes, Vibrio, Serratia, Shewanella,* y *Micrococcus*. En la Tabla 1 se pueden observar algunas de ellas y su nivel de actividad deteriorativa. Estas bacterias se alojan en la piel del pescado de forma superficial y el principal mecanismo de deterioro es debido a la migración de enzimas exógenas a la carne del pescado y no por la migración de las bacterias al músculo. Dentro de los mecanismos de deterioro mediados por las enzimas microbianas, se encuentra la hidrólisis de lípidos y de aminoácidos, y la reducción de óxido de trimetilamina, dando compuestos que generan aromas desagradables (cetonas, ésteres, hipoxantina, aldehídos y amonio) (Ghaly *et al.,* 2010).

Tabla 1: Nivel de actividad deteriorativa de bacterias pertenecientes a la flora nativa de pescado (Ghaly et al., 2010; Wright et al., 2016)

Nivel de actividad deteriorativa	Microorganismos
Alto	*Pseudomonas putrefaciens* *Pseudomonas fluorescens,* *Shewanella putrefaciens*
Moderado	*Moraxella, Acinetobacter,* *Alcaligenes*
Bajo	*Aerobacter, Lactobacillus,* *Flavobacterium,* *Micrococcus, Bacillus y* *Staphylococcus*

El óxido de trimetilamina se encuentra presente, en todas las especies de pescados, pero principalmente en los de agua salada ya que funciona como un osmorregulador. Éste se utiliza como indicador para detectar el deterioro por bacterias en pescado. Las bacterias capaces de reducir el óxido de trimetilamina, a trimetilamina son *Escherichia coli, Shewanella putrefaciens, Rhodobacter sphaeroides* y *R. capsulatus,* entre otras. Presentan un rápido crecimiento al inicio del almacenamiento y además liberan al medio enzimas proteolíticas y lipolíticas (Sotelo *et al.,* 1995). El mecanismo de reducción puede ser debido a la obtención de energía del mismo, o al utilizarlo como un aceptor de electrones en la respiración anaeróbica, dando como resultado un flavor amoniacal (Landfald *et al.,* 2017).

Cabe destacar principalmente la acción de *S. putrefaciens*, ya que es una de las principales responsables del deterioro (Jørgensen y Huss, 1989). Ésta es una bacteria Gram-negativa, psicrófila, que se encuentra en climas cálidos tanto en el medioambiente marino como en el terrestre. Su mecanismo de deterioro se basa en la producción de H_2S desde la cisteína

presente en el pescado y trimetilamina por medio de su acción sobre el óxido de trimetilamina (Wright *et al.,* 2016).

Dentro de los principales patógenos presentes en pescado es posible destacar *Mycobacterium* spp., *Streptococcus iniae, Photobacterium damselae, Vibrio alginolyticus, V. vulnificus, V. parahaemolyticus, V. cholerae, Erysipelothrix rhusiopathiae, Escherichia coli, Aeromonas spp., Salmonella spp., Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Clostridium botulinum, C. perfringens y Campylobacter jejuni* (Novotny *et al.,* 2004).

L. monocytogenes presenta especial relevancia ya que es un patógeno psicrótrofo con la habilidad de crecer a temperaturas de refrigeración, lo cual indica un peligro adicional ya que una pequeña contaminación puede multiplicarse en el tiempo de almacenamiento del pescado. Esta bacteria, si bien pertenece al ambiente acuático, puede ser reintroducida en los especímenes en el procesamiento (Gram *et al.,* 2000). Es la causante de una enfermedad llamada listeriosis, de alto riesgo para la salud pública debido a su severidad y alta mortalidad (20 % a 30 %). La listeriosis puede causar abortos, meningitis y septicemia en pacientes inmunosuprimidos, y síntomas gastrointestinales leves en pacientes sanos (Verheyen *et al.,* 2019). Se han registrado brotes de listeriosis alrededor del mundo, siendo los productos de la pesca algunos de los alimentos causantes. En particular, se ha encontrado que hasta un 4,7 % de los productos de la pesca comercializados en Europa estaban contaminaciones con *L. innocua* en diferentes estadíos de procesamiento (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

1.2.4 Métodos de preservación aplicados al pescado

Actualmente, los métodos de preservación aplicados a escala masiva para la preservación de pescado son: la congelación, cocción, enlatado, ahumado, secado y salado (Sampels, 2015). Todas las técnicas citadas anteriormente si bien resultan efectivas, generan un gran deterioro de sus propiedades sensoriales, en particular en la textura y jugosidad y algunas en su valor nutricional. Esto se debe a la complejidad existente en los mecanismos de deterioro de productos de la pesca, como se mencionó anteriormente. Para ello, se requiere de un enfoque combinado en su preservación aplicando estrategias que no sólo se enfoquen en actuar sobre el desarrollo de microorganismos, sino que también ralenticen los procesos autolíticos, tales como la oxidación de lípidos y la degradación de proteínas (Rathod *et al.,* 2021).

La preservación del pescado debe comenzar inmediatamente después de la captura para mantener su frescura. Dentro de estas estrategias, es importante enfatizar el eviscerado

inmediato para evitar el contacto de enzimas gástricas y microorganismos del tracto gastrointestinal con la carne; y una refrigeración inmediata, que debe mantenerse a lo largo de toda la cadena de distribución. Adicionalmente, en cualquier establecimiento que procese pescado, las condiciones higiénicas deben mantenerse estrictamente, ya que cualquier clase de contaminación microbiológica puede prosperar de manera muy rápida (Ikape, 2018).

En los últimos años, se ha avanzado mucho en nuevas técnicas para extender la vida útil del pescado. Éstas pueden ser químicas, físicas o combinadas. Dentro de las nuevas estrategias de preservación físicas, se pueden destacar las diferentes formas de congelación que se mencionan a continuación:

- Super-congelación superficial: consiste en generar una capa de hielo superficial para prevenir el aumento de temperatura de los productos de la pesca y así, el desarrollo de microorganismos (Rahman *et al.,* 2018).
- Súper congelación: este proceso se realiza a temperaturas entre -18°C y -25 °C, lo cual genera una congelación más rápida y formación de cristales de hielo de menor tamaño preservando mejor la textura del pescado en la descongelación (Wu *et al.,* 2016).
- Técnicas de congelación de impacto y congelación por hidro-fluidización: en éstas se dirige el aire a temperaturas muy bajas directamente sobre el producto a ser congelado, generando un descenso muy veloz de la temperatura. Resulta ideal para pescado debido a la baja relación masa:superficie que presenta este alimento (James *et al.,* 2015; Newman 2001).

En cuanto a las técnicas de refrigeración, se utiliza ampliamente la conservación sobre hielo, para mantener la temperatura del pescado por debajo de los 0 °C, pero sin permitir su congelación. Dentro de las estrategias de refrigeración que incluyen el hielo, cabe mencionar la conservación por contacto directo con suspensiones. En esta técnica el pescado se incorpora mediante inmersión en una suspensión acuosa que posee apenas entre un 30-40 % de cristales de hielo (de forma esférica y tamaños pequeños) (Campos *et al.,* 2012). De esta manera, es posible asegurar una temperatura menor a los 0 °C, por lo cual las reacciones de deterioro y el crecimiento de microorganismos se vuelven más lentas que en la preservación a 4 °C de la refrigeración tradicional. Adicionalmente, debido al tamaño de los cristales, se generan menos daños físicos en el pescado. Esta técnica de refrigeración se ha utilizado aplicando suspensiones realizadas con agua de mar, con agua con ozono adicionado o con otros antimicrobianos. De esta manera, el efecto de la

refrigeración se mejora debido a la presencia de antimicrobianos que actúan como barrera para el crecimiento de los microorganismos (Múgica *et al.,* 2008).

Las últimas técnicas físicas para destacar son el almacenamiento al vacío y en atmósfera modificada. Estas técnicas poseen la ventaja de limitar el crecimiento de microorganismos y prevenir la oxidación de lípidos. En cuanto a la preservación en atmósfera modificada, se utilizan atmósferas constituidas por nitrógeno, con una concentración menor de dióxido de carbono y concentraciones mínimas de oxígeno, que permiten una disminución de la flora aeróbica y eviten el desarrollo de *C. botulinum* E, presente en el pescado (Kumar y Ganguly, 2014). El gas más relevante en cuanto al control de microorganismos es el dióxido de carbono, ya que éste se disuelve en el pescado, disminuyendo su pH superficial e inhibiendo el crecimiento microbiano (Sivertsvik *et al.,* 2002). El nitrógeno se utiliza para reemplazar el oxígeno, y de esta manera prevenir la oxidación de lípidos y el desarrollo de bacterias aerobias. Finalmente, en el caso de pescados de carne roja, tales como el atún, se utilizan altas concentraciones de oxígeno para retardar la formación de metamioglobina que da al producto un color pardo.

En cuanto al envasado al vacío, es una de las técnicas más utilizadas para pescado fresco (Nagarajarao, 2016). De esta manera, se obtiene un ambiente anaeróbico, inhibiendo el desarrollo de microorganismos deteriorativos, tales como *Pseudomonas* spp. y limitándose la rancidez oxidativa. Como ya se mencionó anteriormente, la rancidez oxidativa sucede muy rápidamente en pescado, debido a su elevada concentración de ácidos grasos insaturados, por lo cual la ausencia de oxígeno resulta de interés. El envasado al vacío, en combinación con otras técnicas, puede incrementar la vida útil del pescado por hasta 20 días, reduciendo así las pérdidas económicas (Patil *et al.,* 2020).

En cuanto a la biopreservación de productos de la pesca, se han aplicado compuestos de origen animal, vegetal, bacteriano y fúngico (Tabla 2). Los compuestos de origen animal utilizados para la preservación de pescado incluyen la lactoferrina y lactoperoxidasa –obtenidas de la leche-, lisozima -obtenida de huevos de gallina- y el quitosano que se obtiene por medio de la desacetilación de la quitina, extraída del caparazón de crustáceos, tales como cangrejos, langostas y langostinos. Si bien estos compuestos han demostrado una mejora al ser aplicados en productos de la pesca, presentan la limitación de provenir de productos que contienen alérgenos (Lopata *et al.,* 2009). Los compuestos de origen vegetal incluyen los extractos vegetales, aceites esenciales (AE) y humo de madera. Los AE poseen la ventaja de requerirse cantidades muy pequeñas para que estos logren un efecto antimicrobiano. De cualquier manera, al poseer características sensoriales muy invasivas, las concentraciones requeridas para ejercer su efecto pueden no ser aceptables por los

consumidores (Vatavali *et al.,* 2013). Los extractos han sido ampliamente estudiados y, aunque poseen actividad antimicrobiana y antioxidante, requieren combinarse con otras técnicas que mejoren su efecto antagonista al igual que cualquier preservador. El humo natural de madera posee propiedades antimicrobianas y otorga un sabor deseable al pescado, sin embargo, se desaconseja su empleo debido a su contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos con potenciales efectos carcinogénicos (Gelobin 2012). Además, existe una potencial aplicación en preservación de pescado de extractos de algas. Éstas han sido aplicadas en pez gallo retardando la oxidación de los lípidos (Campos *et al.,* 2019 a y b*).* En cuanto a los compuestos derivados de hongos, si bien no se han aplicado aún en pescado, poseen actividad antagonista contra bacterias Gram negativas que son las principales presentes en productos de la pesca (Alresly *et al.,* 2015; Jouda *et al.,* 2016; Nwakanma *et al.,* 2016).

Finalmente, en el último grupo de componentes químicos naturales se encuentran los compuestos obtenidos por medio de bacterias, siendo las principales bacterias utilizadas, las BAL (Deegan *et al.,* 2006). Dentro de los compuestos que producen, se pueden destacar las bacteriocinas que poseen un amplio rango de actividad antagonista y los ácidos orgánicos, tales como el láctico y el cítrico, que, al ser aplicados de forma superficial, disminuyen los recuentos totales de bacterias. También es posible adicionar las bacterias directamente en el pescado como cultivo protector, logrando así, la producción de los compuestos con actividad antimicrobiana *in situ,* limitando el crecimiento de otras bacterias no deseadas al competir la cepa láctica por los nutrientes (Thomaz-Soccol *et al.,* 2017).

Tabla 2: Compuestos naturales utilizados para la preservación de pescado (Mei et al., 2019)

Origen	Compuesto	Ventajas	Desventajas	Referencias
Animal	Quitosano	-Biodegradable -GRAS -Amplio espectro de acción antimicrobiana -Actividad antioxidante	-Proviene de crustáceos que son alérgenos principales.	Schelegueda *et al.,* 2016
	Lisozima	-Efecto contra bacterias Gram negativas	-Proviene de leche, la cual es considerada un alérgeno principal -No posee efecto sobre bacterias Gram positivas	Rawdkuen *et al.,* 2012
	Lactoferrina	-GRAS -Amplio espectro de acción antimicrobiana	-Pocos estudios en preservación de pescado -Proviene de leche, la cual es considerada un alérgeno principal	Wang *et al.,* 2017

	Lactoperoxi-dasa	-Ha sido evaluada ampliamente en la preservación de pescado	-Pérdida de efecto antagonista al estar saturada de hierro -Principal acción contra bacterias Gram positivas -Proviene de leche, la cual es considerada un alérgeno principal	Montiel *et al.,* 2012
Vegetal	Aceites esenciales	-Amplio espectro de acción antimicrobiana -Efectivos a bajas concentraciones -GRAS -Actividad antioxidante -Variedad de mecanismos de acción	-Flavor muy intenso -Falta de homogeneidad en su producción.	Hassoun *et al.,* 2017
	Extractos	-Actividad antioxidante -Actividad antimicrobiana de amplio rango	-Menor actividad antagonista que compuestos químicos	Samaneh *et al.,* 2011
	Humo natural de madera	-Actividad antagonista -Flavor deseable -Mantiene la rojez de la Carne	-Formación de compuestos potencialmente cancerígenos	Lingbeck *et al.,* 2014
	Hongos y Algas	-Actividad antimicrobiana de amplio rango -Actividad antioxidante -Variedad de mecanismos de acción	-No han sido evaluados ampliamente *in vivo*	Shen *et al.,* 2017
Bacteria-no	Bacteriocinas	-Amplio espectro de acción antimicrobiana -Variedad de mecanismos de acción -Amplia evaluación en productos de la pesca -Nisina y Pediocina ya se utilizan a escala industrial	-Pérdida de estabilidad en pescado -Deben ser registradas como aditivos alimentarios	Mokoena 2017
	Ácidos orgánicos	-Amplia utilización en productos de la pesca -GRAS -Estructuras variadas -Variedad de mecanismos de acción	-Pueden dañar la textura, sabor y apariencia del pescado -Pueden no controlar la forma-ción de compuestos volátiles nitrogenados	Vázquez *et al.,* 2005
	BAL	-GRAS -Compiten con la flora nativa -Producción de compuestos antimicrobianos *in situ* -Adicionan valor probiótico al producto	-Supervivencia de las cepas *in situ* -Modificación del flavor	Hao *et al.,* 2021

Más allá de todas las opciones naturales que se han investigado a lo largo del tiempo para la preservación de pescado, actualmente en la industria se siguen utilizando conservantes químicos, y éstos cada vez son menos aceptados por los consumidores descubriéndose más efectos adversos sobre la salud. Aunque los compuestos naturales han dado buenos resultados, se requiere investigación de nuevas técnicas para extender la vida útil del pescado y así obtener productos de la pesca con un mínimo procesamiento, inocuos y con una óptima calidad sensorial. Es debido al panorama detallado anteriormente que, a lo largo de esta tesis doctoral, los esfuerzos se enfocaron en el uso de técnicas de biopreservación para extender la vida útil de pescado.

Objetivos

2.1 Objetivos generales

- Contribuir al desarrollo de alimentos mínimamente preservados teniendo en cuenta las actuales demandas de los consumidores.
- Promover la utilización de métodos de biopreservación para extender la vida útil del pescado.

2.2 Objetivos particulares

- Aislar BAL productoras de bacteriocinas a partir de distintos especímenes de la costa patagónica argentina.
- Evaluar el espectro de actividad antagonista de las BAL aisladas sobre las bacterias de colección y sobre la flora nativa del pescado.
- Evaluar la ausencia de factores de virulencia en las cepas aisladas para establecer su posible uso en alimentos.
- Evaluar y seleccionar una técnica adecuada para purificar las bacteriocinas presentes en SLC de la cepa bacteriocinogénica seleccionada.
- Evaluar la posibilidad de aplicar las cepas seleccionadas como cultivo protector o producto semipurificado para extender la vida útil del pescado.
- Evaluar la actividad antagonista de AE en fase vapor frente a la flora deteriorativa y patógena del pescado.
- Evaluar la interacción entre AE en fase vapor sobre microorganismos presentes en la flora nativa del pescado y seleccionar mezclas sinérgicas
- Caracterizar la composición química de los AE más efectivos
- Aplicar AE para mejorar la vida útil de filetes de merluza por sí mismos o en combinación con BAL.

En base a los objetivos mencionados, el trabajo realizado se centró en el uso: de BAL como cultivos protectores, de las bacteriocinas producidas previamente semipurificadas, y de AE en fase vapor como factores de estrés microbiano para mejorar la vida útil de pescado

refrigerado. En función de los mencionados objetivos, el trabajo se dividió en las siguientes etapas:

I) Aislamiento de BAL productoras de bacteriocinas y a su aplicación como cultivos protectores para la preservación de pasta de merluza (*Merluccius hubbsi*)

II) Purificación parcial de bacteriocinas y su aplicación para la preservación de piezas de salmón rosado (*Oncorhynchus gorbuscha*) refrigerado.

II) Actividad antagonista de AE en fase vapor y su aplicación en combinación con BAL para la preservación de filetes de merluza.

Adicionalmente, se agregó una sección de Materiales y Métodos Generales, en los cuales se detalla la procedencia de los reactivos y medios de cultivo utilizados, el equipamiento, y las técnicas aplicadas de manera reiterada a lo largo de la tesis.

Materiales y Métodos Generales

3.1 Detalle del equipamiento utilizado

- Agitador orbital: Vicking, (Buenos Aires, Argentina)
- Cartucho Mega Bond Elut: Agilent Technologies (Santa Clara, Estados Unidos)
- Centrífuga de alta velocidad: Eppendorf 5804 R, (Hamburgo, Alemania)
- Columna C18 de 250 x 2,1 mm y tamaño de poro de 5 µm: Grace Davison Discovery Sciences (Lokeren, Bélgica)
- Columna capilar de polietilenglicol MW ca. 20.000, JyW Scientific (Santa Clara, Estados Unidos)
- Columna de silicona 5 % fenil-95 %-metil, JyW Scientific (Santa Clara, Estados Unidos)
- Columna de vidrio 2.5 cm x 50 cm: Bio-Rad Laboratories, Hercules (California, Estados Unidos)
- Cromatógrafo de gas FID acoplado a espectrómetro de masa: Perkin Elmer Clarus 500 (Londres, Inglaterra)
- Cuba electroforética; Bio-Rad (Woodstok, Inglaterra)
- Equipo comercial de purificación Wizard Genomics: Promega (Madison, Wisconsin, EE. UU.)
- Espectrofotómetro: Shimadzu Corporation (Kyoto, Japón)
- Lector de microplacas acoplado al programa Gen5: BioTek Instruments, ELx808 (USA Reader Control and Data Analysis Software)
- Mixer: Omni Mixer 17106, OCI Instruments, Omni Corporation (Waterbury, Estados Unidos)
- pHímetro: Mettler Toledo, AD1030 (Ohio, Estados Unidos).
- Procesadora: Yelmo Extra (Buenos Aires Argentina)
- Stomacher: Seward 400 (Londres, Reino Unido)
- Turbidímetro: Densichek (Biomerieux, Francia)

3.2 Detalle de reactivos y preservadores utilizados

- Aceite esencial de lemongrass: EUMA SAICIYF (Buenos Aires, Argentina)
- Aceite esencial de orégano: EUMA SAICIYF (Buenos Aires, Argentina)
- Aceite esencial de romero: EUMA SAICIYF (Buenos Aires, Argentina)
- Aceite esencial de tomillo: EUMA SAICIYF (Buenos Aires, Argentina)
- Ácido clorhídrico: Biopack (Buenos Aires, Argentina)
- Acrilamida: Sigma (Darmsadt, Alemania)
- Alcohol isopropílico: Biopack (Buenos Aires, Argentina)
- Buffer Tris: Bio Rad, (California, Estados Unidos)

- Cloruro de sodio: Biopack (Buenos Aires, Argentina)
- Estándar de albúmina bobina: Sigma (Darmastadt, Alemania)
- Etanol 96°: Porta (Buenos Aires, Argentina)
- Etanol absoluto: Biopack (Buenos Aires, Argentina)
- Hidróxido de sódio: Biopack (Buenos Aires, Argentina)
- Nisina: Nisaprin (Danisco A/S DK, Dinamarca)
- Nitrato de plata: Sigma (Darmastadt, Alemania)
- Peróxido de hidrogeno: Sanadrog (Buenos Aires, Argentina)
- Reactivo de Bradford: Sigma (Darmastadt, Alemania)
- Sulfato Cúprico: Biopack (Buenos Aires, Argentina)
- Tetrametiletilenediamina (TEMED): Sigma (Darmastadt, Alemania)

3.3 Otros materiales

- Bromelina: Meck millipore (Massachusetts, Estados Unidos)
- Disco de oxidasa: Oxoid, Fischer scientific (Basingstoke, Inglaterra)
- Discos de PYR y LAP: Oxoid, Fischer scientific (Basingstoke, Inglaterra)
- Discos para susceptibilidad a antibióticos: Oxoid, Fischer scientific (Basingstoke, Inglaterra)
- Fibra de soporte pare extracción en fase sólida: Bellefonte (Pensilvania, USA)
- Filtro para jeringa de 20 µm: Sartorius Stedim Biotech (Damsdalt, Alemania)
- Kit de coloración de Gram: Biopack (Buenos Aires, Argentina)
- Lisozima: Meck millipore (Massachusetts, Estados Unidos)
- Pepsina: Meck millipore (Massachusetts, Estados Unidos)
- Pronasa: Meck millipore (Massachusetts, Estados Unidos)
- Resina Ambelite XAD-16: SigmaAldrich-Merck (Darmstadt, Alemania)
- Sangre Desfibrinada de conejo: Laboratorio Alfredo C. Gutierrez (Buenos, Aires, Argentina)
- Tripsina: Meck millipore (Massachusetts, Estados Unidos)

3.4 Medios de cultivo, condiciones de incubación y recuentos

3.4.1 Medios de cultivo

A continuación, se detallan los medios de cultivo utilizados para favorecer el crecimiento de diferentes bacterias, su marca y origen:

- Agar Bacteriológico: Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia)

- Agar Bilis Esculina: Merck (Darmstadt, Alemania)
- Agar Cerebro Corazón (BHI): Merck (Darmstadt, Alemania)
- Agar Man Rogosa Sharpe: Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia)
- Agar Palcam: Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia)
- Agar para recuento en placa (PCA): Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia)
- Agar Sangre: BritaniaLab (Buenos Aires, Argentina)
- Agar Tripteina Soja (TSA): Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia)
- Caldo Cerebro corazón (BHI): Merck (Darmstadt, Alemania)
- Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS): Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia)
- Caldo Tripteina Soja: Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia)

3.4.2 Suplementos de antibióticos

Suplemento selectivo de Listeria para Palcam: Merck Milipore (Darmstadt, Alemania)
Vancomicina: Merck Milipore (Darmstadt, Alemania)
Ampicilina: Merck Milipore (Darmstadt, Alemania)

3.4.3 Medios de cultivo, condiciones de incubación y de conservación para cada bacteria utilizada

Todas las cepas utilizadas en este trabajo se conservaron hasta su uso a -80 °C en el caldo utilizado para el crecimiento de cada una de ellas, adicionado con 20 % p/p de glicerol. Antes de su uso, se repicaron dos veces con el objetivo de reactivarlas luego del estrés producido por la crioconservación. En la Tabla 3 se resumen todas las condiciones de incubación utilizadas para el crecimiento de los diferentes microorganismos, durante el desarrollo de la presente tesis.

Tabla 3: Condiciones de incubación de las bacterias utilizadas.

Bacteria	Medio de cultivo	Tiempo de incubación (horas)	Temperatura (°C)
Enterococcus mundtii spp.	Caldo MRS	24	30
Listeria innocua ATTC 33090	Caldo TSB	16	30
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	Caldo TSB	16	30
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	Caldo TSB	24	30
Pseudomonas fluorescens ATCC 49838	Caldo TSB	24	30
Shewanella putrefaciens ATCC 8071	Caldo TSB	24	25

La concentración de los inóculos se estandarizó, cuando fuera necesario, midiendo su turbidez, utilizando un turbidímetro calibrado en unidades McFarland. Para ello, en tubos de hemólisis conteniendo 3,5 ml de agua peptona estéril, se agregaron alícuotas de 100 µl del cultivo deseado, se homogeneizó el contenido, y se midió la turbidez. Este proceso se repitió hasta llegar a un valor de 0,5 McFarland, lo cual equivale, aproximadamente, a una concentración de bacterias de 10^8 UFC/ml. Cabe destacar que, si bien una misma turbidez no representa igual concentración de bacterias para cualquier cepa, se evaluaron los recuentos de todas las cepas utilizadas a una concentración de 0,5 McFarland, y todos ellos se encontraron en el orden de 10^8 UFC/ml. Posteriormente para llegar a la concentración de bacterias deseada para cada ensayo, se realizaron diluciones seriadas en agua peptona.

3.4.4 Técnica para la realización de recuentos

Para realizar los recuentos, a una alícuota de la muestra a analizar se le agregó agua peptona para lograr una dilución de 1/10 en una bolsa estéril. Luego, se homogenizó en Stomacher por 1 minuto. Las diluciones seriadas se realizaron mezclando una parte de la dilución anterior con 9 partes de agua peptona.

Para los recuentos en superficie, se sembraron 100 µl de la dilución deseada sobre el agar correspondiente y se rastrilló con una espátula de Drigalsky, esterilizada por flameo, hasta la absorción completa de la muestra en el agar. Para realizar recuentos en profundidad, se adicionó 1 ml de la dilución deseada de la muestra en una placa de Petri estéril y se agregó el agar a una temperatura de 45 °C, de manera tal que no estuviera solidificado y a la vez, no dañara las bacterias presentes. Las placas se homogenizaron manualmente en forma de ocho para distribuir adecuadamente la muestra en el agar.

3.4.5 Medios de cultivo y condiciones de recuentos

En la Tabla 4 se muestra: el medio de cultivo utilizado, las condiciones de tiempo y temperatura de incubación, y la técnica empleada para realizar los recuentos de los diferentes microorganismos. En todos los recuentos microbiológicos, se utilizaron 3 réplicas independientes, y a cada una se le realizaron los recuentos por duplicado.

Tabla 4: Medios y condiciones de incubación de recuentos realizados

Bacteria	Medio de cultivo	Tiempo de incubación (horas)	Temperatura (°C)	Superficie/ Profundidad
Bacterias aerobias mesófilas	Agar PCA	48	30	Profundidad
Bacterias aerobias psicrófilas	Agar PCA	96	4	Profundidad
Listeria spp.	Agar Palcam	48	37	Superficie
Enterococcus spp.	Agar Bilis Esculina Azida	48	37	Superficie

Luego de la incubación, se contaron diferentes clases de colonias características, dependiendo el medio de cultivo utilizado. En los casos de los recuentos de bacterias aerobias mesófilas y psicrófilas, se contó la totalidad de las colonias presentes. Para los recuentos tanto de *Listeria* spp. como de *Enterococcus* spp. se contaron las colonias que presentaron un halo negro alrededor de ellas, debido a la hidrólisis de la esculina

3.5 Análisis estadístico de los resultados

Todos los resultados se analizaron por medio del programa Statgraphics Centurion XV (versión 15.2.06, 1982-2007 Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, Estados Unidos). La totalidad de los datos se analizó utilizando un Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor o dos factores según el caso. Luego se realizó el test de Tukey para comparación de muestras múltiples. La significatividad estadística se evaluó a un nivel del 5 % (α=0,05).

Capítulo I

Bacteriocinas: del aislamiento de cepas bacteriocinogénicas a su aplicación

Capítulo I: Del aislamiento de cepas bacteriocinogénicas a su aplicación

I.1 Introducción

I.1.1 Biopreservación mediante el uso de bacterias ácido lácticas

Las BAL se utilizan desde la antigüedad para la producción de alimentos y, es por ello, que existe un historial de uso seguro de muchas de ellas. Éstas se pueden utilizar como cultivos iniciadores de la fermentación generando un cambio en las propiedades sensoriales. Tal es el caso de numerosos productos lácteos como yogur, leches ácidas y quesos, embutidos cárnicos como el salame, o vegetales como el chucrut. En todos los casos el cultivo iniciador no sólo es responsable de una disminución del pH, sino también, de la producción de distintos metabolitos, entre ellos: etanol, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos y péptidos con actividad antibacteriana (Egan *et al.,* 2016). Adicionalmente, al utilizar las BAL para fermentar los alimentos, es posible obtener una mejora en el valor nutricional del producto, debido a la presencia de un nuevo perfil peptídico, como, por ejemplo, en el yogur (Fardet *et al.,* 2019) y compuestos con actividad antioxidante en cereales y legumbres (Verni *et al.,* 2019).

En los últimos años, muchas investigaciones se han centrado en el empleo de BAL como cultivos protectores, de esta forma no se modifican de manera significativa las propiedades sensoriales, pero se contribuye a mejorar la calidad microbiológica de los alimentos. Esto resulta de particular interés ya que se apunta a utilizar microorganismos que poseen un historial de uso seguro, y por ello, la legislación vigente permite su adición a diferentes matrices (Food and Drug Administration, 2021; Código Alimentario Argentino, 2021).

Este capítulo se centra en la utilización de BAL de forma directa, adicionando el cultivo al pescado para controlar su calidad microbiológica.

Dentro de las BAL se incluyen, actualmente, los géneros de *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, y Weisella.* Éstas son bacterias que comparten algunas características en común, pero que no pertenecen a una rama filogenética en particular. Todas ellas son Gram positivas, no poseen movilidad, ni generan esporas, fermentan carbohidratos produciendo principalmente ácido láctico y contienen un bajo porcentaje de guanina y citocina en su ADN (Ananou *et al.,* 2007). Durante su

crecimiento producen diferentes compuestos con actividad antimicrobiana que se describen a continuación.

I.1.2 Compuestos con actividad antimicrobiana

Entre los compuestos con actividad antimicrobiana, se destacan los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas. Las bacteriocinas son de particular interés ya que son compuestos que poseen una actividad antagonista contra ciertos tipos de microorganismos, a concentraciones muy bajas y pueden ser degradadas por proteasas, de manera que su uso en alimentos no generaría un efecto impredecible en la flora intestinal (Woraprayote *et al.,* 2016). Adicionalmente, algunas bacteriocinas también poseen resistencia a las altas temperaturas y al pH del medio; varias producidas por los géneros *Enterococcus* y *Lactobacillus*, tienen un amplio rango de acción contra bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (De Kwaadsteniet *et al.,* 2005; Todorov y Dicks, 2007).

Las bacteriocinas se sintetizan a nivel ribosomal, procesadas o no por subsiguientes modificaciones por enzimas postraduccionales y exportadas al medio extracelular. El rol de las bacteriocinas en la naturaleza es facilitar la introducción o dominancia de la bacteria productora en nichos específicos, actuar como péptidos antimicrobianos -inhibiendo directamente cepas competidoras-, como péptidos que generan señales químicas entre bacterias, por medio de *quorum sensing*, o bien, generando señales en el sistema inmune de células del hospedante (Majeed *et al.,* 2011). En cuanto a los potenciales efectos de las BAL y sus metabolitos en la salud humana, cabe destacar, una modulación del apetito y gestión del peso corporal, una acción antagonista contra bacterias patógenas presentes en la flora intestinal, y efectos antiinfecciosos e inmunomodulatorios, reduciendo la generación de mediadores proinflamatorios y un aumento en citoquinas antiinflamatorias (Mathur *et al.,* 2020).

Es importante destacar que la mayoría de las cepas bacterianas producen al menos una bacteriocina, pero resulta de interés el estudio de aquellas producidas por las BAL, debido a los beneficios que presentan para la salud humana, su estado de GRAS, y su potencial aplicación inmediata en alimentos.

I.1.3 Principales géneros de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas

Dentro de los principales géneros de BAL productoras de bacteriocinas estudiadas hasta el momento, se destacan los géneros *Enterococcus, Streptococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Carnobacterium y Weisella* (Figura I.1). Todas las bacteriocinas generadas por estas BAL poseen actividad contra bacterias Gram positivas, y algunas producidas por

enterococos y lactobacilos también poseen actividad contra bacterias Gram negativas (López-Cuellar *et al.,* 2016).

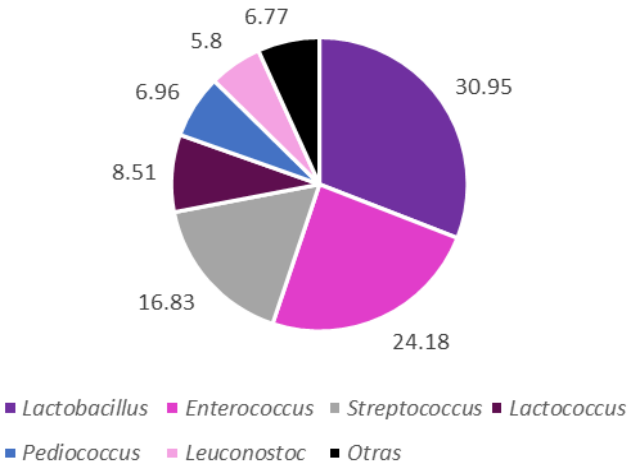


Figura I.1: Porcentaje de diferentes especies de BAL productoras de bacteriocinas

I.1.3.i Evaluación de su seguridad para la aplicación en alimentos

Aparte de las aptitudes de las BAL para prevenir el desarrollo de microorganismos no deseados, se debe evaluar su seguridad para el uso en alimentos. Esta evaluación, está relacionada con la detección de factores de virulencia en las mismas. Los principales peligros potenciales de las BAL para consumo humano se encuentran en la Tabla I.1 (Colombo *et al.,* 2020). Éstos se pueden separar en:

- Factores de virulencia: factores que facilitan la fagocitación de células en humanos.
- Resistencia a antibióticos: factor que dificulta el tratamiento de las enfermedades con antibióticos conocidos.
- Producción de aminas biogénicas: estos metabolitos pueden generar enfermedades en humanos tales como trastornos gastrointestinales, cutáneos, neurológicos, aumento de la presión sanguínea y cefaleas. Es por estas razones que las cepas de BAL utilizadas no deben presentar la potencialidad de producir estos compuestos.

Tabla I.1: Principales aspectos a evaluar para la aplicación de BAL en alimentos

Factores de virulencia	Resistencia a antibióticos	Producción de aminas biogénicas
Agregación	Ampicilina	Agmatina
ADNasa	Bacitracina	Cadaverina
Endocarditis	Clindamicina	Histamina
Gelatinasa	Cloranfenicol	Putrecina
Hemólisis	Eritromicina	Tiramina
Hialuronidasa	Gentamicina	
Intercambio genético	Penicilina	
Lipasa	Estreptomicina	
	Tetraciclina	
	Vancomicina	

Los factores analizados en cada género de BAL son específicos para cada una de ellas. Resulta de interés resaltar que en escasas ocasiones las BAL se encuentran relacionadas a enfermedades graves en humanos, salvo como patógenos oportunistas en casos de enfermedades preexistentes y un estado de salud frágil por parte del hospedador (Adams, 1999). A continuación, se detallarán las características del género *Enterococcus*, ya que es el evaluado en la presente tesis.

I.1.4 Género *Enterococcus*

Dentro de las BAL, cabe destacar el género *Enterococcus*. Son bacterias con forma de cocos, de origen entérico, capaces de agruparse formando cadenas. Se encuentran presentes en el medioambiente, así también como en el tracto gastrointestinal humano. Debido a su alta resistencia a condiciones adversas, como altas concentraciones de sales, sus cepas se han utilizado como cultivos iniciadores en la fermentación de quesos y chacinados (Moreno *et al.,* 2006). Éstas generan productos con propiedades sensoriales deseadas además de producir péptidos con actividad antimicrobiana (incluyendo bacteriocinas) con amplia actividad antagonista tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas. Es por esta razón que en los últimos años se ha estudiado la aplicación de sus bacteriocinas para la preservación de alimentos (Hanchi *et al.,* 2018; Yang *et al.,* 2014). Adicionalmente, éstas han sido aplicadas como prebióticos para aliviar síntomas como la diarrea (Franz *et al.,* 2011).

Actualmente el género *Enterococcus* incluye más de 20 especies (Franz *et al.,* 2003), las cuales están divididas en diferentes grupos:

- Grupo *Enterococcus faecium*: *E. durans, E. faecium, E. hirae, E. mundtii, E. porcinus* y *E. villorum.*
- Grupo *Enterococcus avium*: *E. avium, E. malodoratus, E. pseudoavium* y *E. faffinosus.*
- Grupo *Entorococcus gallinarum*: *E. casseliflavus, E. flavescens* y *E. gallinarum.*
- Grupo *Enterococcus dispar*: *E. Asini* y *E. dispar.*
- Grupo *Enterococcus saccharolyticus*: *E. saccharolyticus* y *E. sulfureus*.
- Grupo *Enterococcus cecorum*: *E. cecorum* y *E. columbae*.
- Grupo *Enterococcus faecalis*: *E. faecalis, E. haemoperoxidus* y *E. moraviensis.*
- Grupo *Tetragenococcus*: *E. solitarius, T. halophilus* y *T. muriaticus*

Independientemente de su historial de uso seguro, éstos no poseen la calificación de bacterias GRAS a diferencia de otras BAL, debido a la presencia de factores de virulencia y resistencia a antibióticos distribuidos en los aislados clínicos de este género (Ogier y Serror, 2008). Dentro de éstos se pueden destacar:

- Resistencia a antibióticos: es una temática de amplias implicaciones sobre toda la población bacteriana, pero particularmente en el caso de los enterococos ya que, al presentar estos resistencia a vancomicina o a ampicilina su infección puede resultar muy difícil de tratarse (Mundy *et al,.* 2000). La resistencia a vancomicina o a ampicilina se consideran positivas cuando las bacterias no son susceptibles a una concentración de 4 µg/ml o 8 µg/ml, respectivamente (Clinical Laboratory Standards Institute, 2021**¡Error! Referencia de hipervínculo no válida.**). Esta resistencia puede ser intrínseca o adquirida. En el caso de ser adquirida, ésta puede deberse a mutaciones o la transferencia horizontal de genes entre diferentes cepas (Arias *et al.,* 2009). Es por esta razón que resulta de vital importancia no sólo analizar la expresión fenotípica de esta resistencia, sino también la presencia de genes que codifiquen para la misma (Clinical Laboritory Standards Institute, 2021). El segmento de ADN que se encuentra relacionado con la resistencia a ampicilina y a vancomicina en enterococos es el elemento de inserción IS16, el cual es un transposón que puede insertarse en diferentes partes del ADN activando o desactivando la expresión de un gen. Éste, en general, se encuentra presente en enterococos de origen hospitalario.

- Actividad hemolítica: está relacionada a la producción de citolisina, la cual es una toxina que causa una reacción beta hemolítica en algunos eritrocitos y posee actividad antagonista frente a una amplia variedad de bacterias Gram positivas. La presencia de actividad hemolítica aumenta la patogenicidad y muerte de pacientes infectados (Chajęcka-Wierzchowska *et al.,* 2017). Sin embargo, existen enterococos relacionados a infecciones que no poseen actividad hemolítica, aunque se ha encontrado que la presencia de esta capacidad aumenta cinco veces el riesgo de muerte en pacientes con bacteriemia causada por enterococos (De Vuyst *et al.,* 2003). Las principales cepas de *Enterococcus* analizadas por su actividad hemolítica son *E. faecium*, *E. fecalis* y *E. durans* (Semedo *et al.,* 2003). Los operones que codifican para esta actividad son cylLl y cylLs.

- Adhesión a tejidos: este factor aumenta la virulencia debido a que es más probable que la bacteria pueda invadir y plasmolizar células eucariotas. Esto se debe a que al adherirse la bacteria a la célula intestinal o del tracto urogenital, aumenta la posibilidad de que esta pueda pasar al sistema linfático o vascular. Adicionalmente si bien la presencia de esta proteína puede aumentar la virulencia de esta especie, también su presencia facilita que la misma pueda adherirse al tracto gastro intestinal para cumplir su función como probiótico (Colombo *et al.,* 2020). La adhesión se da debido a la presencia de una proteína de agregación, y el gen que la codifica es el *agg* que forma parte de un plásmido relacionado con las feromonas (Rozdzinski *et al.,* 2001; Wells *et al.,* 2000). Otro gen relacionado a la adhesión es el de la proteína de superficie (esp).

- Licuefacción de gelatina: ésta se debe a la acción de la gelatinasa, la cual puede hidrolizar gelatina, colágeno, caseína y otros péptidos pequeños con actividad biológica. De esta manera, los enterococos pueden degradar el tejido de las células hospedantes y así obtener nutrientes (Semedo *et al.*, 2003). El gen que codifica para este factor de virulencia se llama gelE y está localizado en el cromosoma. La presencia del mismo ha probado empeorar las condiciones de endocarditis en humanos (Thurlow *et al.,* 2010).

- Producción de hialuronidasa: ésta es una enzima que degrada el ácido hialurónico del tejido conectivo y facilita la invasión bacteriana (Lauková *et al.,* 2019). El gen que codifica para su producción es el gen hylEfm. Este gen se encuentra casi únicamente en aislados clínicos de *E. faecium*, y puede estar presente en plásmidos lo cual permitiría su transferencia horizontal (Arias-Moliz *et al.,* 2009).

Si bien la especie en la cual predominan los factores de virulencia es en *E. faecalis* (Jett *et al.,* 1994), no es posible utilizar una nueva cepa de enterococos sin una evaluación exhaustiva de la presencia de factores de virulencia. Cabe mencionar que la especie *E. mundtii*, con la que se trabajará en este tesis, en general, no posee factores de virulencia, habiéndose aislado hasta la fecha un único espécimen con resistencia a la vancomicina (Sharifi-Rad *et al.,* 2016).

La mayoría de los enterococos producen bacteriocinas tipo II, estables al calor, catiónicas, hidrofóbicas, con un tamaño menor a 6 kDa (De Vuyst y Vandamme 1994; Nes *et al.,* 1996). Las principales bacteriocinas producidas por este género son enterocina A, B, P, L50A, L50B, mundticina KS, bacteriocina 96, bacteriocina 31, 1071 A/B, enterocina Q y HirJM 79 (Henning *et al.,* 2015). En la Tabla I.2 se pueden observar las bacteriocinas producidas por enterococos y su clasificación.

Tabla I.2: Bacteriocinas producidas por enterococos y su clasificación

Clase	Bacteriocina
Clase I	Citolisina
Clase II	Enterocina 32/1071/A/B/P/Q/L50/EJ97/MR10/RJ-11
	Mundticina / KS
	Bacteriocina 31/ RC714/T8
Clase III	Enterocina AS-48

I.1.5 Clasificación de bacteriocinas

Las bacteriocinas se clasifican en diferentes clases según sus características bioquímicas y genéticas. Algunas pueden presentar modificaciones postransduccionales. Si su tamaño es menor a los 10 KDa, se clasifican en Clase I o Clase II, y si su tamaño es mayor en Clase III. Las Clases I y II se diferencian según tengan modificaciones enzimáticas en su síntesis o no. Dentro de cada clasificación existen diferentes subgrupos que dependen tanto de su composición peptídica, así también como de los genes relacionados a su producción.

Su clasificación, a medida que se descubrieron nuevas bacteriocinas se ha modificado desde la primera propuesta por Klaenhammer (1993). La clasificación actual, según Alvarez-Sieiro *et al.* (2016), es la siguiente:

- Clase I: Incluye a todos los péptidos que sufren modificaciones enzimáticas durante su biosíntesis, lo cual proporciona a las bacteriocinas de aminoácidos y estructuras poco comunes.

- Clase Ia: en esta clase se encuentran las bacteriocinas que poseen aminoácidos tales como lantonina o metil-lantonina, generalmente, sufren modificaciones postransduccionales y los genes encargados de estas modificaciones se encuentran en el mismo operón que los que codifican para la síntesis ribosomal de las bacteriocinas. Éstos a su vez según las enzimas postransduccionales que están involucradas en su síntesis se pueden dividir en 2 subcategorías. Dentro de este grupo se encuentra la nisina y la lacticina. El mecanismo de acción de los lantibióticos se basa en la unión a los lípidos II de la membrana del microorganismo objetivo, generando poros.

- Clase Ib: son péptidos cíclicos que presentan una unión entre el nitrógeno y el carbono terminal formando una molécula circular. Ejemplos de estas bacteriocinas son la carnociclina A y la bacteriocina AS-48. Su modo de acción es mediante la generación de poros en la membrana de las células objetivo. Existen 2 mecanismos para lograrlo, uno de ellos es dependiente del voltaje, mientras el otro está relacionado con la generación de un reordenamiento en la membrana celular.

- Clase Ic: los sactipéptidos poseen uniones disulfuro y una estructura de horquilla. Este grupo de bacteriocinas no es producido por BAL. Dentro de este grupo se encuentra la subtilicina, producida por *Bacillus subtilis*. Éstas pueden insertarse parcialmente en la membrana celular causando un desorden en la región hidrofóbica, generando poros transitorios.

- Clase Id: son péptidos que contienen una o varias combinaciones de anillos heterocíclicos de tirasol y metil-oxasol. El más común es la streptolisina S. El mecanismo de acción de estas bacteriocinas no se encuentra bien caracterizado, no obstante, existe evidencia de la inhibición de la enzima girasa en el microorganismo objetivo.

- Clase Ie: estas bacteriocinas se denominan glicosinas, debido a que poseen un residuo glicosilado en su estructura. Dentro de este grupo se encuentra la glicosina F y la enterocinas F4-9. Su mecanismo de acción se basa en un efecto bacteriostático mediado por su capacidad para unirse a sitios específicos de acción sobre la pared celular (Bisset, 2019).

- Clase If: las bacteriocinas pertenecientes a esta clase se denominan lasopéptidos. Se caracterizan por una unión amida entre el primer

aminoácido del péptido principal y un residuo cargado negativamente. Estos péptidos no solo poseen actividad frente a bacterias, sino también frente a virus y células cancerígenas (Maksimov *et al.,* 2012). Ejemplos de estos péptidos son la microcina J25 y la capistruina. Su mecanismo de acción incluye, luego del ingreso a la célula, la inhibición temporal de la elongación del ARN, la generación de especies de oxígeno reactivas e inhibición de proteasas.

- Clase II: Este grupo incluye bacteriocinas que no contienen modificaciones inusuales y tienen un tamaño menor a 10 KDa.
  - Clase IIa: son péptidos de amplia actividad, similares a la pediocina. Su estructura incluye dos regiones separadas por una articulación flexible. El modo de acción es formando poros mediante la unión al sistema de receptores del transporte de manosa fosfotransferasa, insertándose así en el citoplasma.
  - Clase IIb: este grupo consiste en bacteriocinas formadas por dos péptidos separados, para lograr su máxima actividad ambos deben estar presentes. Ejemplos de estas bacteriocinas son la enterocina X y la lactocoquina G. Actúan a través de una estructura de doble hélice que interacciona con un receptor específico en la membrana causando la plasmólisis.
  - Clase IIc: este grupo de bacteriocinas se sintetizan sin un péptido líder N-terminal. Ejemplos de éstas son las enterocinas L50, 7A y 7B. Su mecanismo de acción se basa en la formación de poros en la membrana lo cual conlleva a la plasmólisis de la célula objetivo.
  - Clase IId: en este grupo se encuentran bacteriocinas de estructura lineal que no presentan ni estructuras ni modos de acción en común. Entre éstas se destacan la lactocoquina A y la enterocina B. El mecanismo de la lactocoquina 972, por ejemplo, es la inhibición de la biosíntesis de la pared celular.
- Clase III: estas bacteriocinas tampoco contienen modificaciones, pero su tamaño es mayor a los 10 KDa y poseen mecanismos de acción que pueden ser líticos o no.

En la Figura I.1 se puede observar un resumen de los mecanismos de acción de las bacteriocinas de diferentes clases.

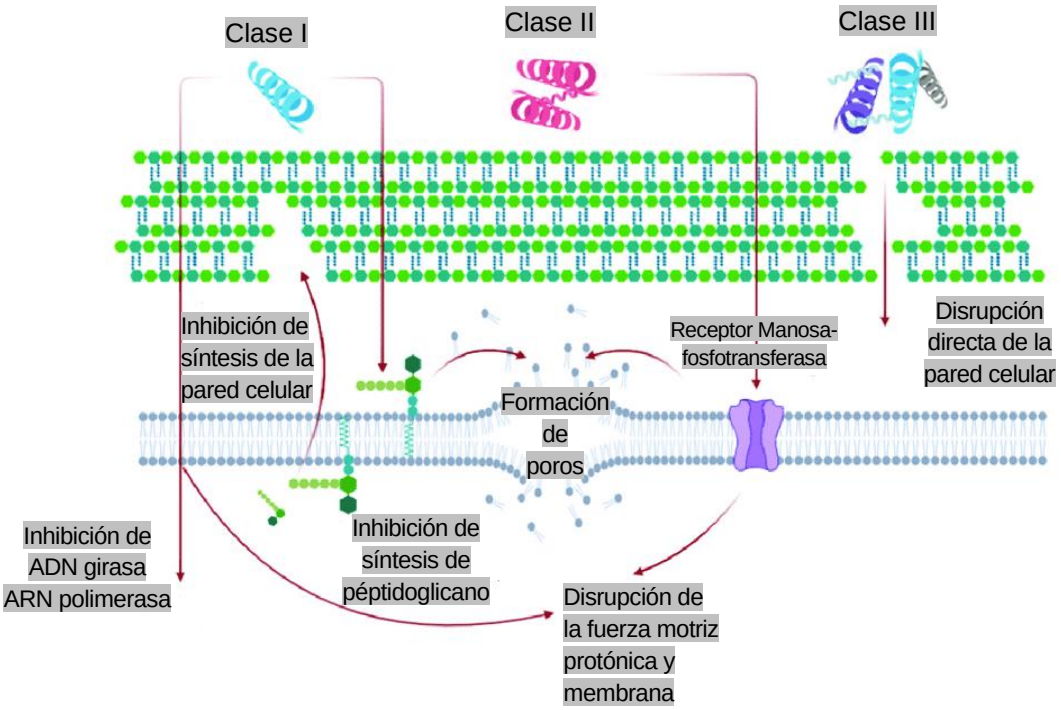


Figura I.2: Mecanismos de acción de las diferentes clases de bacteriocinas sobre células objetivo (Hassoun et al., 2020).

I.1.6 Técnicas *in vitro* para la detección de bacteriocinas

Para lograr la detección de las bacteriocinas, se debe lograr su producción por el microorganismo. Para ello, en general se pueden utilizar medios de cultivo comerciales tales como el caldo MRS. Los principales métodos de detección son los métodos difusión en agar o detección de crecimiento/no crecimiento en medio líquido utilizándose un microorganismo objetivo, que sea sensible a la bacteriocina estudiada (O'Connor *et al.,* 2015a). Para asegurar que la inhibición se deba a la bacteriocina, primero se debe descartar la producción de peróxido de hidrógeno (midiendo la actividad de la catalasa en el SLC) y la inhibición debido a la producción de ácidos (alcalinizando el SLC) (Campos *et al.,* 2006). Los microorganismos más utilizados para ello son: *L. monocytogenes, E. coli* y *S. aureus.*

I.1.6.i Técnicas de difusión en agar

Para detectar la producción de bacteriocinas existen diversas técnicas realizadas sobre medios sólidos. Todas éstas se basan en la detección de un área traslúcida sobre el agar luego de la incubación del SLC en contacto con un cultivo del microorganismo objetivo obtenido en la etapa estacionaria temprana. Éstas se detallan a continuación (Zou *et al.,* 2018):

- Técnica de la gota (TG): en esta técnica se agrega la cepa indicadora sobre el agar, se permite que esta se absorba y se dispensan 10 µl del SLC a ser evaluado. Al necesitar una pequeña cantidad de SLC, esta técnica suele ser utilizada para extractos purificados o semipurificados con una buena acción antagonista.
- Técnica de difusión en agar (TDA): esta técnica consiste en inocular agar con el microorganismo indicador y dejarlo solidificar, para luego realizar pocillos en el mismo y colocar en su interior el SLC. Esta técnica permite incorporar un mayor volumen de SLC siendo conveniente permitir la difusión del mismo en el agar antes de su incubación.
- Técnica de difusión en disco: esta técnica, al igual que en la TG, la cepa indicadora se agrega sobre el agar y luego se coloca un disco de papel de filtro sobre el cual se dispensa el SLC.

I.1.6.ii Técnicas de dilución en medio líquido

Las técnicas en medio líquido se basan en que el SLC entre directamente en contacto con el cultivo objetivo. Luego es posible evaluar el crecimiento o su inhibición por turbidimetría o por recuento de viables en placa. Para estas técnicas resulta de vital importancia incorporar el SLC junto con medio de cultivo fresco, dado que la bacteria productora utiliza en su crecimiento los nutrientes. Es debido a esto que ésta únicamente es útil para SLC con una elevada actividad antagonista, ya que será necesario diluirlo para evaluar su actividad (Hoover y Harlander, 1993). Además, esta técnica se utiliza particularmente para evaluar la actividad del SLC en combinación con otros antimicrobianos o a diferentes pHs para hallar comportamientos sinérgicos en cuanto a la actividad antagonista.

I.1.7 Aplicación de bacterias ácido lácticas en la preservación de pescado como cultivos protectores

El objetivo principal al utilizar BAL como cultivos protectores, consiste en seleccionar bacterias que no contengan factores de virulencia, que mantengan su población al ser incorporadas en el alimento objetivo, que produzcan bacteriocinas en el mismo, y no generen producción de ácidos o presenten actividad proteolítica o lipolítica, comprometiendo las características sensoriales de los alimentos (Holzapfel *et al.,* 1995). Al adicionar el cultivo, la principal ventaja es que -además de producir bacteriocinas- éste puede competir con la flora nativa del alimento, en este caso, el pescado y, de esta manera, colaborar con la inhibición del crecimiento.

Dentro de la legislación, se encuentra permitido el agregado de bacterias GRAS, por lo cual simplemente la identificación de la cepa y la ausencia de factores de virulencia es suficiente para su aplicación en el pescado. En el caso de utilizar dicha cepa como probiótico, se deben realizar las pruebas pertinentes de manera de asegurar la supervivencia de una población mayor a 10^6 UFC/g al llegar al intestino grueso, para asegurar su acción benéfica en el organismo. Una de las formas preliminares de realizar esta comprobación es por medio de digestión *in vitro,* la cual simula las condiciones en el estómago y en el duodeno a las cuales las bacterias estarían sometidas antes de llegar al colon donde ejercerían el efecto probiótico (Melchior *et al.,* 2020).

La principal limitación que presenta la incorporación de los cultivos protectores es su compatibilidad con la matriz alimentaria, ya que los cultivos pueden no desarrollarse adecuadamente o no sobrevivir. Esto se vincula a la heterogeneidad de la composición de los alimentos ya que, incluso muestras pertenecientes a un mismo lote de un producto pueden tener características muy diferentes en cuanto a composición fisicoquímica y microbiológica. Esto implica que, la cepa pueda no obtener los nutrientes necesarios o bien, no pueda competir con la microbiota natural.

En los últimos años se han aplicado cultivos protectores en pescado logrando controlar el recuento total de microorganismos, bacterias psicrófilas y la población de diferentes microorganismos patógenos. En la Tabla I.3 se puede observar un resumen de los adelantos más recientes.

Tabla I.3: Aplicación de cultivos protectores en productos de la pesca (Adaptada de Rathod *et al.* (2021)).

Producto de la pesca	Cultivo protector	Objetivo	Barrera adicional	Referencia
Lubina	*L. lactis* *L. plantarum* *C. piscicola*	Bacterias aerobias mesófilas Bacterias psicrófilas	Aceite esencial de *citrus*	Boulares *et al.* (2018)
Lubina	*L. lactis* *L. plantarum* *C. piscicola*	Nitrógeno básico volátil Ácidos grasos	Envasado al vacío Refrigeración	Boulares *et al.* (2017)
Salmón	*L. curvatus* *C. maltaromaticum* *L. sakei CTC494*	*L. monocytogenes*	Refrigeración Envasado al vacío	Aymerich *et al.* (2019)
Merluza y mero	*L. curvatus* BCS35 *E. faecium* BNM58	Bacterias aerobias mesófilas y coliformes *S. aureus* *Clostridium* spp.	Almacenamiento al vacío Almacenamiento en hielo	Gomez-Sala *et al.* (2016)
Filetes de salmón gralvax	*C. maltaromaticum* SF1944 *L. piscium* EU2229 *Leuconostoc gelidum* EU2249	Bacterias aerobias mesófilas	Refrigeración	Wiernasz *et al.* (2020)
Camarones	*L. piscium CNCM I-4031* *C. divergens V41*	*L. monocytogenes*	Atmósfera modificada	Saraoui *et al.* (2016)
Pasta de tilapia del Nilo	*L. lactis* subsp. lactis 3MT	*Vibro spp.*	Tratamiento térmico a 75 °C por 1 hora	Kaktcham *et al.* (2019)

Dada la perspectiva actual sobre la preservación de pescado, en este capítulo se utilizarán BAL, aisladas del medio marino para utilizarlas como cultivo protector, y preservar pasta de merluza argentina (*Merluccius hubbsi*).

I.2 Objetivos

Aislar, seleccionar y aplicar bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas para la preservación de pescado (Figura I.2).

I.2.2 Objetivos particulares

- Aislar e identificar cepas bacteriocinogénicas de bacterias ácido lácticas presentes en organismos marinos de la costa patagónica.
- Caracterizar la actividad antagonista del sobrenadante libre de células (SLC) de cada una de las cepas.
- Verificar la ausencia de factores de virulencia en las cepas preseleccionadas.
- Identificar la presencia de genes que codifican para la producción de bacteriocinas.
- Seleccionar la cepa bacteriocinogénica más apta para aplicar como cultivo protector.
- Aplicar la cepa seleccionada como cultivo protector para la preservación de pasta de merluza.

La Figura I.3 muestra un diagrama de flujo de las tareas realizadas para cumplir los objetivos del presente capítulo.

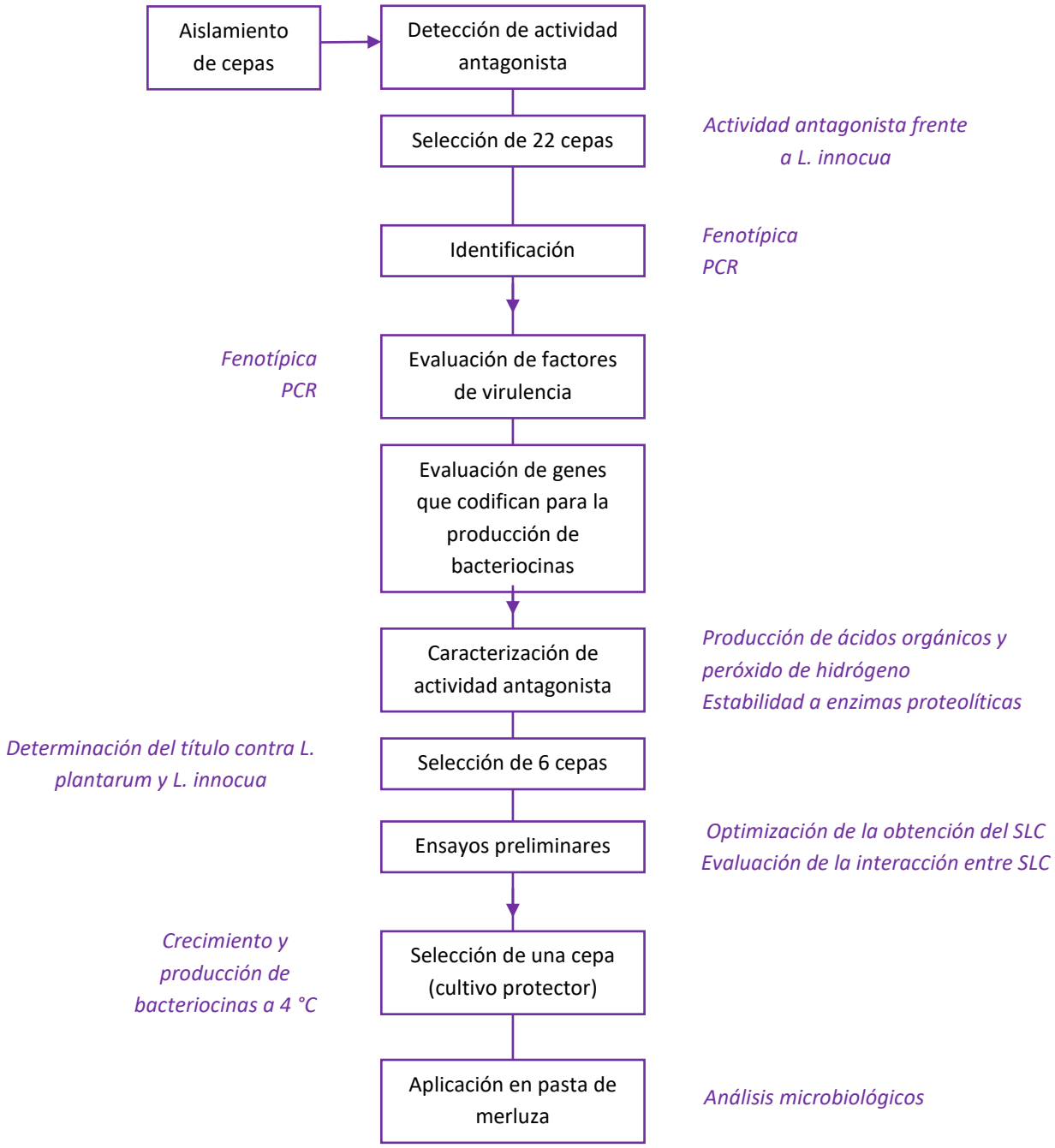


Figura I.3: Esquema de objetivos particulares del capítulo.

I.3 Materiales y Métodos

I.3.1 Aislamiento y selección de bacterias ácido lácticas con actividad antagonista frente a *L. innocua*

I.3.1.i Aislamiento de bacterias ácido lácticas de la costa patagónica

La primera etapa del presente trabajo consistió en el aislamiento de BAL de animales que habitan la costa de la Patagonia argentina. Para llevar a cabo dicho aislamiento, se recolectaron especímenes de moluscos y peces en la costa noreste del municipio de Rawson, provincia de Chubut, en los meses de abril y mayo de 2016. Los moluscos utilizados fueron ejemplares de vieira tehuelche (*Aequipecten tehuelchus*), almeja rayada (*Leukoma antiqua*), mejillón patagónico (*Mytilus edulis platensis*), navaja (*Solen tehuelchus)*, panopea (*Panopea generosa*), pepino de mar (orden *Holothuroidea*), estrella de mar (orden *Forcipulatida)* y ascidia (*Hemiodema spectabilis*). Los peces utilizados fueron pez raya (Familia *Rajidae)*, pez gallo (*Callorhynchus callorhinchus)*, pejerrey (*Odontesthes bonariensis)* y róbalo (*Eleginops maclovinus)*.

En el caso de los moluscos, las muestras se tomaron únicamente de sus vísceras y en el caso de los peces se tomaron muestras de la boca, branquias, tegumento e intestino. El lugar de recolección específico de los especímenes se detalla en la Tabla I.4.

Tabla I.4: Lugar de recolección específica de los especímenes utilizados.

Espécimen	Lugar de recolección
Almeja	Playa Bengoa
Ascidia	Playa Unión zona Norte
Estrella de Mar	Playa Unión
Mejillón	Puerto Madryn
Navaja	Puerto Lobos
Panopea	Puerto Lobos
Pepino de mar	Playa Unión zona Norte
Vieira	Playa Bengoa
Gallo	El sombrerito Playa Unión
Pejerrey	El sombrerito Playa Unión
Raya	El sombrerito Playa Unión
Róbalo	El sombrerito Playa Unión

Los especímenes se enviaron al Laboratorio de Biotecnología Bacteriana de la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia "San Juan Bosco". Una vez en el laboratorio, se tomaron muestras de cada uno de ellos. Para las vísceras de moluscos y peces, se tomó asépticamente una alícuota de 1 g; y en el caso de las muestras de boca, branquias y tegumento de peces, se pasó un ansa estéril por la superficie. Todas las muestras se transfirieron asépticamente a diferentes medios de enriquecimiento con la finalidad de favorecer el desarrollo de diferentes BAL. El esquema general del aislamiento se observa en la Figura I.4.

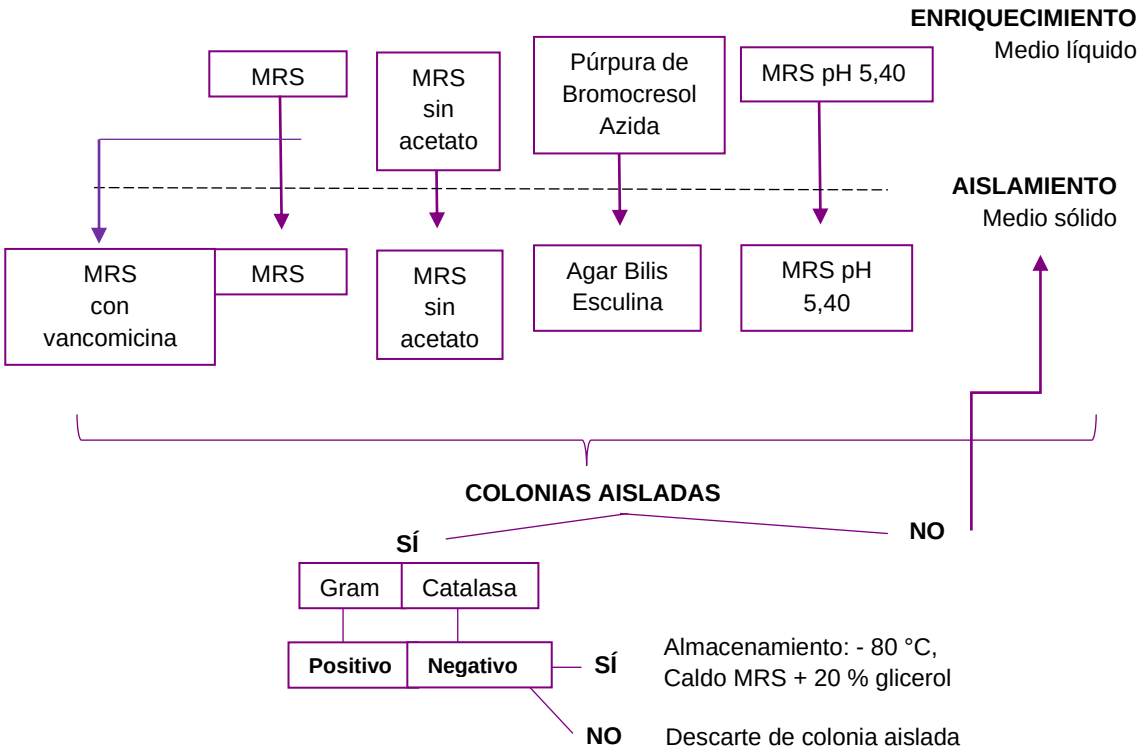


Figura I.4: Esquema de aislamiento de bacterias ácido lácticas de moluscos y peces.

Los caldos nutritivos utilizados fueron: de Man, Rogosa y Sharpe pH 6,50 (MRS), MRS sin acetato de sodio, MRS a pH 5,40 y Púrpura de Bromocresol Azida. Todos se incubaron a 30 °C por 24 horas con excepción del caldo Púrpura de Bromocresol que se incubó por 48 horas ya que es un medio selectivo. El MRS sin acetato de sodio se seleccionó para favorecer el aislamiento del género *Carnobacterium,* ya que el mismo no se desarrolla de manera adecuada en su presencia (Barakat *et al.,* 2000). El MRS a pH 5,40 se utilizó para favorecer el desarrollo de *Lactobacillus* ya que éstos poseen una elevada resistencia a pHs ácidos (Gaudana *et. al.,* 2010).

En el caso de los caldos en los que se observó crecimiento luego de las 48 horas, se tomó una alícuota de 100 µl y se la sembró en agar. En esta etapa del aislamiento, se emplearon iguales medios que en el enriquecimiento, pero con un agregado de 1,5 % de Agar Bacteriológico, con excepción del caldo de Púrpura de Bromocresol, que se transfirió a placas de Agar Bilis Esculina y el MRS que se transfirió a placas de MRS y de MRS con vancomicina, para favorecer el desarrollo de *Lactobacillus* ya que poseen resistencia natural a este antibiótico (Swenson *et. al,* 1994).

Durante la etapa de aislamiento cada una de las placas se incubó a 30 °C por 24 horas, con excepción de las placas de Agar Bilis Esculina, que se incubaron a 37 °C por 48 horas. En las placas en las que fue posible obtener colonias aisladas, se tomó una parte de una colonia y se realizó la tinción de Gram seguida por una observación al microscopio para verificar la homogeneidad del cultivo y su morfología. También se realizó la prueba bioquímica de catalasa. En caso de que las bacterias no mostraran homogeneidad bajo el microscopio, se volvió a realizar un aislamiento en el mismo medio de cultivo, para obtener colonias aisladas. Los cultivos que mostraron homogeneidad bajo el microscopio, que fueron Gram positivos y que no presentaron actividad de catalasa, se transfirieron a placas de agar MRS y se realizó nuevamente un aislamiento para asegurar su pureza. De este segundo aislamiento, también se realizó la tinción de Gram, observación al microscopio y prueba de la catalasa. Todos los cultivos aislados que mostraron homogeneidad se traspasaron a caldo MRS, se incubaron a 30 °C por 24 horas y se almacenaron a -80 °C en el medio de crioconservación correspondiente hasta su uso (MyM generales, Sección 3.4.3).

I.3.1.ii Selección de cepas con actividad antimicrobiana

Con el objetivo de seleccionar cepas adecuadas para la preservación de productos de la pesca, se estudió la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células (SLC) de todas las cepas aisladas, contra *Listeria innocua* ATTC 33090, aplicando la técnica de difusión en agar (TDA) (Devillers *et al.,* 1989).

I.3.1.ii.a Producción del sobrenadante libre de células

Para la producción del SLC, las cepas se incubaron dos veces sucesivas por 16 horas a 30 °C. Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, de manera de obtener un pellet con las bacterias, y un SLC límpido. El SLC obtenido se esterilizó utilizando un filtro para jeringa de 0,22 µm para asegurar la separación completa de todas las bacterias. Finalmente, se colocó en un baño a 100 °C por 5 minutos con la finalidad de inactivar las proteasas que pudieran actuar sobre los compuestos de naturaleza

peptídica presentes, según lo realizado por Schelegueda *et al.* (2015). El SLC se conservó a 4 °C hasta su uso.

I.3.1.ii.b Ensayo de difusión en agar

La cepa *Listeria innocua* ATTC 33090 se seleccionó como indicadora para determinar la actividad antagonista de los SLC, ya que se ha observado que cuando es expuesta a distintos factores de estrés, responde de manera similar que *Listeria monocytogenes*, patógeno usualmente presente en productos de la pesca (Friedy *et al.,* 2008).

Para llevar a cabo las determinaciones, se preparó agar TSB blando (1,2 % de Agar bacteriológico), y se lo inoculó con 10^6 UFC/ml de la cepa indicadora. El agar inoculado se vertió en placas de Petri de 100 mm de diámetro y 15 mm de altura. Tras su solidificación, se realizó un corte circular de 6 mm de diámetro con un sacabocados estéril y al retirar el agar del centro se obtuvieron pocillos en los cuales se colocaron 50 µl del SLC. En esta primera instancia el pH del SLC no se ajustó debido a la alta resistencia de *L. innocua* a valores de pH entre 4,0 y 5,0, que es el rango de pH observado para los SLC. En etapas posteriores se verificó la nula contribución de la disminución del pH a la inhibición.

Como control negativo se utilizó caldo MRS y como control positivo se utilizó nisina a una concentración de 1000 UI/ml. Para favorecer la difusión del SLC, y la ralentización del crecimiento de *L. innocua*, las placas se colocaron a 4 °C por 2 horas y posteriormente se incubaron a 30 °C por 24 horas. Pasado ese tiempo, la actividad antagonista contra la bacteria indicadora se identificó por la aparición de un halo translúcido alrededor del pocillo, el cual indica la inhibición de su crecimiento. El diámetro de los halos se midió con un calibre y las BAL cuyo SLC mostró actividad se seleccionaron para continuar con su caracterización. Todos los ensayos de la TDA se realizaron por triplicado. A modo de ejemplo, la Figura I.5 muestra los halos de inhibición obtenidos para algunas BAL con actividad antagonista.

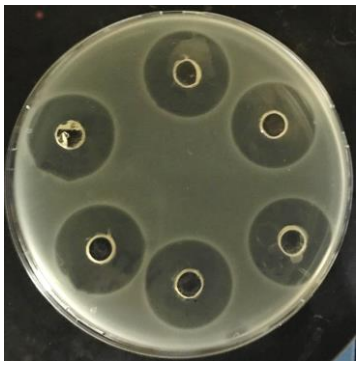


Figura I.5: Halos de inhibición positivos.

I.3.2 Identificación fenotípica y genotípica de las bacterias ácido lácticas seleccionadas

La identificación fenotípica preliminar de las cepas seleccionadas se realizó a nivel de género, mediante la evaluación de: el crecimiento a 45 °C; el crecimiento a pH 9,60 y la hidrólisis de esculina en presencia de sales biliares (40 %). Para todos estos ensayos se realizaron inóculos de cada una de las cepas en caldo TSB y se ajustó el pH, o se agregaron las sales biliares. Todos los inóculos se incubaron a 37 °C por 24 horas, con excepción de las muestras destinadas al ensayo de crecimiento a 45 °C. Los crecimientos evaluados se consideraron positivos al notar turbidez en los tubos, y la hidrólisis de esculina, por la aparición de color negro en el medio de cultivo debido a la formación de sales insolubles de hierro.

Se evaluó también la actividad de las enzimas pirrolidonil aminopeptidasa (PYR) y leucina-aminopeptidasa (LAP). Brevemente, a partir de cultivos puros en agar sangre, se realizó una suspensión densa en 50 µl de solución fisiológica estéril y se agregaron los discos que contenían PYR y LAP. Luego las suspensiones se incubaron a 35 °C o 30 °C por 30 minutos, respectivamente. Para ambas pruebas el resultado positivo se debe a la liberación de un grupo pirrólico en el caso de la enzima PYR o β-naftilamina en el caso de la enzima LAP, que reaccionan con el reactivo cinamaldehído, formándose un compuesto de color rosado o rojo.

Las colonias seleccionadas pertenecientes al género *Enterococcus* se identificaron a nivel de especie mediante la fermentación de azúcares y la producción de pigmento amarillo según el esquema propuesto por Manero y Blanch (1999).

Para estudiar la fermentación de azúcares, se utilizó arabinosa, metil-α-glucopiranósido, manitol, rafinosa, ribosa, sacarosa y sorbosa. Cada cultivo puro, se inoculó en un medio basal de rojo de metilo conteniendo un 1 % de los azúcares a analizar. Además, todos los tubos contenían una campana de Durham para detectar la producción de gas. Los caldos se incubaron por 24 horas a 37 °C. La fermentación de los azúcares se detectó mediante el viraje del medio de rojo a amarillo y la producción de gas, por medio de su recolección en la campana de Durham.

Para determinar la producción de pigmento, se realizó una estría obteniendo colonias aisladas de cada una de las cepas en Agar Tripteína Soja. Las placas se incubaron por 24 horas a 30 °C y luego por 24 horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo la producción de pigmento pudo evidenciarse por la presencia de color amarillo sobre las colonias.

Luego de la identificación fenotípica preliminar, los resultados de las cepas seleccionadas se confirmaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para tal fin, éstas se incubaron a 37 °C durante 12 horas en caldo MRS, se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación Wizard Genomics, Promega. Los cebadores y protocolos utilizados para la amplificación de los genes específicos de especies fueron los descritos por Jackson *et al.* (2004), mientras que para la identificación de género se utilizaron los cebadores rrs (16S ARNr) descritos por Kariyama *et al.* (2000), como un control interno de PCR. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler®. La electroforesis de los productos de la amplificación genética se realizó en gel de agarosa al 1,2 %, a 70 V durante 1 hora en buffer TAE (Tris, ácido acético, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), pH 8,0). Al finalizar la corrida, el gel se colocó durante 20 minutos en una solución de buffer TAE y bromuro de etidio de 0,5 µg/ml posteriormente se lo visualizó con luz UV en un transiluminador, se fotografió y se archivó. Todos los ensayos realizados en esta sección se realizaron por duplicado.

I.3.3 Determinación de factores de virulencia de las cepas seleccionadas

La determinación de los factores de virulencia fue esencial ya que uno de los objetivos de la presente tesis es utilizar las BAL para preservar productos de la pesca; esto implica que las BAL seleccionadas deben ser aptas para consumo humano. La ausencia de factores de virulencia es tan relevante como la capacidad de las cepas para producir un efecto antagonista contra la flora deteriorativa y patógena presente en productos de la pesca.

Las pruebas realizadas fueron las de producción de gelatinasa, de hemolisina y la resistencia a los antibióticos vancomicina y ampicilina. Para todos los casos se evaluó la presencia de los genes que codifican para cada una de ellas, así como su expresión fenotípica. Los factores de virulencia se evaluaron por estas dos vías ya que es posible que la bacteria en ciertas condiciones no exprese la actividad específica, pero que sí tenga el gen y que el mismo no se exprese. En estos casos si bien la cepa en sí no resulta de peligro, existe la posibilidad de la transferencia horizontal del gen que codifica para dicho factor de virulencia. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

La prueba de producción de gelatinasa se realizó para dilucidar si las cepas tienen la capacidad de hidrolizar la gelatina. La prueba se realizó en TSA suplementado con 0,8 % (p/v) de gelatina, sobre el mismo se realizó un estriado con cada cepa. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C y se revelaron con una solución de ácido tricloroacético 20 % (v/v). Las zonas claras alrededor de las colonias se consideraron como actividad positiva (Kanemitsu *et al,.* 2001).

La producción de hemolisina se evaluó en agar Cerebro-Corazón suplementado con sangre desfibrinada de conejo al 5 %. Para ello primero las cepas se incubaron durante 18 horas en caldo MRS a 30 °C bajo una leve agitación hasta la etapa estacionaria de crecimiento. Luego se realizó una estría de cada cepa en el agar mencionado y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Los resultados se interpretaron como positivos cuando se observó un halo de hemólisis completa alrededor de las colonias (β-hemólisis).

Otro de los factores relacionados con la capacidad de los enterococos para causar infecciones con riesgo de vida en humanos es su resistencia a antibióticos. Tanto la vancomicina como la ampicilina son antibióticos a los cuales los enterococos pueden poseer resistencia (Semedo et al., 2003). Para la búsqueda de microorganismos con potencial resistencia se sembró 1 ml de suspensiones bacterianas de 10^6 UFC/ml en placas de Agar Bilis Esculina en superficie suplementado con vancomicina (6 µg/ml) o ampicilina (2 µg/ml) según las recomendaciones de Domig *et al.* (2003). Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C y se consideró crecimiento cuando se observó desarrollo de color negro en el medio citado evidenciándose la resistencia a dichos antibióticos.

En la Tabla I.5 se observan los cebadores específicos para detectar los genes que codifican para los factores de virulencia estudiados. En el caso de la producción de gelatinasa, la expresión del gen gelE, es regulada por los productos de fsrA, fsrB y fsrC, por lo cual la detección de la presencia del gen gelE, no necesariamente implica la expresión fenotípica del mismo (Franz *et al.,* 2001). Es por esto, que es necesario evaluar si la cepa expresa la enzima y también si posee el gen que codifica para su producción.

Tabla I.5: Cebadores de PCR utilizados para evaluar la presencia de genes que codifican la expresión de factores de virulencia de los enterococos

Factor de virulencia	Secuencia (5` - 3`)	Tamaño (pb)	Referencia
Agg	f: AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	1553	
	r: AAACGGCAAGACAAGTAAATA		Eaton y Gasson, 2001
gelE	f: ACCCCGTATCATTGGTTT	419	
	r: ACGCATTGCTTTTCCATC		Eaton y Gasson, 2001
Esp	f: TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	933	
	r: GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA		Eaton y Gasson, 2001
hylEfm	f: GAGTAGAGGAATATCTTAGC	661	
	r: AGGCTCCAATTCTGT		Rice *et al.,* 2003
IS16	f: CATGTTCCACGAACCAGAG	547	
	r: TCAAAAAGTGGGCTTGGC		Werner *et al.,* 2011
$CylL_l$	f: GATGGAGGGTAAGAATTATGG	253	
	r: GCTTCACCTCACTAAGTTTTATAG		Semedo et al., 2003
$CylL_s$	f: GAAGCACAGTGCTAAATA AGG	240	
	r: GTATAAGAGGGCTAGTTTCAC		Semedo et al., 2003

El protocolo de PCR utilizado para *agg*, *gel*E y *esp* fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos. Posteriormente 29 ciclos, donde se utilizó una temperatura de desnaturalización de 92 °C por 15 segundos; temperatura de templado (annealing) propia para cada primer durante 15 segundos; y temperatura de extensión de 72 °C por 15 segundos. Finalmente, se realizó una extensión de 72 °C durante 2 minutos.

El protocolo utilizado para IS16 fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 minutos. Posteriormente se realizaron 30 ciclos compuestos por: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos; templado a 53 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 30 segundos, seguido por una extensión final a 72 °C durante 4 minutos.

En el caso del protocolo utilizado para *cyl*L_S y *cyl*L_L se realizó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, y extensión a 72 °C por 2 minutos. Finalmente, una extensión a 72 °C por 7 minutos.

Las ampliaciones se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa de 1,5 g/ml seguido por una tinción con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) y se visualizaron en un transiluminador UV.

I.3.4 Caracterización de la actividad antagonista y selección de cepas

I.3.4.i Detección de genes que codifican para la producción de bacteriocinas

Para comprobar que el efecto inhibitorio de los SLC de las bacterias se deba a la producción de bacteriocinas, en primera instancia, se procedió a la amplificación de genes que codifican para su producción en la especie identificada, la cual, como se detallará en la sección de Resultados, fue *E. mundtii*. La presencia de estos genes, si bien no aseguran la expresión de la bacteriocina, muestran la potencial capacidad de la cepa para producirla.

En esta instancia, se utilizaron cebadores específicos que codifican para la amplificación de los genes relacionados con la producción de enterocina A, B, P, L50A, L50B, mundticina KS, bacteriocina 96, bacteriocina 31, 1071 A/B, enterocina Q y HirJM 79. Las condiciones generales de PCR y los cebadores utilizados fueron aquellos descriptos por los autores mencionados en la Tabla I.6. Todas las amplificaciones se realizaron por triplicado.

Tabla I.6: Secuencias de los cebadores para la amplificación por PCR de los genes de enterocinas en cepas de E. mundtii

Bacteriocina	Secuencia (5` - 3`)	Tamaño (pb)	Referencia
Enterocina A	f: GGTACCACTCATAGTGGAAA		
	r: CCCTGGAATTGCTCCACCTAA	138	De Vuyst *et al.,* 2003
Enterocina B	f: CAAAATGTAAAAGAATTAAGTACG		
	r: AGAGTATACATTTGCTAACCC	201	De Vuyst *et al., 2003*
Enterocina P	f: GCTACGCGTTCATATGGTAAT		
	r: TCCTGCAATATTCTCTTTAGC	87	De Vuyst *et al., 2003*
Enterocina LB50A	f: ATGGGAGCAATCGCAAAATTA		
	r: TTTGTTAATTGCCCATCCTTC	274	De Vuyst *et al.,* 2003
Enterocina LB50B	f: ATGGGAGCAATCGCAAAATTA		
	r: TAGCCATTTTTCAATTTGATC	274	De Vuyst *et al.,* 2003
Bacteriocina 96	f: GTGGAGAGGACGAAAGGAGA		
	r: TTGATTAGTGGAGAGGACGGATTA	291	Henning *et al.,* 2015
Bacteriocina 31	f: CCTACGTATTACGGAAATGGT		
	r: GCCATGTTGTACCCAACCATT	130	Özdemir *et al.,* 2011
Bacteriocina Enterocina 1071 A/B	f: GGGGAGAGTCGGTTTTTAG		
	r: ATCATATGCGGGTTGTAGCC	273	Martín *et al.,* 2006
Enterocina Q	f: ATGAATTTTCTTCTTAAAAATGGTATCGCA		
	r: TTAACAAGAAATTTTTTCCCATGGCAA	105	Belgacem *et al.,* 2010
Mundticina KS	f: TGAGAGAAGGTTTAAGTTTTGAAGAA		
	r: TCCACTGAAATCCATGAATGA	379	Zendo *et al.,* 2005
Hiracina JM 79	f: TGAAAAAGAAAGTATTAAAACATTGTGTTATTCTAGG		
	r: TAAGTTAAGCTTGTACTACCTTCTAGGTGCCCATGGACC	408	Almeida *et al.,* 2011

I.3.4.ii Contribución del peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos a la actividad antagonista de los sobrenadantes libre de células

Para evaluar la posible contribución del peróxido de hidrógeno a la actividad antimicrobiana del SLC (sin ajustar su pH), el mismo fue tratado con una concentración de 2 mg/ml de catalasa e incubado por 1 hora a 37 °C. Si el SLC tuviera peróxido de hidrógeno el mismo

dismutaría debido a la acción de la catalasa y la actividad antagonista del mismo disminuiría posteriormente.

Para analizar la posible contribución del bajo pH del SLC a la actividad, el mismo fue alcalinizado con NaOH 0,1 N hasta pH 7,0.

Se evaluó la actividad antagonista contra *L. innocua* por medio de la TDA antes y después de realizar los tratamientos mencionados. Una disminución de la misma significó la existencia de acción inhibitoria debida a la presencia de peróxido de hidrógeno o de ácidos orgánicos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

I.3.4.iii Sensibilidad a enzimas

Los SLC se trataron con enzimas hidrolíticas: lisozima, pronasa, tripsina, pepsina y bromelina. Las enzimas, a una concentración final de 10 mg/ml, se disolvieron en los buffers que se observan en la Tabla I.7, tal como lo recomiendan los fabricantes. Como control negativo y positivo se empleó una solución de las enzimas y otra de cada uno de los SLC, respectivamente. Dichas soluciones se diluyeron en agua estéril. Las muestras se incubaron a 30 °C por 4 horas y la actividad residual contra *L. innocua* se determinó por la TDA por triplicado.

Tabla I.7: Buffers utilizados para evaluar la acción de diferentes proteasas sobre el SLC de las cepas elegidas de E. mundtii

	Buffer	pH
Tripsina	Buffer Tris-ácido clorhídrico	8,0
Pronasa	Buffer fosfato	7,5
Bromelina	Buffer citrato	4,5
Pepsina	Buffer acetato	3,5
Lisozima	Buffer fosfato	6,5

I.3.4.iv Determinación de la actividad del sobrenadante libre de células sobre *L. innocua* y flora deteriorativa de pescado

Luego de evaluar la actividad de los SLC de las BAL contra *L. innocua*, con el objetivo de seleccionar la/s de mayor actividad para ensayos posteriores, se evaluó su actividad a pH 6,0 frente a bacterias de colección representativas de la flora deteriorativa del pescado. Este pH fue seleccionado, ya que el pH del pescado fresco oscila entre 6,0 y 6,5 y se trata de no modificarlo. Las cepas indicadoras elegidas fueron: *L. innocua* ATTC 33090, *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC 9027*, P. fluorescens* ATCC 49838*, Shewanella putrefaciens* ATCC 8071 y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Como se mencionó anteriormente, *L. innocua* se utilizó como subrogante del patógeno *L. monocytogenes* ya que ambas responden de manera similar ante factores de stress, siendo *L. innocua* algo más resistente (Char *et al.,* 2010; Friedly *et al.,* 2008). *P. aeruginosa, P. fluorescens, L. plantarum* y *S. putrefaciens* se utilizaron como representantes de la flora deteriorativa presente en pescado, ya que las mismas presentan actividad proteolítica y favorecen el deterioro del músculo del pescado. En el caso de *S. putrefaciens,* ésta también produce H_2S y trimetilamina, generando aromas desagradables (Gram y Dalgaard, 2002). Antes de su uso, todas las bacterias se inocularon e incubaron según las condiciones descritas en la Tabla 3 de la Sección 3.4.3 de MyM generales. Para determinar la actividad antagonista contra estos microorganismos, se utilizó la TDA. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

I.3.4.v Selección de cepas con mayor actividad antagonista: cuantificación de la actividad del sobrenadante libre de células

Debido a que todas las BAL evaluadas presentaron una actividad antagonista muy similar contra las bacterias indicadoras, para poder seleccionar alguna, fue necesario cuantificar dicha actividad. Por ello se determinó el título de cada SLC contra las cepas que habían sido inhibidas previamente. El título se definió como la dilución máxima de SLC que posee actividad antagonista sobre la cepa en estudio.

La cuantificación se realizó por medio de diluciones seriadas del SLC en caldo TSB utilizando la TDA. Las diluciones utilizadas fueron 2^{-1}, 4^{-1}, 8^{-1}, 16^{-1}, 32^{-1}, 64^{-1}, 128^{-1} y 256^{-1} y 512^{-1}. El pH utilizado fue de 6,0. En base a los resultados, se seleccionaron las 6 cepas que mostraron mayor título contra las cepas indicadoras.

I.3.5 Optimización de la producción del sobrenadante libre de células

Con la finalidad de estudiar las condiciones óptimas para la producción de las bacteriocinas, se evaluó la capacidad de crecimiento de las cepas seleccionadas y de producción de bacteriocinas luego de varios repiques sucesivos, a diferentes temperaturas y tiempos. Además, se procedió a la optimización del orden del proceso de alcalinización y del tratamiento térmico (TT) del SLC ya que las bacteriocinas, en medio alcalino, pueden ser termolábiles (Jack *et al.,* 1996; Leite *et al.,* 2016).

La producción de bacteriocinas se evaluó realizando 1, 2 y 3 repiques sucesivos desde el inóculo conservado en ultrafreezer. En cuanto a las condiciones tiempo - temperatura, inicialmente las cepas se incubaron a 25 °C y a 30 °C por 18 horas ya que era el tiempo

recomendado según Zendo *et al.* (2005). Luego, se seleccionó una temperatura y se procedió a optimizar el tiempo de incubación a la misma. Para ello se realizaron dos repiques sucesivos de las cepas evaluadas y las mismas se incubaron en caldo MRS por 0, 15, 39, 48, 63 y 72 horas. En cada condición se produjo un SLC y se midieron diferentes parámetros relacionados con la actividad antagonista y el desarrollo de las BAL. Éstos fueron: el pH, utilizando un pH-ímetro; la turbidez, utilizando un turbidímetro y el diámetro del halo producido por cada SLC (a pH 6,0) contra *L. innocua* por medio de la TDA.

En cuanto a la optimización del proceso de alcalinización, se decidió probar la posibilidad de realizar primero la alcalinización del SLC y posteriormente el tratamiento térmico -descrito anteriormente- o viceversa. En este caso, también se evaluó la estabilidad de la actividad antimicrobiana, mediante la TDA, luego de cada uno de los pasos: producción del SLC (control), alcalinización y tratamiento térmico. En la Figura I.6 se presenta un esquema general del proceso de optimización de producción del SLC.

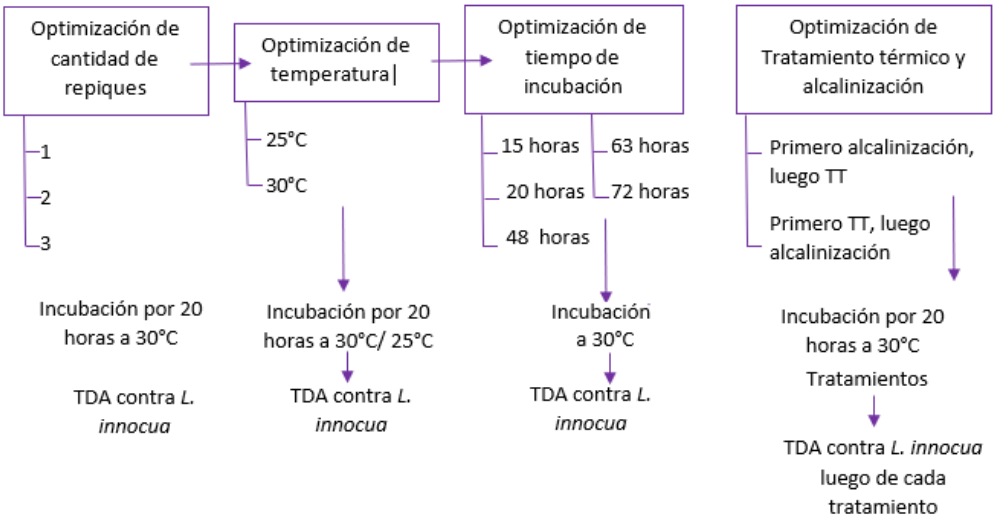


Figura I.6: Proceso de optimización de la producción de bacteriocinas contenidas en el SLC.

I.3.6 Determinación del tipo de interacción existente entre sobrenadantes libres de células de las cepas seleccionadas

La evaluación de la interacción existente entre los SLC se realizó en medio líquido. Inicialmente, fue necesario obtener el título de cada una de las 6 cepas contra *L. innocua* por medio de la técnica de microdilución en caldo a pH 6,0. Esto se debe a que el título no solo depende del agente antimicrobiano utilizado, sino de la técnica por medio de la cual éste se evalúe (Balouiri *et al.,* 2016). Para ello, se prepararon diluciones sucesivas en caldo TSB del SLC de cada una de las cepas seleccionadas y un inóculo de *L. innocua* de 10^7 UFC/ml. Las concentraciones evaluadas se encontraron en el rango comprendido entre 2^{-1} y

512^{-1}. Se utilizó una microplaca de 96 pocillos. En cada uno de ellos se sembraron 180 µl de concentraciones decrecientes de SLC y 20 µl de inóculo de *L. innocua*. Excepcionalmente en el caso de la concentración del SLC de 2^{-1}, se utilizó caldo TSB doble concentrado para asegurar que éste no se diluyera y disminuyera la concentración de nutrientes en comparación a las otras diluciones del SLC. Como control negativo se utilizó caldo TSB sin inocular y como control positivo caldo TSB inoculado en ausencia de SLC. Además, el control negativo fue utilizado como blanco de absorción. La microplaca se incubó en un lector de microplacas a una temperatura de 30 °C y se tomaron medidas de absorbancia a 600 nm cada 1 hora. Se consideró un efecto inhibitorio cuando la diferencia de absorbancia fue menor a 0,1. Como título se consideró la mayor dilución en la cual *L. innocua* no creció por 24 horas. Todas las determinaciones se realizaron por sextuplicado.

La interacción entre las mezclas binarias de los SLC se evaluó por medio de la técnica de microdilución en caldo utilizando *L. innocua* como cepa indicadora (Schelegueda *et al.,* 2012). Las concentraciones utilizadas fueron elegidas siguiendo el modelo de Berembaum modificado (Tabla I.8), el cual incluye concentraciones inhibitorias (título) y subinhibitorias (fracciones de dicho título) de cada SLC (Berembaum, 1978).

Se utilizó una microplaca por cada mezcla binaria, de manera que cada dilución sea sembrada por sextuplicado. Todas las microplacas se incubaron a 30 °C por 24 horas. La absorbancia de cada pocillo se leyó a 600 nm cada 1 hora utilizando un lector de microplacas. El índice de la concentración fraccionaria inhibitoria (CFI_i) se calculó según la Ecuación I.1. Éste expresa la suma de los cocientes obtenidos cuando se divide el título de los SLC combinados (TítuloA-B o TítuloB-A) por el título del SLC utilizado individualmente (TiítuloA o TítuloB).

$$CFI_i = (TítuloA\text{-}B / TítuloA) + (TítuloB\text{-}A / TítuloB)$$

Ecuación I.1

Un CFI_i cercano a 1 indica un efecto aditivo, un valor menor a 1 indica sinergismo, y un valor mayor a 1 indica un efecto antagonista (Balouiri *et al.,* 2016).

Tabla I.8: Diseño de Berembaum para evaluación de interacciones de antimicrobianos

Experimento	SLC cepa A	SLC cepa B	FIC
1	1*	0	1
2	0	1	1
3	1/2	1/2	1
4	1/3	1/3	0,66
5	1/3	1/6	0,5
6	1/6	1/3	0,5
7	1/6	1/6	0,33
Control	0	0	-

*El título se ve expresado en la Tabla como 1, y las fracciones expresadas son en referencia al mismo.

I.3.7 Selección de bacterias ácido lácticas para aplicación como cultivo protector: crecimiento y producción de bacteriocinas durante el almacenamiento a 4 °C

Para evaluar la posibilidad de utilizar una de las cepas como cultivo protector, se determinó la capacidad de supervivencia, crecimiento, y producción de bacteriocinas a 4 °C. Con el objetivo de adaptar a las BAL seleccionadas para desarrollarse a 4 °C, cada cultivo, se repicó en caldo MRS dos veces a 30 °C por 24 horas. Posteriormente, se transfirió a MRS fresco y se incubó a 15 °C por 3 días. Finalmente, las BAL se transfirieron a caldo MRS y se incubaron por 10 días a 4 °C.

Se estudió el crecimiento de las BAL a las tres temperaturas mencionadas. Para ello, se sembraron, en una microplaca de 96 pocillos, 200 µl de caldo MRS inoculado con una concentración de 10^6 UFC/ml de cada una de las cepas, individualmente. Las microplacas se incubaron a 30 °C, 15 °C y 4 °C, y su absorbancia fue medida a 600 nm en un lector de microplacas a intervalos regulares de tiempo hasta que los cultivos llegaron a la etapa estacionaria de crecimiento. A partir de los datos obtenidos, se construyeron las curvas de crecimiento de todas las BAL seleccionadas a las 3 temperaturas. Las curvas se realizaron por septuplicado para cada microorganismo y cada condición de crecimiento.

Se modelaron todas las curvas obtenidas a 4 °C y, a modo de ejemplo, aquellas correspondientes a la cepa STw38 incubada a 15 y 30 °C. Para eso, se aplicó el modelo de Gompertz (*Ecuación I.2*). Los parámetros obtenidos fueron: λ (tiempo de etapa lag), µ

(velocidad de crecimiento) y A (valor asintótico, que representa la absorbancia máxima alcanzada). El valor t de la ecuación, representa el tiempo expresado en horas. El software utilizado para realizar el modelado fue *Statgraphics Centurion XV Versión 5.2.06*. Para evaluar la bondad del ajuste, se calcularon el coeficiente de determinación (R^2adj) y el error cuadrático medio (RMSE).

$$y = A.exp\{-exp[1 + \frac{\mu}{A}(\lambda - t)]\}$$

Ecuación I.2

Dado que todas las cepas lograron crecer adecuadamente a 4 °C, se evaluó la actividad de los SLC producidos a dicha temperatura. Para tener certeza de extraer la muestra en la etapa estacionaria temprana, se utilizaron los datos de las curvas de crecimiento construidas previamente. El SLC se obtuvo según lo indicado en la Sección I.3.1.iii. La detección y cuantificación de la actividad antagonista contra *L. innocua* y *L. plantarum* se analizó por medio de la TDA. Esta etapa del trabajo permitió seleccionar una cepa para ser empleada como cultivo protector debido a su capacidad de crecer y producir bacteriocinas durante el almacenamiento refrigerado.

I.3.8 Aplicación de *E. mundtii* STw38 para la preservación de pasta de merluza

Anteriormente, se determinó que las BAL eran capaces de crecer y producir bacteriocinas a una temperatura de 4 °C y que la actividad del SLC de *E. mundtii* STw38 producido a esta temperatura era mayor a la del resto de los SLC. Por esta razón, se evaluó el efecto de la presencia de dicha BAL sobre la calidad de pasta de merluza inoculada con *L. innocua*, envasada al aire o al vacío y almacenada a 4 °C.

I.3.8.i Preparación de la pasta de merluza

Se trabajó con merluza argentina (*Merluccius hubbsi*). Los especímenes enteros se transportaron hasta el laboratorio preservados en hielo. Allí, se lavaron bajo agua corriente cuidadosamente, se eviscerarón y se filetearon en condiciones asépticas bajo flujo laminar. Los filetes se lavaron con agua clorinada estéril (7 mg/l) y se procesaron utilizando una procesadora Yelmo Extra a velocidad máxima por 20 segundos. La pasta obtenida se ajustó a un pH de 6,0 con ácido cítrico (25 g/100 g) previamente esterilizado, se colocó en bolsas estériles y se homogenizó por 3 minutos de manera manual para poder esparcir el ácido cítrico y asegurar la homogeneidad del pH en toda la pasta.

I.3.8.ii Preparación de los sistemas

Para la preparación de los sistemas, fue necesario adaptar el inóculo de *E. mundtii* STw38 para crecer a 4 °C. En el caso del inóculo de *L. innocua* se procedió según la sección 4.3 de MyM generales. Solamente se adaptó el inóculo de *E. mundtii* debido a que el objetivo de adicionar *L. innocua* es simular una contaminación y no resultó necesario adaptarla.

Ambos inóculos se centrifugaron a 8500 rpm y 4 °C por 10 minutos, el sobrenadante se descartó y el pellet, lavado dos veces con agua destilada estéril a pH 6,0, se resuspendió en 1 ml de la misma. Los inóculos se agregaron a la pasta de pescado de manera de obtener una concentración de 10^3 UFC/g para *L. innocua* y 10^6 UFC/g para *E. mundtii* STw38 (MyM generales, sección 3.4.3). La pasta se homogenizó manualmente para distribuirlos. En este ensayo no se incluyeron controles sin el agregado de *L. innocua* dado que en estudios previos se determinó que esta no afecta el desarrollo de la flora nativa en pescado (Schelegueda *et al.,* 2016).

Cada sistema se separó en porciones de 30 g dentro de placas de Petri plásticas, sin tapa, de 60 mm de modo de simular una hamburguesa de pescado. Cada hamburguesa se colocó en una bandeja de polipropileno dentro de una bolsa de Cryovac, y se envasó en aire o al vacío, según corresponda, utilizando una envasadora Multivac. Las hamburguesas envasadas en aire se almacenaron a 4 °C por 6 días y las envasadas al vacío se almacenaron a la misma temperatura, durante 10 días. Las muestras se tomaron los días 0, 3, 6 y 10. Los 4 sistemas estudiados se muestran en la Tabla I.9 y en la Figura I.7, se puede observar un esquema de la inoculación y almacenamiento de los sistemas.

Tabla I.9: Formulación de los sistemas

Sistema	Inóculos	Envasado	Almacenamiento
L	*L. innocua*	Aire	6 días
LE	*L. innocua* y *E. mundtii* STw38	Aire	6 días
LV	*L. innocua*	Vacío	10 días
LEV	*L. innocua* y *E. mundtii* STw38	Vacío	10 días

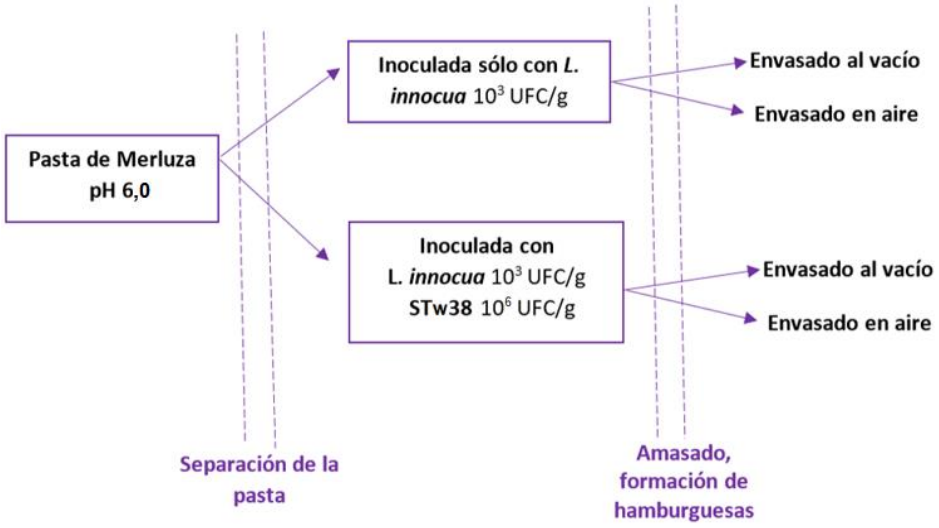


Figura I.7: Inoculación y almacenamiento de pasta de merluza.

I.3.8.iii Análisis microbiológicos

En cada tiempo de toma de muestra, se realizaron los recuentos de *Listeria* spp., *Enterococcus* spp. y de bacterias aerobias mesófilas. Las especificaciones de cada recuento se encuentran en la Tabla 4 de MyM generales. Se optó por no evaluar las bacterias psicrófilas ya que en estudios previos se demostró que sus resultados en merluza son similares a los de bacterias mesófilas a lo largo del almacenamiento (Campos *et al.,* 2005; Campos *et al.,* 2006).

I.3.8.iv Determinación de producción de bacteriocinas *in situ*

La producción de bacteriocina *in situ* por parte de *E. mundtii* STw38 se evaluó aplicando la TDA modificada. Para ello, se agregó a los pocillos del agar una porción de pasta de pescado con el objetivo de comprobar si efectivamente había bacteriocinas presentes en la muestra. La actividad antimicrobiana de la pasta fue evaluada antes y después de realizarle un tratamiento térmico para inhibir la transferencia de células viables de *E. mundtii* STw38 al agar. De esta manera se descartó la actividad debida al desarrollo de la cepa *in situ*.

Para realizar el tratamiento térmico, se tuvieron en cuenta dos variables. La primera fue lograr la inactivación de la población de bacterias, y la segunda fue la resistencia térmica de las bacteriocinas al tratamiento térmico. Se ensayaron tiempos de exposición de la pasta a baño de agua a 100 °C de entre 30 segundos y 5 minutos, y se seleccionó el menor tiempo capaz de inactivar las bacterias presentes en la muestra. Este tratamiento, potencialmente, preservaría la estabilidad de las bacteriocinas, pues anteriormente se había demostrado una resistencia térmica en el SLC de 5 minutos a 100 °C.

I.3.9 Análisis estadístico

Se utilizó un ANOVA de 1 factor para analizar las diferencias significativas entre los tamaños de los halos de *L. innocua* y de *L. plantarum* entre las cepas bacteriocinogénicas; para comparar los parámetros del modelo de Gompertz a las diferentes temperaturas para la cepa STw38 y para diferentes cepas a 4 °C.

Se utilizó un ANOVA de 2 factores para comparar el crecimiento de las bacterias aerobias mesófilas, entre tiempos y entre sistemas, tanto para los sistemas al vacío como para los sistemas envasados en aire.

Para los títulos evaluados se consideró significativo una diferencia de una dilución, ya que ésta representa el doble de la concentración anterior.

I.4 Resultados y discusión

I.4.1 Aislamiento y preselección de bacterias ácido lácticas con actividad antagonista frente a *L. innocua*

El aislamiento resultó en un total de 121 bacterias que cumplieron con las condiciones de ser Gram positivas y catalasa negativas, características que correlacionan correctamente con el grupo de BAL. Las cepas aisladas se numeraron del 1 al 121 por orden de aislamiento. Se evaluó la actividad antagonista contra *L. innocua* de cada una de ellas por medio de la TDA. En total, 22 cepas presentaron actividad antagonista y se seleccionaron para continuar su caracterización. En la Tabla I.10 se detalla el número de las cepas aisladas, su origen, los medios utilizados para su aislamiento y, también, el tamaño del halo generado por aquellas que mostraron actividad inhibitoria (sin ajustar el pH del SLC).

Tabla I.10: Condiciones de aislamiento y actividad antagonista de cepas seleccionadas.

Cepa STw	Espécimen	Caldo de enriquecimiento	Medio para su aislamiento	Actividad antimicrobiana (mm)
1	Mejillón	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A*
2	Almeja	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
3	**Vieira**	**MRS sin acetato**	**MRS sin acetato**	**25****
4	Panopea	MRS	MRS + Vancomicina	S/A
5	Ascidia	MRS	MRS + Vancomicina	S/A
6	Vieira	MRS	MRS + Vancomicina	S/A
7	Vieira	MRS	MRS + Vancomicina	S/A
8	Vieira	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
9	Vieira	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
10	Vieira	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
11	Vieira	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
12	Mejillón	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
13	**Almeja**	**MRS pH 5,4**	**MRS pH 5,4**	**28**
14	Ascidia	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
15	Estrella de Mar	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
16	Pepino de mar	CPBA***	Agar Bilis Esculina	S/A
17	Estrella de Mar	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A

18	Navaja	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
19	Mejillón	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
20	Almeja	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
21	Pepino	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
22	Pepino	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
23	Vieira	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
24	Vieira	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
25	Navaja	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
26	**Almeja**	**MRS sin acetato**	**MRS sin acetato**	**24**
27	Panopea	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
28	Ascidia	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
29	Ascidia	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
30	Mejillón	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
31	Panopea	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
32	Vieira	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
33	**Vieira**	**MRS**	**MRS**	**22**
34	Vieira	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
35	**Almeja**	**CPBA**	**Agar Bilis Esculina**	**24**
36	Estrella de Mar	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
37	Navaja	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
38	**Almeja**	**MRS sin acetato**	**MRS sin acetato**	**26**
39	**Navaja**	**CPBA**	**Agar Bilis Esculina**	**22**
40	**Navaja**	**CPBA**	**Agar Bilis Esculina**	**21**
41	Ascidia	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
42	**Mejillón**	**MRS sin acetato**	**MRS sin acetato**	**23**
43	Navaja	MRS	MRS	S/A
44	Vieira	MRS sin acetato	MRS sin acetato	S/A
45	Ascidia	MRS	MRS	S/A
46	**Almeja**	**MRS**	**MRS**	**24**
47	**Almeja**	**MRS**	**MRS**	**25**
48	Almeja	MRS	MRS	S/A
49	**Mejillón**	**MRS**	**MRS**	**24**
50	Vieira	MRS	MRS	S/A
51	**Pepino de mar**	**MRS**	**MRS**	**24**

52	Vieira	MRS	MRS	S/A
53	Vieira	MRS	MRS	S/A
54	**Pepino de mar**	**MRS**	**MRS**	**25**
55	**Mejillón**	**MRS**	**MRS**	**25**
56	Vieira	MRS	MRS	S/A
57	Vieira	MRS	MRS	S/A
58	Navaja	MRS	MRS	S/A
59	Navaja	MRS	MRS	S/A
60	**Pepino de Mar**	**MRS sin acetato**	**MRS sin acetato**	**24**
61	Vieira	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
62	Vieira	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
63	Vieira	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
64	Vieira	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
65	Estrella de Mar	MRS	MRS	S/A
66	**Navaja**	**MRS**	**MRS**	**24**
67	Navaja	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
68	**Mejillón**	**MRS pH 5,4**	**MRS pH 5,4**	**23**
69	Panopea	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
70	**Panopea**	**MRS pH 5,4**	**MRS pH 5,4**	**23**
71	Vieira	MRS	MRS + Vancomicina	S/A
72	Vieira	MRS	MRS + Vancomicina	S/A
73	Pepino de Mar	MRS	MRS + Vancomicina	S/A
74	Pepino de Mar	MRS	MRS + Vancomicina	S/A
75	Mejillón	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
76	Vieira	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
77	**Vieira**	**CPBA**	**Agar Bilis Esculina**	**22**
78	**Almeja**	**CPBA**	**Agar Bilis Esculina**	**22**
79	**Vieira**	**CPBA**	**Agar Bilis Esculina**	**21**
80	Ascidia	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
81	Estrella de Mar	MRS	MRS + Vancomicina	S/A
82	Estrella de Mar	MRS	MRS + Vancomicina	S/A
83	Tegumento Raya	MRS	MRS	S/A
84	Róbalo Tegumento	MRS	MRS	S/A
85	Pejerrey Tegumento	MRS	MRS	S/A

86	Gallo Intestino	MRS	MRS	S/A
87	Raya Intestino	MRS	MRS	S/A
88	Gallo Branquias	MRS	MRS	S/A
89	Raya tegumento	MRS	MRS + Vancomicina	S/A
90	Róbalo Tegumento	MRS	MRS + Vancomicina	S/A
91	Pejerrey Tegumento	MRS	MRS + Vancomicina	S/A
92	Gallo Tegumento	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
93	Raya tegumento	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
94	Róbalo Tegumento	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
95	Pejerrey Tegumento	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
96	Gallo Intestino	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
97	Pejerrey intestino	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
98	Raya Intestino	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
99	Róbalo intestino	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
100	Gallo Intestino	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
101	Pejerrey intestino	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
102	Pejerrey branquia	MRS	MRS	S/A
103	Raya Boca	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
104	Raya Materia Fecal	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
105	Raya Boca	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
106	Róbalo Tegumento	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
107	Raya tegumento	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
108	Raya Branquias	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
109	Róbalo Intestino	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
110	Raya Boca	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
111	Pejerrey Boca	MRS pH 5,4	MRS pH 5,4	S/A
112	Róbalo Tegumento	MRS	MRS	S/A
113	Pejerrey Intestino	MRS	MRS	S/A
114	Raya Branquias	MRS	MRS	S/A
115	Gallo Tegumento	MRS	MRS	S/A
116	Raya Boca	MRS	MRS	S/A
117	Pejerrey Intestinos	CPBA	Agar Bilis Esculina	S/A
118	Raya Intestino	MRS	MRS	S/A
119	Gallo Branquias	MRS	MRS	S/A

120	Pejerrey intestino	MRS	MRS	S/A
121	Pejerrey Intestino	MRS	MRS	S/A

* *Sin actividad antagonista contra L. innocua*; ****Las cepas resaltadas presentaron actividad antimicrobiana**; ***CPBA: Caldo púrpura de Bromocresol Azida

En la Figura I.8 se pueden observar los halos translúcidos generados por algunas de las cepas evaluadas; los mismos representan la inhibición del crecimiento de *L. innocua*.

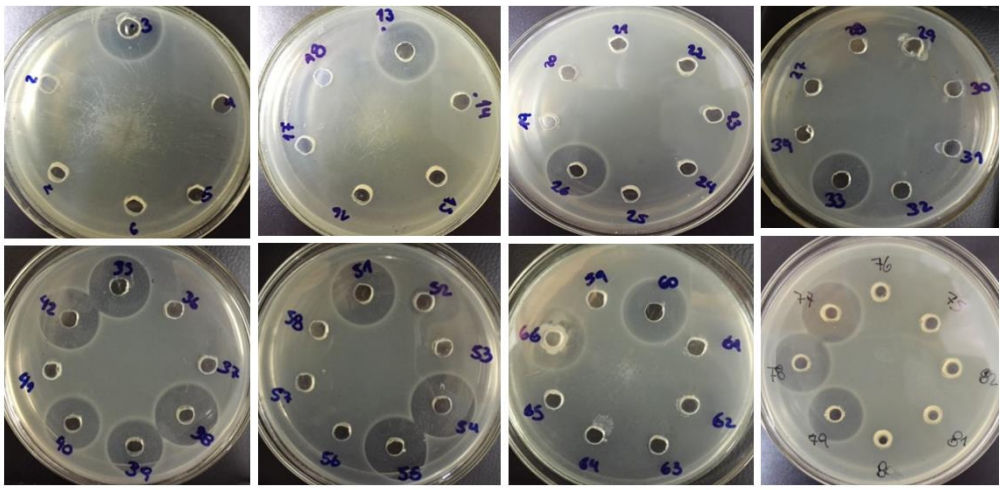


Figura I.8: Selección de cepas según su actividad en el TDA.

Todos los ensayos cuyos resultados se muestran a continuación, se realizaron sobre las 22 cepas que presentaron actividad antagonista.

En esta sección se seleccionaron 22 cepas con actividad antagonista contra L. innocua.

I.4.2 Identificación fenotípica y genotípica de las bacterias seleccionadas

Todas las cepas seleccionadas con actividad antagonista mostraron la presencia de las enzimas pirrolidonil aminopeptidasa (PYR) y leucina-aminopeptidasa (LAP), producción de pigmento amarillo y fermentación de manitol, arabinosa, y ribosa. Adicionalmente, las cepas mostraron crecimiento a 45 °C y a pH 9,60 e hidrolizaron la esculina en presencia de sales biliares. Según los resultados anteriores fue posible obtener la caracterización fenotípica, indicativa de que todas las cepas aisladas con actividad antagonista contra *L. innocua* pertenecen a la especie *Enterococcus mundtii*. Posteriormente, dicha información se

confirmó por la amplificación del ARN ribosomal 16s por medio de PCR. El genoma de las bacterias se incorporó a la base de datos GenBank de NCBI. Las cepas fueron registradas como "*Enterococcus mundtii* STw" seguido por el número de aislamiento (Tabla I.11; **https://www.ncbi.nlm.nih.gov/**).

Tabla I.11: Número de identificación de cepas en GenBank.

Cepa	N° GENBANK
E. mundtii STw3	MH588144
E. mundtii STw13	MH588145
E. mundtii STw26	MH588146
E. mundtii STw33	MH588147
E. mundtii STw35	MH727688
E. mundtii STw38	MH588148
E. mundtii STw39	MH727689
E. mundtii STw40	MH727690
E. mundtii STw42	MH727691
E. mundtii STw46	MH727692
E. mundtii STw47	MH588149
E. mundtii STw49	MH588150
E. mundtii STw51	MH588151
E. mundtii STw54	MH588152
E. mundtii STw55	MH727693
E. mundtii STw60	MH727694
E. mundtii STw66	MH588153
E. mundtii STw68	MH588154
E. mundtii STw70	MH588155
E. mundtii STw77	MH588156
E. mundtii STw78	MH727695
E. mundtii STw79	MH588157

Si bien todas las bacterias preseleccionadas son de la misma especie, existe evidencia exhaustiva sobre las diferencias que pueden encontrarse en la actividad antagonista de los enterococos y su desarrollo según la cepa en estudio (Rivas *et al.,* 2012). Las bacterias del género *Enterococcus* naturalmente tienen una alta prevalencia en alimentos y, en general, los presentes en los mismos no presentan resistencia a antibióticos (Rehaiem *et al.,* 2016).

Existe una gran variedad de investigaciones sobre la aplicación de *Enterococcus faecium* en alimentos tan variados como chacinados, productos cárnicos y lácteos, en las cuales se ha observado actividad antagonista contra microrganismos Gram positivos y negativos (Arbulu *et al.,* 2016; Khan *et al.,* 2010; Ogier y Serror, 2008 y Semedo *et al.*, 2003). En base a lo mencionado anteriormente, las bacterias aisladas en este trabajo podrían tener potencial para su aplicación como biopreservadores en productos de la pesca, por lo cual se avanzó en su caracterización.

Todas las bacterias seleccionadas fueron caracterizadas fenotípica y genotípicamente como E. mundtii.

I.4.3 Determinación de factores de virulencia

Dentro de la caracterización de las cepas, una de las evaluaciones de mayor relevancia es la de los factores de virulencia, ya que, de estar estos presentes, no sería posible su uso en alimentos.

En cuanto a la producción de gelatinasa, este es un factor de virulencia ampliamente distribuido en la especie, aunque principalmente se encuentre en enterococos de origen clínico (Eaton y Gasson, 2001). Ninguna de las cepas hidrolizó la gelatina ni presentó el gen gelE.

La producción de hemolisina es otro factor de virulencia presente en los enterococos, que contribuye a la severidad de los casos de enfermedades causadas por ellos (Semedo et al., 2003). Se pudo observar que, en agar sangre, ninguna de las bacterias mostró actividad hemolítica. Además, mediante técnicas de PCR, se comprobó la ausencia de los genes *CylLl y CylLs*, los cuales codifican para las subunidades estructurales de hemolisina.

En cuanto a la resistencia a la vancomicina, todas las cepas fueron susceptibles a una concentración menor a 4 µg/ml, y en el caso de la ampicilina, a una concentración menor a 8 µg/ml. La alta resistencia a estos antibióticos está asociada a la presencia del elemento de inserción IS16 (Werner *et al.,* 2011). Ninguna de las cepas estudiadas mostró amplicones en la amplificación del ARN con cebadores específicos para el fragmento del

genoma en el que se encuentra el elemento de inserción IS16. En base a estos resultados, ninguna de las cepas mostró resistencia a los antibióticos en cuestión, ni el gen relacionado con su posible expresión.

Finalmente, se amplificaron los genes que codifican para la proteína de agregación en enterococos, la cual está relacionada a la adherencia de las bacterias a células eucariotas y media la agregación de bacterias permitiendo su conjugación (Chajęcka-Wierzchowska *et al.,* 2017). La proteína de superficie de enterococos (esp) se encuentra involucrada en la formación de biofilms, la cual tiene una relevancia mayor en el intercambio de material genético entre células y en la adherencia (Semedo *et al.,* 2003). No se encontró amplificación para ninguno de los dos genes en las 22 cepas evaluadas. Los mismos resultados se obtuvieron al amplificar el gen Hyl, el cual está relacionado con la producción de hialuronidasa, una enzima que degrada el ácido hialurónico del tejido conectivo y facilita la invasión bacteriana (Lauková *et al.,* 2019).

La ausencia de todos los factores de virulencia evaluados, indica que el uso de las cepas en estudio para la biopreservación de alimentos resultaría seguro.

Ninguna de las cepas estudiadas presentó la expresión fenotípica de factores de virulencia ni los genes que codifican para su expresión.

I.4.4 Caracterización de la actividad antagonista

1.4.4.i Determinación de genes que codifican para la producción de bacteriocinas

En cuanto a la presencia de genes que codifican para la producción de bacteriocinas, ninguna de las cepas presentó los genes para las enterocinas A, B, P, L50B o Q, ni para las bacteriocinas 96, 31, 1071 A/B, HirJM 79. Sin embargo, todas las BAL seleccionadas presentaron los genes estructurales que codifican para la producción de mundticina KS. Además, 17 de las 22 cepas, presentaron el gen que codifica para la producción de la enterocina L50A (Tabla I.12). Ogaki, *et al.* (2016), evaluaron 138 cepas de enterococos y ninguna de ellas poseía el gen que codifica para la producción de la enterocina L50A, sin embargo, las cepas presentaron actividad antagonista. Dado que continuamente se están descubriendo nuevas bacteriocinas producidas por enterococos, la ausencia de una de ellas

en alguna de las cepas no es indicativo de una menor actividad antagonista ya que pueden producir alguna bacteriocina no evaluada, o aún no descubierta (Mahdi *et al.,* 2020; Qiao *et al.,* 2020; Sharma *et al.,* 2020). Es por esta razón que la presencia de la enterocina L50A no se utilizó como criterio de selección y se continuaron los ensayos de caracterización para las 22 cepas con actividad antagonista.

Tabla I.12: Presencia del gen que codifica para la enterocina L50A, en cepas con actividad antagonista y presencia del gen que codifica para la producción de mundticina KS

Cepa	Enterocina L50A
E. mundtii STw3	+
E. mundtii STw13	+
E. mundtii STw26	+
E. mundtii STw33	+
E. mundtii STw35	-
E. mundtii STw38	+
E. mundtii STw39	-
E. mundtii STw40	-
E. mundtii STw42	-
E. mundtii STw46	+
E. mundtii STw47	+
E. mundtii STw49	+
E. mundtii STw51	+
E. mundtii STw54	+
E. mundtii STw55	+
E. mundtii STw60	+
E. mundtii STw66	+
E. mundtii STw68	+
E. mundtii STw70	+
E. mundtii STw77	+
E. mundtii STw78	-
E. mundtii STw79	+

I.4.4.ii Producción de peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos y sensibilidad a enzimas

Con el objetivo de determinar si la actividad antagonista se debe a la producción de bacteriocinas por parte de cepas, se evaluó la presencia de peróxido de hidrógeno en el SLC y el efecto del pH ácido. Además, para comprobar si la actividad depende de un compuesto de origen peptídico, se analizó la estabilidad de la actividad antagonista del SLC luego de ser expuesto a la acción de diferentes proteasas mediante la TDA. Estos ensayos fueron necesarios ya que la presencia del gen que codifica para la producción de las bacteriocinas no implica que este se exprese y que efectivamente se produzcan en el SLC.

En cuanto a la producción de peróxido de hidrógeno, luego del tratamiento con catalasa se comprobó que los SLC tenían la misma actividad antagonista frente a *L. innocua*, indicando que la misma no se debe a la producción de peróxido de hidrógeno. En cuanto a la presencia de ácidos orgánicos, su principal efecto inhibitorio es el descenso de pH, por lo tanto, al alcalinizar el SLC se contrarresta su efecto. No se detectó una diferencia significativa en la actividad antagonista a pH 4,6 y 7,0. En base a estos resultados, es posible concluir que la actividad no se debe a la presencia de peróxido de hidrógeno o de ácidos orgánicos.

Al tratar los SLC con proteasas (tripsina, pronasa, bromelina y pepsina), los mismos perdieron parcial o completamente su actividad antagonista contra *L. innocua*, indicando la naturaleza peptídica de las sustancias antimicrobianas. No hubo pérdida de actividad al tratar los SLC con lisozima, la cual actúa en enlaces glicosídicos. Esto indica que los compuestos peptídicos presentes en los SLC no presentan un enlace glicosídico en su estructura.

En base a los resultados mencionados en esta sección, y la presencia de genes que codifican para la producción de bacteriocinas en el genoma de todas las cepas seleccionadas, es posible concluir que la actividad inhibitoria se debe a la producción de bacteriocinas.

I.4.4.iii Actividad de los sobrenadantes libes de células contra microorganismos indicadores

Con el objetivo de continuar la caracterización de la actividad de los SLC de las diferentes cepas y seleccionar una cepa para futuros ensayos, se evaluó la actividad antimicrobiana de los mismos a pH 6,0 sobre las siguientes bacterias de colección: *L. innocua* ATTC

33090, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. fluorescens* ATCC 49838, *S. putrefaciens* ATCC 8071 y *L. plantarum* ATCC 8014 por medio de la TDA.

Todos los SLC tuvieron actividad antagonista contra *L. innocua* y *L. plantarum*; el tamaño de los halos de inhibición obtenidos se encuentra en la Tabla I.13. En el caso de *L. innocua,* no se encontraron diferencias significativas entre los halos generados por los SLC evaluados. Por otro lado, sí se encontraron diferencias significativas en el tamaño de los halos de inhibición contra *L. plantarum.* Los SLC de las cepas STw3, STw40 y STw49 generaron los halos de menor tamaño, mientras la cepa STw66 presentó el halo de mayor tamaño, siendo este de 23 mm.

Ninguno de los SLC presentó actividad contra las bacterias Gram negativas, es decir contra *S. putrefaciens, P. aeruginosa y P. fluorescens*. Este resultado se encuentra en línea con la actividad reportada de otras bacteriocinas producidas por enterococos (Pinto *et al.,* 2009; Qiao *et al.,* 2020; Rivas *et al.,* 2012).

Tabla I.13: Tamaño de los halos de inhibición de las cepas contra L. innocua y L. plantarum por medio de la TDA.

	Tamaño del halo (mm)	
Cepa STw	*L. innocua*	*L. plantarum*
3	19 ± 1,0 ^{a}	17 ± 1,0 ^{b}
13	18 ± 1,0 ^{a}	19 ± 1,0 ^{ab}
26	20,5 ± 0,5 ^{a}	21 ± 1,0 ^{ab}
33	19,5 ± 1,5 ^{a}	20,5 ± 0,5 ^{ab}
35	19,5 ± 0,5 ^{a}	20,5 ± 0,5 ^{ab}
38	19 ± 1,0 ^{a}	20,5 ± 0,5 ^{ab}
39	18,5 ± 1,5 ^{a}	20 ± 1,0 ^{ab}
40	19 ± 1,0 ^{a}	18 ± 1,0 ^{b}
42	20 ± 1,0 ^{a}	19 ± 1,0 ^{ab}
46	19,5 ± 0,5 ^{a}	19,5 ± 0,5 ^{ab}
47	19 ± 1,0 ^{a}	21 ± 1,0 ^{ab}
49	20 ± 1,0 ^{a}	18 ± 1,0 ^{b}
51	19 ± 1,0 ^{a}	20 ± 1,0 ^{ab}
54	20,5 ± 0,5 ^{a}	19,5 ± 0,5 ^{ab}
55	21 ± 1,0 ^{a}	19 ± 1,0 ^{ab}
60	21 ± 1,0 ^{a}	20 ± 1,0 ^{ab}
66	21 ± 1,0 ^{a}	23 ± 1,0 ^{a}
68	21 ± 1,0 ^{a}	21,5 ± 0,5 ^{ab}
70	20 ± 1,0 ^{a}	20,3 ± 0,5 ^{ab}
77	20,5 ± 1,5 ^{a}	20,5 ± 0,5 ^{ab}
78	21 ± 1,0 ^{a}	18,5 ± 0,5 ^{ab}
79	22,5 ± 0,5 ^{a}	18,5 ± 0,5 ^{ab}

I.4.4.iv Selección de cepas con mayor actividad antagonista: Cuantificación de actividad inhibitoria contra *L. innocua* y *L. plantarum*

Para continuar con la caracterización de la actividad de los SLC y seleccionar una cepa para futuras aplicaciones, se determinó el título de los 22 SLC previamente seleccionados contra *L. innocua* y *L. plantarum* por medio de la TDA, ajustando su pH a un valor de 6,0. Todos los SLC mostraron un título mayor o igual a 16^{-1} sobre ambas bacterias indicadoras y el título máximo obtenido fue de 256^{-1} (Tabla I.14). El tamaño del halo disminuyó a medida que los SLC se diluyeron hasta llegar a 10 mm de diámetro. La dilución correspondiente a este tamaño de halo se consideró como el título (Figura I.9). En la variabilidad de los valores de los títulos, es posible observar la diferencia de la actividad antagonista del SLC de cepas pertenecientes a la misma especie. Arbulu *et al.* (2016) halló una diferencia en el tamaño de los halos de inhibición generados por el SLC de varias cepas de *E. faecalis* sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Adicionalmente, Marguet *et al.* (2011) obtuvieron un valor de 1600^{-1} al evaluar el título de *E. mundtii* contra *L. innocua,* mientras que Campos *et al.* (2006) obtuvieron títulos de *E. mundtii* contra *L. monocytogenes* entre 5^{-1} y 15^{-1}. Estos resultados indican la amplia variabilidad que existe en la actividad antagonista de esta especie, tal como se ha detectado en el presente trabajo.

Tabla I.14: Título de inhibición de las 22 BAL seleccionadas sobre L. innocua y L. plantarum

E. mundtii STw	*L. innocua* ATTC 33090	*L. plantarum* ATTC 8014
3	32^{-1}	32^{-1}
13	32^{-1}	64^{-1}
26	**128^{-1}**	**64^{-1}**
33	32^{-1}	128^{-1}
35	64^{-1}	128^{-1}
38	**256^{-1}**	**256^{-1}**
39	32^{-1}	64^{-1}
40	32^{-1}	16^{-1}
42	16^{-1}	16^{-1}
46	**128^{-1}**	**128^{-1}**
47	16^{-1}	64^{-1}
49	32^{-1}	64^{-1}
51	64^{-1}	32^{-1}
54	64^{-1}	64^{-1}
55	32^{-1}	32^{-1}
60	**128^{-1}**	**128^{-1}**
66	**128^{-1}**	**128^{-1}**
68	64^{-1}	64^{-1}
70	64^{-1}	64^{-1}
77	32^{-1}	128^{-1}
78	16^{-1}	32^{-1}
79	**128^{-1}**	**64^{-1}**

*Las cepas **destacadas** mostraron un mayor título contra L. innocua y se seleccionaron para continuar con los ensayos.*

Las BAL que mostraron mayor actividad contra *L. innocua* fueron las cepas STw 26, 38, 46, 60, 66 y 79. Este dato se priorizó debido a que es de mayor relevancia la actividad contra un patógeno subrogante que contra una cepa deteriorativa. De cualquier manera, todas las cepas presentaron una buena actividad contra *L. plantarum.* Entre las cepas seleccionadas es posible destacar la cepa STw38 que presentó un orden mayor a las otras contra los dos microorganismos indicadores. Esto sugiere que la concentración del SLC de STw38 necesaria para inhibir el crecimiento de las bacterias indicadoras es un 50 % menor con respecto al resto de las cepas. Si bien esta diferencia es significativa, para asegurar una adecuada selección del SLC y BAL con mayor actividad, se decidió realizar pruebas específicas con las 6 BAL preseleccionadas, orientadas a cada posible aplicación en productos de la pesca.

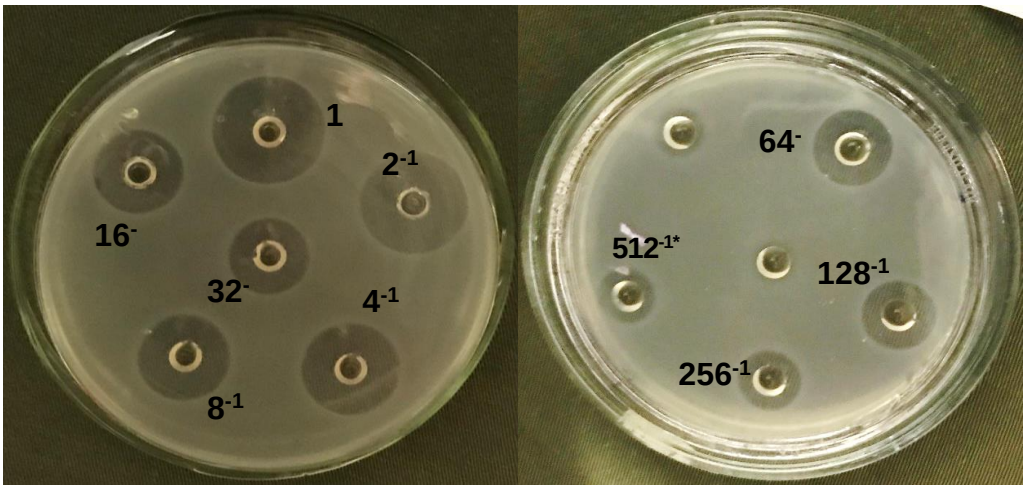


*Figura I.9: Halos de inhibición de L. innocua en el ensayo del título del SLC de E. mundtii STw38. *el tamaño del halo en la dilución de 512^{-1}, no se consideró debido a que su tamaño resultó menor a 10 mm.*

Se comprobó la presencia del gen que codifica para la producción de mundticina KS en todas las cepas, y del gen que codifica para la producción de la enterocina L50A en 17 de ellas.
La actividad antagonista no se debió a la presencia de ácidos orgánicos o peróxido de hidrógeno y se encontró que existe una pérdida de la misma debido a la acción de proteasas, lo cual indica la presencia de bacteriocinas en los SLC. Adicionalmente, se detectó que los SLC ajustados a pH 6,0 ejercieron actividad antagonista sobre L. innocua y L. plantarum, pero no sobre las bacterias Gram negativas evaluadas. Debido a que presentaron títulos mayores contra dichas bacterias, se seleccionaron las cepas STw26, 66, 38, 46, 60 y 79.

I.4.5 Condiciones óptimas de producción del sobrenadante libre de células

Para conocer la mejor forma de producir el SLC, se optimizó la cantidad de repiques necesarios de las cepas, la temperatura de incubación, el tiempo de incubación y el orden del tratamiento térmico y la alcalinización realizada para las 6 cepas seleccionadas.

En primera instancia se evaluó la cantidad de repiques necesarios para obtener un máximo de actividad luego de 18 horas de incubación a 30 °C (Schelegueda *et al.*, 2015). Fue posible observar que la actividad antagonista de los SLC luego de uno, dos o tres repiques

no cambió significativamente. Entonces, se decidió seguir utilizando dos repiques con la finalidad de asegurar la viabilidad de la cepa.

En cuanto a la temperatura de incubación, a 25 °C y 30 °C no existieron diferencias significativas en el tamaño del halo de inhibición contra *L. innocua*. Se decidió incubar todos los enterococos a 30 °C para poder homogenizar la temperatura de incubación de todas las cepas utilizadas a lo largo de la tesis.

Para optimizar el tiempo de incubación, resultó de interés evaluar también el pH de los SLC y la turbidez de los sistemas, junto con la actividad antagonista (tamaño del halo), luego de 15, 20, 39, 48, 63 y 72 horas. Los 6 SLC tuvieron el mismo comportamiento. A modo de ejemplo la Figura I.10 muestra la turbidez y el tamaño de los halos de inhibición obtenidos de la cepa STw38. Los grados McFarland y el diámetro del halo de inhibición correspondiente a *L. innocua* aumentaron desde las 10 hasta las 20 horas de incubación de manera exponencial. En cuanto al tamaño del halo, hasta las 15 horas no hubo producción de compuestos con actividad inhibitoria. A partir de las 20 horas, se evidenciaron halos en la TDA y su tamaño se mantuvo constante hasta las 72 horas de incubación. A las 20 horas, cuando se comenzó a observar la producción de las bacteriocinas, las cepas se encontraban en la etapa exponencial tardía de crecimiento, lo cual se encuentra en líneas con lo evaluado por Yi *et al.* (2016). Por otra parte, se observó que la estabilidad de los compuestos no se vio comprometida debido a la actividad de las proteasas que pudieran estar presentes en el SLC por al menos, 72 horas.

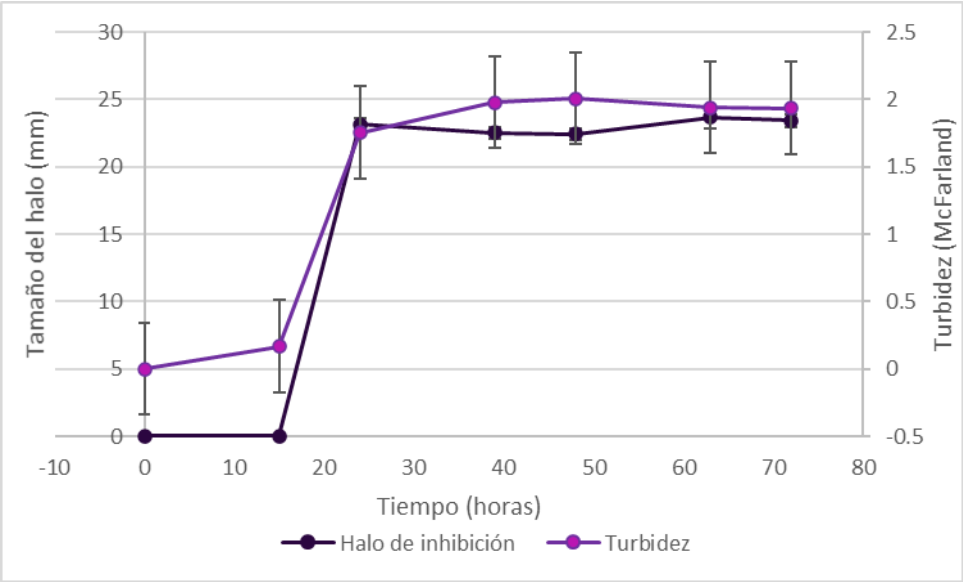


Figura I.10: Turbidez y halo de inhibición para L. innocua del SLC de la cepa STw38 en función del tiempo de incubación.

Respecto al pH, este decreció más velozmente las primeras 12 horas de incubación, ya que esta es la etapa de crecimiento exponencial de los enterococos, en la cual generan ácido láctico y otros ácidos como consecuencia de su metabolismo primario para generar energía (Franz *et al.,* 2001). El mínimo pH obtenido fue de 4,60, el cual se mantuvo constante luego de las 12 horas de incubación.

Finalmente, en vista de estos resultados, el tiempo de incubación de las cepas para la producción del SLC se estandarizó en 24 horas, ya que este tiempo se encuentra dentro del rango en el que la actividad del SLC es máxima.

Existe información extensiva sobre la pérdida de estabilidad de las bacteriocinas a pH alcalinos o cercanos a la neutralidad (Campos *et al.,* 2006; Leite *et al.,* 2016). Es por esta razón que fue necesario evaluar la actividad antagonista remanente del SLC al realizar el tratamiento térmico para inactivar proteasas después de alcalinizarlo. De esta manera, se podría evitar el tiempo de espera luego del calentamiento para ajustar el pH cuando fuera necesario. Se analizó la estabilidad de la bacteriocina al tratamiento térmico a un pH de 6,0. El resultado fue un tamaño de halo constante, independiente del orden del tratamiento térmico y la alcalinización. Por esta razón, se optó por realizar primero la alcalinización y luego el tratamiento térmico.

Las condiciones de producción del SLC óptimas fueron:

- *Realizar 2 repiques de las cepas*
- *Incubar a 30 °C durante 24 horas*
- *Primero realizar la alcalinización del SLC y luego el tratamiento térmico*

I.4.6 Interacción entre los sobrenadantes libres de células de las cepas seleccionadas

Luego de haber seleccionado las 6 cepas con mayor actividad antagonista y optimizar las condiciones de producción del SLC, se determinó el tipo de interacción existente entre mezclas binarias de los SLC seleccionados empleando *L. innocua* como bacteria indicadora. La evaluación de dicha interacción se realizó en medio líquido, siguiendo el modelo de Berembaum (Berembaum, 1978) (Sección I.3.6).

El primer paso fue evaluar el título en medio líquido. Para las 6 cepas seleccionadas éste fue de 256^{-1}, valor ligeramente diferente al evaluado por medio de la TDA. Esto se debe a que el título puede variar según la técnica con la cual se lo evalúe (Balouiri *et al.,* 2016). Por ejemplo, Aspri *et al.* (2017), obtuvieron halos de inhibición en la TDA al ensayar un extracto semipurificado del SLC de *E. faecium* DM224, pero al ensayar este extracto en medio líquido el mismo no lograba inhibir el desarrollo de las bacterias indicadoras por 24 horas; es decir que el título obtenido por la TDA no fue el mismo que en medio líquido. El título de las cepas obtenido en medio líquido fue el utilizado para determinar las concentraciones subinhibitorias incluidas en el diseño de Berembaum.

Se evaluaron un total de 15 mezclas binarias. En todos los casos se observó un efecto aditivo. Estos resultados indicaron que la combinación de dos SLC no proporcionaría una mejora en la actividad antimicrobiana contra *L. innocua*. El efecto aditivo observado podría explicarse por el hecho de que, el mecanismo de acción de las dos bacteriocinas presentes en los SLC (mundticina KS y enterocina L50A) es la formación de poros en la membrana celular. Por lo tanto, al no haber otro factor que aumente la sensibilidad de las células blanco, no se observa un efecto sinérgico. La mundticina KS pertenece a la clase IIa de bacteriocinas y la enterocina L50A a la clase IIc, grupos entre los cuales no hay evidencia de su acción sinérgica en conjunto hasta el momento (Alvarez-Sieiro *et al.,* 2016; Kawamoto *et al.,* 2002). Otros estudios han reportado que las bacteriocinas producidas por enterococos pueden presentar actividad sinérgica con las bacteriocinas producidas por otras BAL. Por ejemplo, Nissen-Meyer, *et al.* (2010) detectaron un incremento en la actividad de la enterocina 1071 al utilizarla en conjunto con péptidos complementarios G producidos por Lactococos. Cabe destacar que, como ya se mencionó anteriormente, al descubrirse nuevas bacteriocinas producidas por enterococos muy frecuentemente, una actividad sinérgica podría haber indicado la presencia de otras bacteriocinas adicionales a las detectadas por PCR.

Teniendo en cuenta la similitud de la actividad antagonista de las cepas de *E. mundtii,* se continuó el proceso de selección, pero direccionado a aplicaciones específicas de las

cepas. En primera instancia se evaluó la aptitud de las cepas para ser utilizadas como cultivo protector y en segunda instancia (en el capítulo siguiente) se realizaron más evaluaciones para identificar una cepa con mayor actividad antagonista, purificar su SLC y utilizarlo como ingrediente en la preservación de pescado.

Al evaluar la interacción existente entre mezclas binarias de los SLC en estudio, se observó un comportamiento de carácter aditivo.

I.4.7 Selección de bacterias ácido lácticas para utilizar como cultivo protector en condiciones de refrigeración

Para evaluar la aplicación de las BAL seleccionadas como cultivo protector en productos de la pesca en condiciones de refrigeración, fue necesario evaluar su capacidad para crecer y producir bacteriocinas a 4 °C. Luego de incubar las cepas a 30 °C, se incubaron a 15 °C y por último a 4 °C. Para estudiar el crecimiento de las cepas, se midió la absorbancia de los sistemas a 600 nm a las tres temperaturas, a intervalos regulares de tiempo, y se construyeron curvas de crecimiento.

Todas las cepas mostraron un crecimiento similar entre ellas al ser incubadas a 30 °C y también a 15 °C. Debido a que el objetivo no era conocer el crecimiento a estas temperaturas, únicamente se modelaron las curvas de la cepa STw38, a modo de ejemplo, aplicando la ecuación de Gompertz (Sección I.3.7, *Ecuación I.2*). Para determinar las diferencias entre las curvas de crecimiento de las cepas se evaluaron los siguientes parámetros: λ (tiempo de etapa lag), μ (velocidad de crecimiento) y A (valor asintótico). Los valores de R^2adj (coeficiente de determinación ajustado) se encontraron entre 0,98 y 0,99 y se obtuvieron valores de RMSE (error cuadrático medio) menores a 0,030, lo cual indica un buen ajuste de todas las curvas experimentales a las curvas modeladas. Los resultados del crecimiento de la cepa STw38 se pueden observar comparativamente a las 3 temperaturas en la Figura I.11 y el modelado de los parámetros en la Tabla I.15.

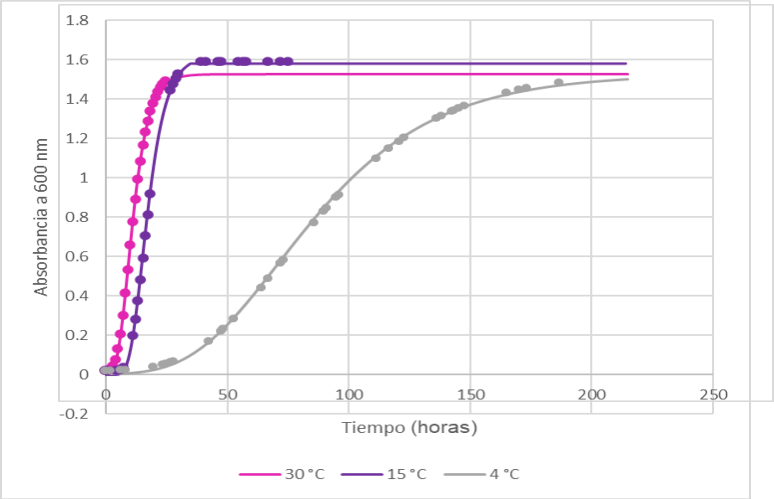


Figura I.11: Crecimiento de E. mundtii STw38 a 30 °C, 15 °C y 4 °C. Datos experimentales (puntos), modelado por medio de la ecuación de Gompertz (línea sólida).

En cuanto al parámetro A, los valores asintóticos no presentaron diferencias significativas a diferentes temperaturas. Los resultados mostraron que, a 30 °C, la cepa STw38 tuvo una etapa de crecimiento exponencial que comenzó luego de las 4 horas de incubación y se prolongó hasta las 12 horas, donde comenzó la etapa estacionaria (Figura I.11). A 15 °C la etapa lag se prolongó por 10 horas más que a 30 °C y la pendiente de la etapa exponencial fue menor, denotando un crecimiento más lento de las bacterias. La etapa exponencial duró aproximadamente el doble que a 30 °C, ya que duró 15 horas. Finalmente, a 4 °C, también se observó una extensión del tiempo de las fases lag y exponenciales siendo éstas de 50 y 100 horas respectivamente. Los resultados mostraron que al disminuir la temperatura la cepa STw38 obtuvo valores de fase lag (λ) mayores y velocidades de crecimiento (μ) menores.

Tabla I.15: Parámetros del modelo de Gompertz para crecimiento a 30 °C, 15 °C y 4 °C para la E. mundtii STw38.

Parámetro/ Temperatura	30°C	15°C	4°C
A*	1,562 ± 0,014 [a]	1,624 ± 0,038 [a]	1,665 ± 0,067 [a]
μ	0,335 ± 0,014 [a]	0,217 ± 0,029 [b]	0,027 ± 0,001 [c]
λ	4,857 ± 0,141 [a]	16,898 ± 0,958 [b]	27,221 ± 3,508 [c]

**Los valores de A están expresados en absorbancia a 600 nm, los de μ en absorbancia por hora y λ en horas. Las letras indican diferencias significativas dentro de un mismo parámetro a diferentes temperaturas.*

En cuanto al modelado de las curvas de crecimiento de las 6 cepas a 4 °C, no se encontraron diferencias significativas entre los parámetros, lo cual indica que todas presentan igual aptitud para desarrollarse en condiciones de refrigeración (Tabla I.16).

Tabla I.16: Parámetros del modelo de Gompertz para crecimiento a 4 °C de las cepas seleccionadas.

Parámetro / Cepa STw	60	38	46	26	66	79
A	1,501 ± 0,048[a]	1,509 ± 0,054[a]	1,521 ± 0,023[a]	1,529 ± 0,029[a]	1,537 ± 0,027[a]	1,498 ± 0,047[a]
μ	0,042 ± 0,005[a]	0,043 ± 0,002[a]	0,047 ± 0,002[a]	0,049 ± 0,003[a]	0,048 ± 0,003[a]	0,041 ± 0,003[a]
λ	35,5 ± 4,9[a]	37,4 ± 1,4[a]	36,3 ± 1,0[a]	33,1 ± 2,4[a]	33,2 ± 2,4[a]	40,0 ± 2,2[a]

Para determinar qué cepa resultaría más apta para utilizar como cultivo protector, se produjeron los SLC de las BAL luego de 144 horas (6 días) de incubación a 4 °C, tiempo que coincide con la etapa estacionaria temprana del crecimiento. Según se analizó al optimizar la producción del SLC, en esta etapa, la producción de bacteriocinas llega a un pico (sección I.4.5). Luego, se determinó su título empleando *L. innocua* y *L. plantarum* mediante la TDA. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla I.17.

Tabla I.17: Título de los SLC producidos a 4 °C para L. innocua y L. plantarum

Cepa/ bacteria indicadora	*L. innocua*	*L. plantarum*
STw26	256^{-1}	16^{-1}
STw38	512^{-1}	32^{-1}
STw46	128^{-1}	16^{-1}
STw60	128^{-1}	64^{-1}
STw66	128^{-1}	16^{-1}
STw79	128^{-1}	8^{-1}

Los títulos de los SLC para *L. innocua* se encontraron entre 128^{-1} y 512^{-1} y para *L. plantarum* entre 8^{-1} y 64^{-1}, siendo la cepa STw38 la que mostró un mayor título frente a *L. innocua.* También se observó que, si bien el título de la actividad frente a *L. innocua* se mantuvo cercano al obtenido en la producción del SLC a 30 °C, la actividad frente a *L. plantarum* decreció en muchos casos notablemente y en otros fue algo superior (Ver Tabla I. 14). Estos resultados están relacionados con la exposición de la bacteria a una situación de estrés, lo cual genera un cambio en su metabolismo para mantener la homeostasis (Castro

et al., 2011). Uno de los ajustes realizado en el metabolismo bacteriano pudo haber sido una modificación en la producción de la bacteriocina que tenga mayor actividad antagonista contra *L. plantarum*.

En base a los resultados expuestos, se seleccionó *E. mundtii* STw38 para ser aplicada en la biopreservación de pasta de merluza. Esta cepa, si bien presentó el segundo título más alto contra *L. plantarum,* mostró el mayor título contra el *L. innocua*. Dado que ésta se utilizó como un subrogante de patógeno, se consideró prioritaria esta actividad.

Resulta de interés resaltar que en numerosos estudios se ha evaluado la capacidad de diferentes BAL para producir bacteriocinas directamente en matrices alimentarias (Aspri *et al.,* 2017; Lianou *et al.,* 2017; Coelho *et al.,* 2014), sin embargo, la producción de bacteriocinas en condiciones poco favorables, como la refrigeración, por lo general, no se evalúa antes de los análisis *in situ*. El desarrollo de tales evaluaciones es de gran importancia ya que, en general, se pierde la actividad antagonista del cultivo protector al aplicarlo en condiciones adversas (Hartmann *et al.,* 2011). Al pasar directamente de un ensayo *in vitro* en condiciones óptimas a un ensayo *in vivo* en condiciones adversas, como puede ser la refrigeración, los cambios se pueden deber tanto al cambio de temperatura como al cambio de matriz. Al conocer el comportamiento de las cepas a 4 °C, es posible comprender qué cambio provoca el uso de otra matriz en el cultivo. En este sentido Wiernasz *et al.* (2017), evaluaron la capacidad de 32 BAL para desarrollarse en jugo de salmón y de bacalao en presencia de diferentes bacterias indicadoras a su temperatura óptima. Esta evaluación permitió conocer el posible desarrollo de diferentes BAL en salmón y bacalao, antes de realizar ensayos más costosos en piezas enteras de pescado y adicionando otras condiciones adversas.

En esta sección fue posible analizar la capacidad de las cepas para desarrollarse y producir bacteriocinas en condiciones de refrigeración y se seleccionó la cepa STw38 para utilizar como cultivo protector para preservar pasta de merluza.

Todas las cepas seleccionadas crecieron y produjeron bacteriocinas a 4 °C, pero E. mundtii STw38 fue la que obtuvo el mayor título frente a L. innocua y fue seleccionada para aplicar en pasta de merluza.

I.4.8 Aplicación de *E. mundtii* STw38 para la preservación de pasta de merluza

Se evaluó la capacidad de la bacteria *E. mundtii* STw38 para actuar como cultivo protector en una pasta de merluza que emula una hamburguesa almacenada al vacío o en aire y refrigerada a 4 °C. Los recuentos microbiológicos ensayados fueron el recuento de *Enterococcus* spp., *Listeria innocua* y el recuento de bacterias aerobias mesófilas totales.

En cuanto al recuento de enterococos en los sistemas envasados en aire, éste se mantuvo constante durante todo el almacenamiento. En los sistemas envasados en vacío, se observó una disminución de su población en los primeros tres días de almacenamiento, y luego ésta aumentó llegando al nivel inoculado al final del almacenamiento (10^6 UFC/g) (Figura I.12).

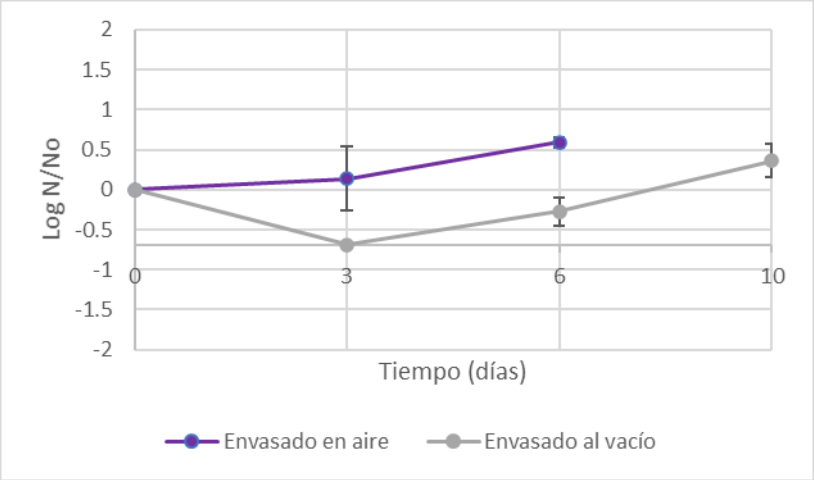


Figura I.12: Recuentos de E. mundtii STw38 en los sistemas envasados al vacío y en aire.

Respecto a la población de *L. innocua*, en los sistemas envasados en aire, la inoculación con el cultivo protector promovió una disminución en el crecimiento durante los primeros tres días, observándose una diferencia de 1 ciclo logaritmo con respecto al control (Figura I.13). Entre el tercer y el sexto día, la población de ambos sistemas disminuyó hasta valores cercanos al nivel inoculado. En el caso de los sistemas envasados al vacío, el recuento disminuyó al comienzo del almacenamiento, y luego aumentó 1 ciclo logarítmico con respecto al nivel inoculado (mostrando un comportamiento similar al de los enterococos envasados al vacío). Cabe destacar que la disminución en los recuentos de *L. innocua* en el sistema adicionado con la cepa bacteriocinogénica envasado en aire, puede estar relacionado con el mejor desarrollo de *E. mundtii* STw38 en estas condiciones. De esta forma, la cepa competiría con la flora nativa y, podría , producir compuestos con acción antagonista frente a *L. innocua.*

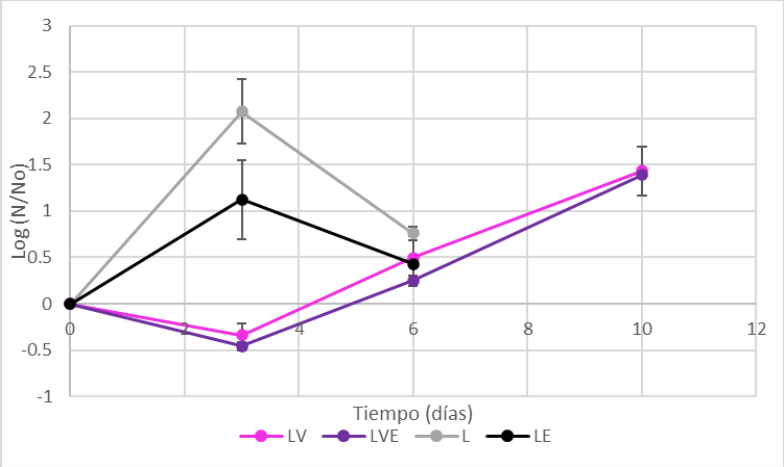


Figura I.13: Recuentos de L. innocua en sistemas envasados en aire y al vacío.

Estos resultados coinciden parcialmente, con los reportados por Aymerich, *et al.* (2019), que evaluaron la capacidad de la cepa *Carnobacterium maltaromaticum* para controlar el desarrollo de *L. monocytogenes* en filetes de salmón con diferente composición (lípidos, humedad, fenoles, y ácido acético). En ese caso, la cepa bacteriocinogénica logró controlar la población en algunos filetes, por lo cual, su capacidad para inhibir el desarrollo de *Listeria spp.* depende de la matriz en la cual se aplica, de la BAL aplicada y de las condiciones de almacenamiento.

El recuento de bacterias totales en los sistemas envasados al vacío siguió la misma tendencia que los enterococos y *L. innocua*. Esta se relaciona con el tiempo requerido por los microorganismos para adaptarse a las nuevas condiciones de almacenamiento. En un estudio previo, Ananou *et al.* (2014), al almacenar sardinas enteras al vacío, observaron el mismo comportamiento al comienzo del almacenamiento en los recuentos de bacterias mesófilas, así también como en los de psicrófilas y de *Staphylococcus* spp.

En cuanto al recuento de las bacterias mesófilas totales es importante destacar que los especímenes utilizados inicialmente presentaban una población de 10^2 UFC/g, lo cual indica una buena calidad de la materia prima utilizada. En los sistemas envasados en aire, tanto a los 3 como a los 6 días, se observó una disminución de 3 ciclos logarítmicos en el sistema LE en comparación al sistema L (Figura I.14, panel a). En el sistema control, al tercer día los recuentos aumentaron 3 ciclos logarítmicos y en el último día de almacenamiento llegaron a un recuento total de 10^8 UFC/g. Estos resultados demuestran que la aplicación *E. mundtii* STw38 puede reducir el crecimiento de la flora nativa del pescado por 6 días al ser envasada en aire. Resultados similares se observaron en la aplicación de *E. faecium* como cultivo protector en filetes de merluza en refrigeración,

logrando una disminución de 1 ciclo logarítmico en la población de las bacterias mesófilas totales (Gómez-Sala *et al.,* 2016).

En cuanto a los sistemas envasados al vacío, la población de bacterias aerobias mesófilas en las muestras control aumentó 1 ciclo logarítmico durante los primeros 3 días de almacenamiento, mientras que en el sistema inoculado con la cepa STw38, disminuyó levemente. Posteriormente, la población creció hasta llegar al recuento máximo en el sexto día de almacenamiento y luego manteniéndose constante en los dos sistemas. En el sistema VL, en 10 días los recuentos aumentaron 4 ciclos logarítmicos, mientras que, en el sistema VE su recuento apenas aumentó 1,5 ciclos (Figura I.14, panel b). Debido a esta diferencia en los recuentos, es posible concluir que la cepa *E. mundtii* STw38 fue capaz de disminuir el desarrollo de la flora nativa del pescado en sistemas almacenados al vacío.

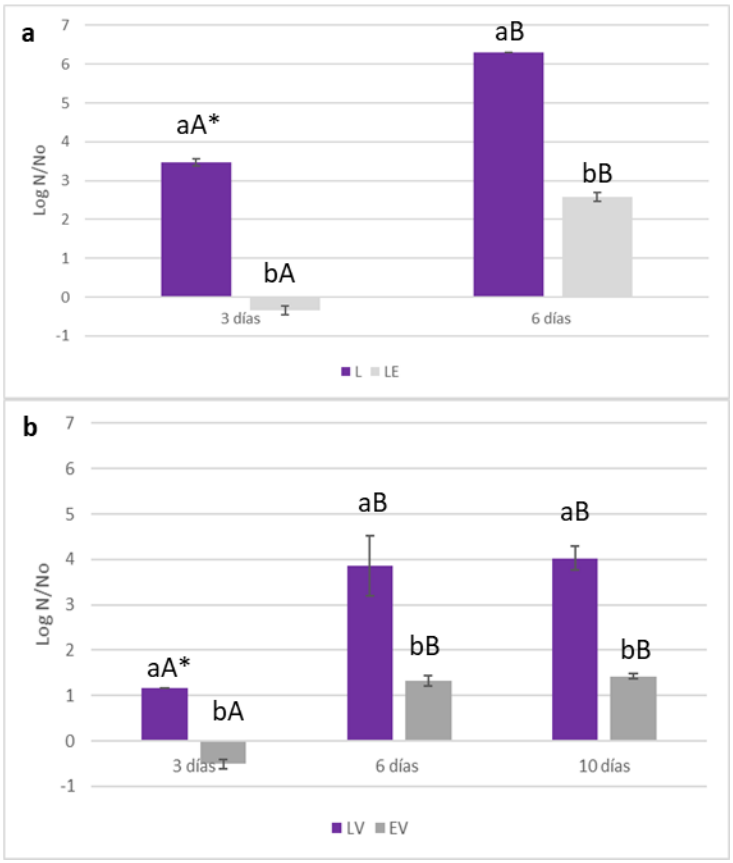


*Figura I.14: Recuentos de bacterias aerobias mesófilas en filetes de merluza bajo refrigeración. Panel a: envasados en aire Panel b: Envasados al vacío. (E, y EV: inoculados con STw38; L, y LV: sistemas control). *Las letras en minúscula representan las diferencias entre sistemas a un mismo tiempo, y en mayúsculas las diferencias en el tiempo dentro de un mismo sistema.*

Estos resultados se encuentran en línea con los obtenidos por Boulares *et al.* (2017), quienes aplicaron *Carnobacterium piscicola* y *Lactococcus lactis* a especímenes de lubina envasados al vacío y encontraron una disminución del desarrollo de las bacterias mesófilas totales al cabo de 21 días. En otra investigación Gómez-Sala *et al.* (2016), aplicaron *L. curvatus* como cultivo protector en especímenes de mero y merluza bajo refrigeración, y encontraron una reducción de la población de bacterias aerobias mesófilas de 0,7 y de 0,3 ciclos logarítmicos luego de 7 días y de 14 días de almacenamiento, respectivamente..

Resulta de interés destacar que, aunque el recuento final de los sistemas LE y EV resultara superior al permitido para pescado fresco por el Código Alimentario Argentino, no existe una población bacteriana máxima para pescado fermentado, adicionado con un cultivo protector o una cepa probiótica. Daramola *et al.* (2020), informaron recuentos totales de 10^8 UFC/g en filetes de bacalao salados y fermentados y concluyeron que independientemente del alto

recuento, la biopreservación era adecuada ya que fue posible inhibir el crecimiento de bacterias deteriorativas y extender la vida útil del pescado.

En cuanto a la evaluación de producción de bacteriocinas en la pasta de merluza por medio de la TDA modificada, se observó que luego de un tratamiento térmico de 30 segundos se inactivaban adecuadamente las bacterias, por lo cual se utilizó este tiempo. Antes del tratamiento térmico las porciones de pasta de merluza presentaban actividad contra *L. innocua*, pero luego del tratamiento térmico la actividad se perdió. Estos resultados únicamente comprueban la supervivencia de la población de enterococos y su capacidad de producir bacteriocinas luego del almacenamiento, sobre el agar, incluso en presencia de la flora nativa del pescado. La falta de la actividad luego del tratamiento térmico puede deberse a la pérdida de viabilidad de los enterococos presentes en la muestra ya que no se observó su desarrollo en el agar. Este efecto era deseado, pero al no haberse detectado ninguna inhibición en el desarrollo de *L. innocua*, también es posible que el tratamiento térmico haya inactivado las bacteriocinas, o que la producción *in situ* no haya sido suficiente para inhibir el desarrollo de *L. innocua.* Esta segunda posibilidad es coincidente con los resultados obtenidos en los recuentos de *L. innocua* en ambas condiciones de almacenamiento, ya que su crecimiento no fue controlado adecuadamente. La búsqueda de BAL con la capacidad de producir bacteriocinas en matrices de alimentos complejos presenta un gran desafío ya que tanto la flora nativa presente en el alimento como la matriz en sí pueden afectar su producción (Aspri *et al.,* 2017; Lianou *et al.,* 2017).

En conclusión, el uso de enterococos como cultivo protector en pasta de merluza resulta adecuado para controlar el desarrollo de bacterias mesófilas y su acción mejora al combinarlo con el almacenamiento al vacío. En base a lo expuesto, resultó de interés evaluar la posibilidad de utilizar la cepa seleccionada en conjunto con otro antimicrobiano natural para prolongar la vida útil de productos de la pesca (Capítulo III).

La aplicación de STw38 resultó satisfactoria para disminuir el desarrollo de bacterias mesófilas por 6 y 10 días en pasta de merluza envasada en aire y al vacío. No fue posible controlar el crecimiento de L. innocua. Con el objetivo de aumentar el efecto preservador observado, se decidió evaluar el uso de la cepa STw38 como cultivo protector en combinación con otros antimicrobianos naturales (Capítulo III).

I.5 Conclusiones

En esta sección fue posible seleccionar 22 BAL bacteriocinogénicas, libres de factores de virulencia a partir de 121 BAL aisladas de la costa patagónica argentina. Todas presentaron actividad contra *L. innocua* y *L. plantarum.* Si bien su actividad antagonista resultó similar, 6 cepas presentaron una mayor actividad antagonista, de las cuales STw38 fue seleccionada para aplicar como cultivo protector, debida a su mejor capacidad para inhibir el crecimiento de *L. innocua* y *L. plantarum* por medio de su SLC producido a 4 °C.

En cuanto a la aplicación del cultivo protector, fue capaz de controlar la flora nativa de pescado por 6 días en envasado en aire y 10 días en envasado al vacío.

Finalmente, es posible concluir que en este capítulo se obtuvieron cepas bacteriocinogénicas, de aplicación segura para la preservación de alimentos y con el potencial de ser aplicadas en pescado para mejorar su vida útil.

Capítulo II

Semipurificación de bacteriocinas para su aplicación en piezas de salmón

II.1 Introducción

II.1.1 Purificación de bacteriocinas: ventajas y desventajas

Existen diferentes formas de biopreservación de alimentos por medio de BAL. Una opción es su empleo como cultivos protectores (ya tratado en el capítulo anterior), otra es la aplicación del SLC conteniendo los metabolitos producidos por las bacterias, o bien de las bacteriocinas purificadas o semipurificadas. Al aplicar productos purificados, el impacto sobre las propiedades sensoriales será menor que empleando un cultivo protector. Las bacteriocinas poseen la ventaja de ser estables en un amplio rango de pH, resistentes a altas temperaturas e hidrolizables por proteasas digestivas, tales como la pancreatina, y la tripsina, por lo cual su aplicación no impactaría en la microflora intestinal (Silva *et al.,* 2018).

Cabe destacar que la principal investigación en bacteriocinas no es en alimentos, sino en áreas relacionadas a la salud, tales como usos veterinarios, para prevención de infecciones y cáncer, cuidado oral y de la piel, por lo cual estos péptidos con actividad antimicrobiana presentan una perspectiva muy amplia de potenciales aplicaciones, (López-Cuellar *et al.,* 2016). Al aplicarlas en los alimentos sin presencia de las BAL productoras, la competencia de las BAL con la flora nativa del producto no contribuirá como factor adicional de barrera, ni se podrá manifestar un potencial efecto probiótico en la flora intestinal. Adicionalmente, al ser las bacteriocinas susceptibles a proteasas endógenas presentes en los alimentos, pueden perder estabilidad durante el almacenamiento (Balciunas *et al.,* 2013).

La aplicación tanto del SLC como de bacteriocinas purificadas o semipurificadas en alimentos han sido ampliamente evaluada en numerosos trabajos de investigación. Sin embargo, hoy en día solamente se comercializan a nivel industrial la Nisina (bacteriocina producida por *L. lactis* lactis) y la Pediocina PA-1 (producida por *Pediococcus.* spp), en su forma semipurificada (Global Food Safety Auditing, 2013; Campos *et al.,* 2022). Estas bacteriocinas poseen actividad, principalmente contra bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas y han sido aplicadas efectivamente como un factor de estrés adicional en la preservación de una gran cantidad de alimentos. Es posible que la existencia a nivel comercial de tan pocos productos se deba a las dificultades para lograr la aprobación por parte de los organismos de control, la cual requiere la presentación de un informe detallado sobre todos los compuestos presentes. Lo último puede generar dificultades debido a la complejidad de los medios de cultivo utilizados en la producción (Deegan *et al.,* 2006).

II.1.2 Medios de cultivo utilizados para producir bacteriocinas

Como se puede ver en la Figura II.1, el principal medio de cultivo utilizado para la obtención de bacteriocinas purificadas es el caldo MRS seguido por el M17 y el BHI, todos ellos son medios complejos con ingredientes tales como triptona, peptona de soja o carne y extracto de levadura. Estos medios de cultivo poseen la ventaja de poseer todos los componentes necesarios para que las BAL puedan desarrollarse y producir bacteriocinas de manera óptima, pero, a la hora de su purificación dificultan el proceso en comparación a medios de cultivos basales, en los cuales se podría dificultar más el óptimo desarrollo de las BAL.

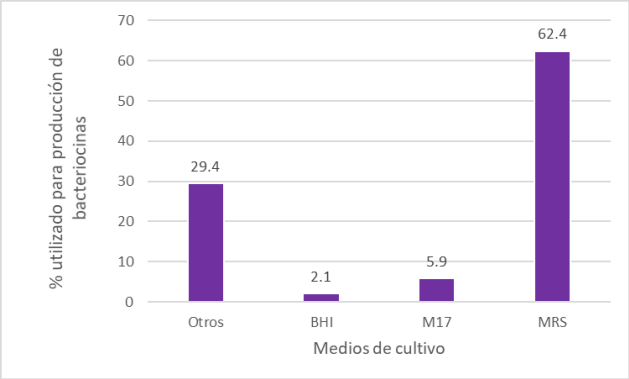


Figura II.1: Principales medios de cultivo utilizados para la producción de bacteriocinas (Adaptado de Kassaa et al. (2019))

II.1.3 Perspectiva actual de la producción y aplicación de bacteriocinas en alimentos

Hasta el año 2017, se identificaron 517 bacteriocinas, siendo un 60 % de ellas producidas por BAL. Dentro de éstas, el principal género productor es *Lactobacillus*, representando un 30 %, seguido por género *Enterococcus,* representando un 24 %. Las bacteriocinas efectivamente aisladas y caracterizadas pertenecen mayoritariamente a la clase II y lantibióticos (clase I), sin embargo, más de un 30 % de las mismas aún no han sido identificadas (Kassaa *et al.,* 2019).

Sus aplicaciones en alimentos incluyen tanto productos lácteos, como cárnicos, y en menor medida, vegetales. En el caso de lácteos, se ha evaluado principalmente la aplicación de nisina y pediocina en quesos, leche y yogurt, demostrándose actividad antagonista contra *C. botulinum, L. innocua y L. monocytogenes,* entre otros patógenos (de Arauz *et al.,* 2009; Muñoz *et al.,* 2004). Su aplicación a productos de origen vegetal incluye su adición a frutas, verduras y productos listos para el consumo, como ensaladas, jugos, fermentados como *kimchi*, sidra, y otros tales como puré de papas y enlatados, mejorando el control tanto de microorganismos deteriorativos como patógenos (Settanni y Corsetti, 2008).

En cuanto a productos cárnicos las bacteriocinas más evaluadas son enterocinas, sakacina, leucocina y pediocina, aplicadas junto con otros factores de preservación para controlar el desarrollo de patógenos tales como *L. monocytogenes* (Christenson y Hutkins, 1992). En comparación a los productos lácteos, la aplicación de nisina en productos cárnicos no ha sido tan satisfactoria debido a su baja solubilidad, distribución irregular y falta de estabilidad (Ananou *et al.,* 2007).

II.1.4 Técnicas de purificación de bacteriocinas

En cuanto a las técnicas de purificación, es importante destacar que, debido a la gran variabilidad que existe en la estructura de las bacteriocinas, no existe un método que pueda ser utilizado para todas las ellas. Independientemente de esta variabilidad, existen pasos a seguir para obtener resultados óptimos. En una primera etapa se debe evaluar la actividad antimicrobiana, para luego proceder a la purificación de la bacteriocina, siendo necesario en una última etapa la detección y cuantificación de la actividad en el producto purificado. Estas etapas junto con la metodología asociada se detallan en la Figura II.2.

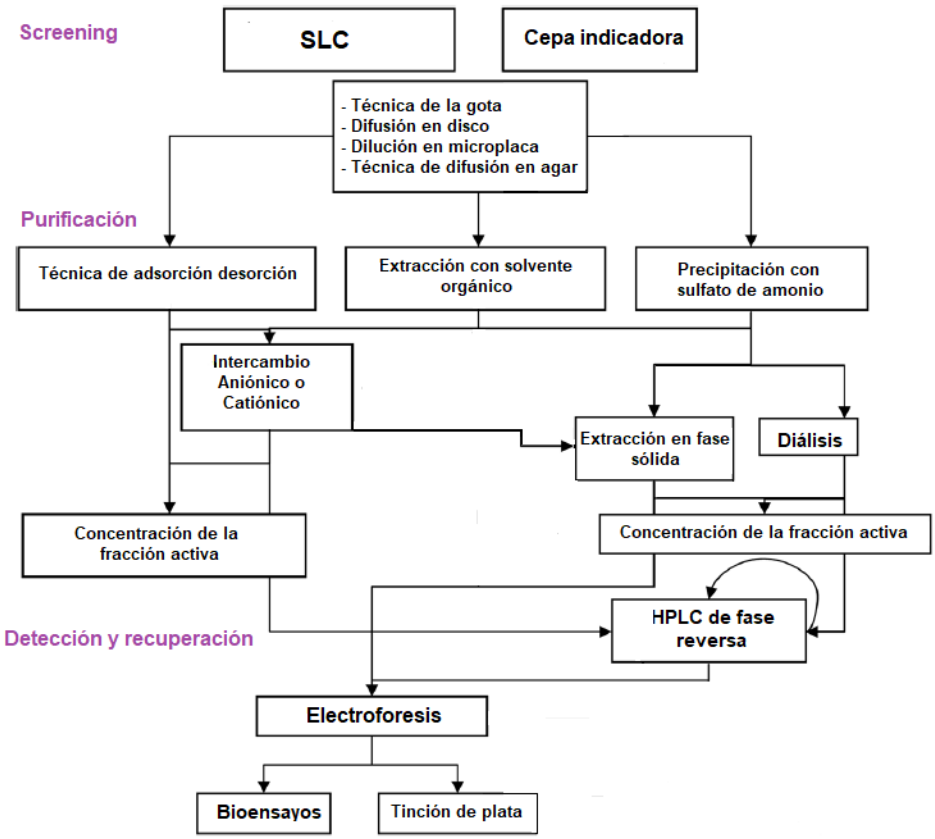


Figura II.2 Diagrama general de posibles opciones para la purificación de bacteriocinas (adaptado de Kaškonienė et al., (2017))

Resulta de interés destacar, que un paso previo a comenzar con la purificación de las bacteriocinas es obtener una producción del SLC de varios litros en un mismo proceso, con el objetivo de utilizar, dentro de lo posible, siempre el mismo lote del SLC y minimizar diferencias en la materia prima. Adicionalmente, se debe realizar un screening de la actividad del SLC, aplicando las técnicas descriptas en el capítulo anterior. A continuación, se detallarán las técnicas utilizadas para la purificación mencionadas en la Figura II.2.

II.1.4.i Técnicas utilizadas en las primeras etapas

Para lograr una purificación el primer paso, en general, es realizar una precipitación con sulfato de amonio, una extracción con solventes o un proceso de adsorción-desorción. La primera opción, se basa en la precipitación de cualquier péptido presente en el SLC, y se lleva a cabo en varias etapas sucesivas, con distintas concentraciones de sulfato de amonio, para mejorar la especificidad y el rendimiento. Esta técnica requiere un paso de diálisis, para eliminar las sales adicionadas. En cuanto a la a precipitación con solventes, los más utilizados son acetona y etanol. Dado que éstos separarán cualquier compuesto con una polaridad similar a la de las bacteriocinas, la metodología posee una baja selectividad y es por esto por lo que se utiliza únicamente como primer paso. Como una alternativa a esta extracción, Jozala *et al.* (2016) propusieron una extracción líquido-líquido por medio de un sistema micelar acuoso de dos fases y en un solo paso obtuvieron la purificación de nisina.

Finalmente, la última técnica utilizada como primer paso sobre el SLC crudo es la de adsorción-desorción. Se basa en un aprovechamiento de la capacidad de las bacteriocinas de adherirse y liberarse de la pared celular de diferentes microorganismos en condiciones específicas de pH, temperatura y concentración de sales. Según *Cui et al.* (2021), al utilizarse esta técnica dentro de las primeras etapas de la purificación, es posible purificar la bacteriocina objetivo utilizando, posteriormente, menos pasos y obteniéndose mejores rendimientos que al aplicar en primera instancia sulfato de amonio o solventes. Una de las principales ventajas de la purificación por adsorción-desorción es que únicamente se utilizan soluciones acuosas, y luego de un proceso de sucesivas centrifugaciones y limpiezas de las células, se obtiene un producto semipurificado contenido en una solución acuosa (Liu *et al.,* 2015). De esta manera el péptido obtenido puede ser aplicado directamente a los alimentos sin requerir la evaporación de solventes. Este método de purificación ha sido utilizado para purificar: pediocina, pentocina 31-1, plantaricina BM-1 y mesentericina W3 (Dundar *et al.,* 2016; Zhang *et al.,* 2009; Zhang *et al.,* 2013).

II.1.4.ii Técnicas utilizadas en las etapas intermedias

Estas técnicas no suelen utilizarse como primer paso de la purificación ya que su especificidad es muy elevada y debido a esto, es deseado que exista la menor cantidad de compuestos interferentes antes de aplicarlas. Por otra parte, presentan un costo más elevado que las técnicas citadas en el ítem anterior y los volúmenes de purificado obtenidos suelen ser pequeños (Zou *et al.,* 2018).

Entre las opciones más utilizadas en esta etapa se encuentran las columnas de interacción hidrofóbica rellenas, generalmente, con Sepharose. A través de las mismas se hace circular el SLC y luego se eluye con diferentes solventes de polaridad creciente -a pHs cada vez menores- hasta lograr la liberación de la bacteriocina deseada. Se han utilizado para purificar enterocinas como la LR/6, bacteriocinas similares a la nisina, plantaricina ASM1, garviecina LG34, nisina H y paracina (Choi *et al.,* 2000; Gao *et al.,* 2015; Ge *et al.,* 2016; Hata *et al.,* 2010; Kumar *et al.,* 2010 O'Connor *et al.,* 2015b; Zendo *et al.,* 2005). Cabe mencionar que esta técnica posee una alta selectividad, pero también un costo elevado y un bajo rendimiento (Jamaluddin *et al.,* 2018).

La extracción en fase sólida es otra de las técnicas más utilizadas. Se emplea un cartucho de extracción cuyo relleno permite una adsorción selectiva de compuestos, y su siguiente liberación al eluirlos con solventes de polaridad decreciente, logrando separar compuestos con una estructura molecular similar. La técnica en cuestión resultó de utilidad para la purificación de: sakasina D98a, D98b y D98c, lactocoquina MMT24, fermecina SA715 y bacteriocina M14-1, entre otras (LaBiocin database, 2022; Wayha *et al.,* 2018; Zou *et al.,* 2018).

II.1.4.iii Técnicas usadas en las etapas finales

Finalmente, existen técnicas de alta especificidad, que son únicamente aplicadas para lograr una purificación total de la bacteriocina y su posterior identificación y secuenciación. La más utilizada es la cromatografía en fase líquida, generalmente en fase reversa, o la cromatografía ÄKTA pure, desarrollada específicamente para la separación de proteínas. Estas técnicas cromatográficas son las más costosas y tienen el rendimiento más bajo, sin embargo, con ellas es posible obtener bacteriocinas totalmente purificadas y listas para ser secuenciadas (Chumchalova *et al.,* 2004; Gray *et al.,* 2006; Khochamit *et al.,* 2015; Sahoo *et al.,* 2015; Saraiva *et al.,* 2014; Sawa *et al.,* 2013). Otros métodos, utilizados en menor medida, son la ultrafiltración, la cromatografía líquida rápida para proteínas con amonio cuaternario como absorbente y el fraccionamiento de proteínas asistida por filtro de exclusión molecular (Kaškonienė *et al.,* 2017).

Si bien existen distintas metodologías para la purificación de bacteriocinas, lo común a todas ellas es que se trata de un proceso laborioso, de varios pasos, y específico para la bacteriocina que se desea aislar. Como consecuencia, y con el objetivo de obtener una purificación satisfactoria, resulta necesaria la optimización de cada uno de los pasos involucrados en la técnica elegida.

II.1.4.iv Confirmación de la purificación de la bacteriocina

Luego de obtener el péptido aislado o semipurificado, los principales bioensayos utilizados para obtener evidencia de la actividad antagonista remanente de las bacteriocinas son la técnica del halo o de la gota (Capítulo I.1.6). Si se deseara corroborar la pureza del compuesto se pueden realizar electroforesis en geles de poliacrilamida, utilizando una tinción de plata para detectar si existe un único péptido aislado. Dichos geles deben contar con altas concentraciones de poliacrilamida, y poros muy pequeños ya que el tamaño de las bacteriocinas se encuentra entre 2 y los 30 kDa (Sahoo *et al.,* 2016). De esta manera, es posible asegurar una tortuosidad elevada, para que las bacteriocinas puedan ser retenidas.

En última instancia, también es posible combinar estas dos técnicas. Para ello, primero se realiza una electroforesis con la finalidad de separar los péptidos presentes en la muestra, se lava el gel cuidadosamente y se coloca sobre placas de Petri con agar blando previamente inoculado con un cultivo indicador. Luego de la incubación, se evidencia la presencia o ausencia de actividad antagonista por medio de la formación de un halo de inhibición (Ming *et al.,* 1997). Llevando a cabo esta combinación, es posible obtener una separación del compuesto deseado y detectar su actividad antagonista. Adicionalmente, es posible detectar el peso molecular aproximado de bacteriocinas semipurificadas, ya que se podrá asociar una banda del gel (con un cierto peso molecular), a la bacteriocina (Tulini *et al.,* 2011).

II.1.5 Aplicaciones de bacteriocinas purificadas o semipurificadas en productos de la pesca

Como se mencionó anteriormente, en los últimos años se ha evaluado ampliamente la aplicación de bacteriocinas provenientes de diferentes BAL en matrices alimentarias. Usualmente, las bacteriocinas, al igual que otros antimicrobianos, son adicionadas junto con otros factores de barrera para mejorar su desempeño, ya que su actividad frecuentemente se limita a las bacterias Gram positivas (Deegan *et al.,* 2006). Los principales factores de conservación con los que se las combina son pH ácido, baja temperatura, tratamientos térmicos, ácidos orgánicos, películas de quitosano o pululano, atmósfera modificada o

envasado al vacío, campos eléctricos pulsados de alta intensidad y otros antimicrobianos, tales como aceites esenciales y lisozima. Al utilizar dichas combinaciones es posible controlar la población total de bacterias, incluyendo patógenas y deteriorativas en una amplia variedad de alimentos (Abdollahzadeh *et al.,* 2014, Ananou *et al.,* 2014; Kalschne *et al.,* 2014; Martín- Belloso *et al.,* 2006).

En cuanto a la preservación de pescado, cabe destacar que pese a que su flora bajo refrigeración y en condiciones aeróbicas sea primordialmente Gram negativa y la actividad antagonista de las bacteriocinas de BAL sea principalmente contra bacterias Gram positivas, su aplicación en conjunto con otras técnicas de preservación muestra resultados prometedores. Dentro de los factores adicionales utilizados, cabe destacar la refrigeración o la congelación, seguidas por la adición de películas u otros antimicrobianos, tales como aceites esenciales. Dentro de los principales efectos que poseen las bacteriocinas se puede destacar la actividad antagonista frente a bacterias patógenas tales como *L. monocytogenes*¸ *S. aureus* y *Salmonella* Typhimurium (Woraprayote *et al.,* 2018). En cuanto a la mejora de otros parámetros de calidad relacionados con la vida útil de los productos de la pesca, se ha obtenido una reducción de la producción de NBV y de aminas biogénicas (Ananou *et al.,* 2014; Tsironi y Taoukis, 2010).

Recientemente Lv *et al.* (2018) estudiaron la aplicación de la bacteriocina DY4-2 producida por *L. plantarum* a filetes de rodaballo en refrigeración a 4 °C, obteniendo una reducción en los recuentos de *P. aeruginosa* de las bacterias aeróbica totales y de la concentración de nitrógeno básico volátil en comparación con las muestras control. Adicionalmente, Kaktcham *et al.* (2019) al aislar una cepa de *L. lactis* 3MT de tilapia del Nilo y aplicando su bacteriocina lograron disminuir el crecimiento de *Vibrio* spp. 1 ciclo logarítmico en paté de pescado almacenado a 10 °C, y las características sensoriales del paté no se vieron modificadas por la presencia de la bacteriocina. Finalmente, fue posible controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* durante 15 días en filetes de salmón ahumado por medio de la aplicación de reuterina y refrigeración a 8°C (Montiel *et al.,* 2014). En la Tabla II.1 se pueden observar investigaciones recientes en las cuales se aplican bacteriocinas junto con factores de preservación adicionales y su efecto en diferentes microorganismos.

Tabla II.1: Usos de algunas bacteriocinas para la preservación de productos de la pesca (Campos *et al.*, 2022)

Bacteriocina	Producto de la pesca	Obstáculo adicional	Microorganismo objetivo	Referencia
Bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis 3MT*	Paté de pescado	Refrigeración	*Vibrio* sp.	Kaktcham *et al.,* 2019
Bacteriocina DYA-2	Filetes de rodaballo	Refrigeración	*P. fluorescens*	Lv *et al.,* 2018
Bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* FGC-12	Langostinos	Refrigeración	*V. parahaemolyticus*	Lv *et al.,* 2017
Reuterina	Salmón ahumado frío	Refrigeración	*L. monocytogenes*	Montiel *et al.,* 2014
Bacteriocina PSY2	Filetes de bacalao de arrecife	Refrigeración Congelación	Recuento de bacterias totales	Sarika *et al.,* 2012
Enterocina AS-48	Merluza Salmón Salmón ahumado	Bacteriófago lítico P100 de *Listeria* Refrigeración	*L. monocytogenes*	Baños *et al.,* 2016
Bacteriocina EFL4	Filetes frescos listos para comer de salmón	Película activa de alginato de sodio Refrigeración	Recuento de bacterias totales	Mei *et al.,* 2020
Bacteriocina 7293	Filetes de pez panga	Empaque biodegradable de alimentos Refrigeración	*L. monocytogenes* *S. aureus* *P. aeruginosa* *E. coli* *A. hydrophila* *Salmonella* Typhimorium	Woraprayote *et al.,* 2018
Nisina	Pescado picado	Aceite esencial de tomillo	*L. monocytogenes*	Abdollahzadeh *et al.,* 2014
Nisina	Salmón ahumado frío	Película basada en celulosa Lactato de sodio Diacetato de sodio Sorbato de potasio Benzoato de sodio Refrigeración	*L. monocytogenes* Flora deteriorativa	Neetoo y Mahomoodally, 2014

Según lo mencionado anteriormente en cuanto a la posibilidad de aplicar bacteriocinas purificadas o semipurificadas a productos de la pesca, en este capítulo se seleccionó una BAL para obtener una semipurificación de sus bacteriocinas y aplicar el producto obtenido a piezas de salmón almacenadas en refrigeración.

II.2 Objetivos

II.2.1 Objetivos generales

Obtener una semipurificación del SLC más adecuado y aplicarlo para la preservación de piezas de salmón refrigeradas.

II.2.2 Objetivos particulares

- Seleccionar la cepa bacteriocinogénica más apta para realizar una semipurificación de su SLC.
- Realizar purificaciones parciales de las bacteriocinas presentes en el SLC seleccionado.
- Seleccionar la técnica de purificación más adecuada.
- Aplicar el producto semipurificado del SLC en piezas de salmón rosado.

En la Figura II.3 se puede observar un esquema de los objetivos del presente capítulo.

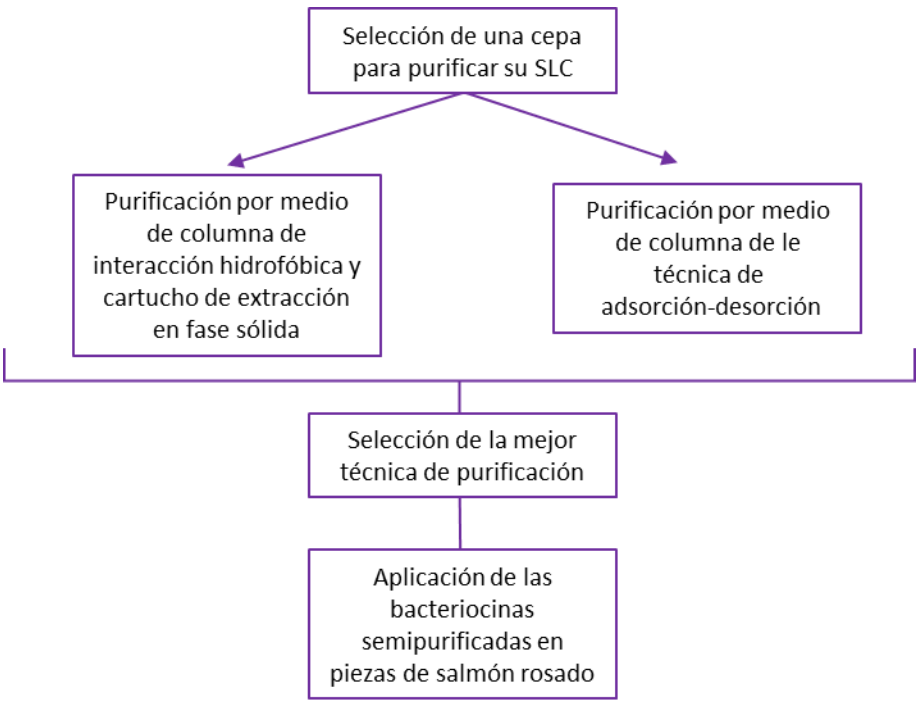


Figura II.3: Diagrama de objetivos particulares del Capítulo II

II.3 Materiales y Métodos

II.3.1. Selección de la cepa para realizar la purificación parcial del sobrenadante libre de células

Se decidió seleccionar el SLC con mayor actividad para ser semipurificado y utilizarlo como ingrediente para mejorar la preservación de pescado. Debido a que, al realizar el título de los SLC de las cepas preseleccionadas contra las bacterias de colección, (*L. innocua* ATTC 33090, *P. aeruginosa* ATCC 9027*, P. fluorescens* ATCC 49838*, S. putrefaciens* ATCC 8071 y *L. plantarum* ATCC 8014) los resultaros fueron similares (Capítulo I, sección I.4.4.iii), se aplicaron criterios adicionales para poder realizar la elección.

El primer criterio utilizado fue evaluar la capacidad para inhibir el crecimiento de *L. innocua* en medio líquido de concentraciones subinhibitorias del SLC de las 6 cepas preseleccionadas. Para ello, se utilizaron diluciones de 512^{-1} y 1024^{-1}, diluidas en caldo TSB y una concentración de 10^4 UFC/ml de *L. innocua*. De esta manera, se utilizó una concentración menor de bacterias que en la sección en la que se determinó el título, y una concentración menor del SLC, con el objetivo de observar si surgía un cambio en el tiempo al cual comenzaba el desarrollo de *L. innocua.* Los sistemas se incubaron por 92 horas a 30 °C. A lo largo de este tiempo, se evaluó el crecimiento de la cepa indicadora mediante la medición de la turbidez utilizando un turbidímetro McFarland. Se consideró como indicador de crecimiento una turbidez mayor a 2 grados McFarland (la medición inicial de McFarland resultó menor a 0,5). Luego de este ensayo, se observó que 3 cepas mostraban mejor actividad antagonista que las otras y se las seleccionó para continuar el proceso.

El segundo criterio utilizado fue determinar el título de los SLC seleccionados contra la flora nativa aislada de filetes de merluza. Para obtener dicha flora, se utilizaron especímenes de merluza fresca que llegaron al laboratorio conservados en hielo. Estos se evisceraron y se filetearon de manera aséptica bajo flujo laminar. Los filetes se envasaron en bolsas estériles y se incubaron por 14 días a temperatura de refrigeración. Esto se realizó con la finalidad de seleccionar las bacterias con capacidad de desarrollarse y sobrevivir en el filete de merluza. Con un hisopo estéril se tomaron muestras sobre el tejido muscular de los filetes y se transfirieron a caldo TSB. El mismo se incubó por 24 horas a 30 °C, en dos repiques sucesivos. Posteriormente, se sembró una alícuota de 100 µl del caldo con crecimiento microbiano sobre agar TSA y se incubó nuevamente por 24 horas a 30 °C. Finalmente, se agregaron 5 ml de caldo TSB estéril sobre la placa presentando desarrollo microbiano de manera que la cubriera por completo. Este caldo se colocó asépticamente en un tubo de ensayos, se suplementó con 20 % de glicerol y se almacenó a -80°C hasta su uso. Para

evaluar la actividad antagonista contra la flora nativa de pescado, se realizó la TDA, evaluando el título de cada una de las cepas.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado en cada una de las etapas.

II.3.2 Purificación parcial del sobrenadante libre de células seleccionado por medio de una columna de intercambio iónico y un cartucho de extracción en fase sólida

El objetivo de esta etapa del trabajo fue obtener, desde el SLC, una solución en la cual los componentes mayoritarios sean las bacteriocinas. De esta manera, se eliminarían azúcares, péptidos y otros macronutrientes propios del medio de cultivo, así como otros subproductos generados durante el desarrollo de las BAL. Para ello, como paso previo al proceso de purificación se evaluó si la actividad del SLC se modificaba por la presencia de las diferentes concentraciones de solventes a utilizar o por el ajuste a pH 2,0.

La purificación se realizó en dos etapas: la primera fue utilizando una columna de resina de interacción hidrofóbica AMBERLITE XAD-16 y la segunda, utilizando un cartucho de extracción en fase sólida MEGA BOND ELUT C18 10 g, 60 ml Varian EVA. Para ambas purificaciones, primero se adicionó el SLC a la columna o al cartucho y luego se comenzó a eluir con diferentes solventes. A medida que los solventes se adicionaron, las alícuotas eluidas se recolectaron cada 5 o 10 ml y a cada alícuota se le realizaron diferentes ensayos de manera de obtener un seguimiento de la purificación.

Las técnicas utilizadas para el seguimiento de la purificación fueron:

- Geles de poliacrilamida seguidos por una tinción de plata con el objetivo de obtener un perfil peptídico
- Ensayo de actividad antimicrobiana contra *L. innocua* por medio de la técnica de la gota (TG) para detectar y cuantificar la actividad antagonista de las fracciones eluidas.
- Cuantificación de proteínas por medio de la técnica de Bradford.
- Medición de absorbancia a 290 nm para obtener el perfil cromatográfico de la purificación (realizado sólo en el caso de la columna de interacción hidrofóbica).

II.3.2.i Pruebas de estabilidad de la actividad del sobrenadante libre de células en presencia de los solventes a utilizar y del ajuste de pH a 2,0

Para asegurar que las bacteriocinas presentes en la muestra no perdieran su actividad al entrar en contacto con diferentes solventes, se estudió su estabilidad en soluciones con una

proporción SLC: solvente de 1:10. En el caso del pH, se acidificó el pH del SLC con HCl 4,0 N. Los solventes evaluados fueron isopropanol a concentraciones mayores a un 70 %, y acetonitrilo a concentraciones mayores a 50 %. Existen numerosos estudios en los cuales se evaluó la estabilidad de la mundticina KS y de diferentes enterocinas a concentraciones de etanol, acetonitrilo de hasta un 50 %, y de isopropanol hasta un 70 %, comprobándose su estabilidad frente a ellos, por lo cual no se realizaron estas evaluaciones previas. Adicionalmente, la estabilidad de estas bacteriocinas a pH 3,0 también se ha demostrado ampliamente (Gupta y Tiwari, 2015; Kumar *et al.,* 2010; Qiao *et al.,* 2020; Settanni *et al.,* 2014), por lo cual únicamente se ensayó la estabilidad de la actividad del SLC a pH 2,0

Para evaluar el efecto de cada solvente o del ajuste a pH 2, se dejó el SLC en contacto con el solvente o con una solución de buffer fosfato a pH 2 por 15 minutos, 2 horas y 7 horas a 4 °C. Para determinar la estabilidad de la actividad antimicrobiana se utilizó TG empleando *L. innocua* como bacteria testigo, sembrando la solución del SLC junto con cada uno de los solventes y a pH 2, junto con sus correspondientes diluciones. Previamente, por medio de esta misma técnica se comprobó la supervivencia de *L. innocua* frente a las concentraciones de solventes evaluadas y a pH 2,0. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

II.3.1.ii Purificación por medio de una columna con relleno de interacción hidrofóbica

Para la purificación se montó una columna de 2,5 cm de radio y 50 cm de altura rellena con 40 g de resina de interacción hidrofóbica AMBERLITE XAD-16. En la Figura II.4, se muestra un esquema de la misma.

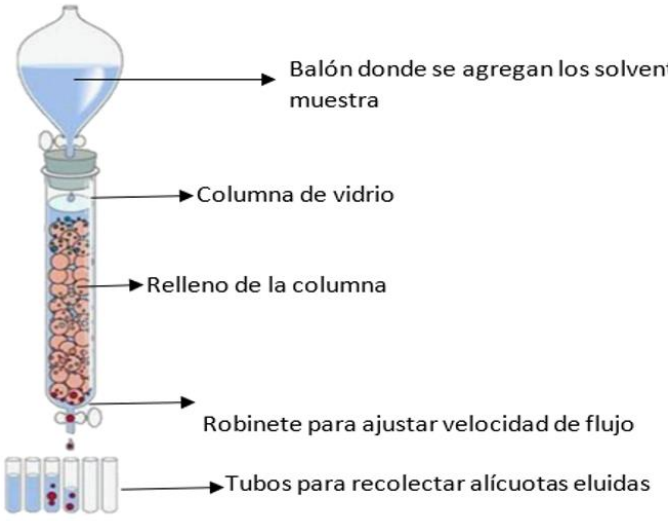


Figura II.4: Esquema de montaje columna de interacción hidrofóbica.

Para montar el dispositivo primero fue necesario acondicionar la resina, la cual se lavó con agua bidestilada 10 veces. El lavado se realizó agitando bien el relleno de la columna y dejándolo precipitar por 10 minutos antes de cambiar el agua y proceder al siguiente lavado. La columna de vidrio también se lavó 10 veces con agua bidestilada. Con el objetivo de lograr un relleno compacto dentro de la columna de vidrio, éste se agregó lentamente, resuspendido en agua, permitiendo que se depositara de forma pareja y manteniendo el robinete inferior de la columna abierto de manera tal que el agua drenara. En esta instancia fue esencial no dejar que el relleno se secara, ya que, al secarse, genera espacios y pierde su homogeneidad debido a su alta hidrofobicidad. Una vez que la columna estuvo llena, para asentarla, se la dejó en reposo 2 horas y luego se hicieron circular 4 litros de agua una velocidad de 4 ml/min.

Posteriormente se aplicaron 135 ml del SLC a una velocidad de 8 ml/min. El mismo se lavó con 300 ml de agua bidestilada a una velocidad de 12 ml/min, luego se eliminaron parte de las impurezas aplicando 300 ml de etanol al 20 % a una velocidad de 12 ml/ min. La elución de las bacteriocinas se realizó aplicando 600 ml de una solución de alcohol isopropílico al 70 %, ajustado a pH 3,0 con HCl 4,0 N. En todas las etapas se recolectaron alícuotas de 5 ml para estudiar la actividad antagonista, la concentración de proteínas, el perfil peptídico y realizar el perfil cromatográfico midiendo la absorbancia a 290 nm.

II.3.1.ii.a Evaporación del solvente de las alícuotas con actividad

Todas las alícuotas que presentaron actividad antagonista contra *L. innocua* se juntaron en una sola solución y se sometieron a un proceso de evaporación a fin de eliminar la mayor cantidad posible de solvente y proseguir con la siguiente etapa de la purificación. Para ello, la solución se colocó en un rotaevaporador con baño a 50 °C por 30 minutos. En este tiempo, se redujo su volumen a un 25 % del original. La actividad antagonista de esta fracción se evaluó por medio de la TG, utilizando diluciones seriadas desde 2^{-1} hasta 256^{-1} de manera de conocer su título.

II.3.1.ii.b Evaluación de la composición de la primera etapa de purificación

En esta etapa, siguiendo la metodología propuesta por Merlich *et al.* (2019), se inyectó una alícuota del SLC semipurificado, luego de la evaporación del solvente, por un sistema de cromatografía líquida de purificación de proteínas, AKTA Pure. Se utilizó una columna C18 de 250 x 2,1 mm y tamaño de poro de 5 µm. Para eluir los diferentes compuestos del SLC de la columna, se utilizaron concentraciones de acetonitrilo crecientes desde un 10 % hasta un 90 %. Conforme avanzaba la elución, en el equipo se midió la absorbancia de la muestra

a 290 nm de manera automática. Las alícuotas eluídas de la purificación se separaron cada 2 ml empleando un muestreador automático. La actividad antagonista de los mismos se evaluó por medio de la TG. Los resultados de esta purificación permitieron determinar que las bacteriocinas no se habían purificado adecuadamente, por lo cual se decidió utilizar otra técnica como segundo paso de la purificación.

II.3.2.iii Purificación por medio de un cartucho de extracción en fase sólida

Para realizar esta etapa de la purificación se utilizó un cartucho de extracción de fase sólida MEGA BOND ELUT C18 10 g, 60 ml Varian EVA adosado a un dispositivo de filtrado al vacío (Figura II.5). Por la parte superior del cartucho se aplicaron las bacteriocinas semipurificadas y evaporadas de la etapa anterior y se procedió a eluirlas con diferentes solventes.

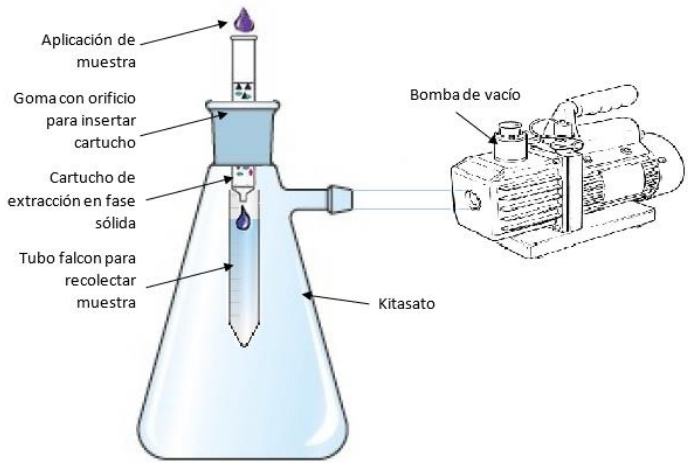


Figura II.5: Esquema del sistema utilizado para realizar la purificación de las bacteriocinas con cartucho de extracción en fase sólida

En primer lugar, se acondicionó el cartucho para asegurar que se encuentre en condiciones para adsorber las bacteriocinas. Para ello, se pasaron 10 ml de metanol absoluto, y posteriormente 10 ml de una solución de metanol al 10 % en agua bidestilada. Luego se agregaron 10 ml de la fracción semipurificada, libre de solvente y se lavó con 10 ml de agua bidestilada para eliminar todas las sustancias que no hayan quedado adsorbidas en el cartucho. Para finalizar el lavado, se aplicaron 10 ml de etanol al 30 % y 10 ml de alcohol isopropílico al 20 %. Las bacteriocinas se eluyeron utilizando 10 ml de isopropanol al 40 % y 10 ml de isopropanol al 70 %. Luego de aplicar cada uno de los solventes, se recuperaron las fracciones eluidas de 10 ml, es decir que, se obtuvieron en total 7 fracciones, cuyas propiedades fueron evaluadas.

Para evaluar la actividad antagonista de cada fracción se utilizó la TG y para determinar su concentración proteica se utilizó la técnica de Bradford. Adicionalmente, también se realizó el seguimiento con el gel de poliacrilamida y tinción de plata para cada una de las fracciones eluidas. Las técnicas mencionadas se detallarán en la siguiente sección.

II.3.2.iv Técnicas empleadas en el seguimiento de la purificación

II.3.2.iv.a Formación del perfil cromatográfico de la purificación

Para obtener el perfil cromatográfico de la purificación se midió la absorbancia de todas las fracciones eluidas de la columna a 290 nm. Los valores de dicha absorbancia tienen relación con la cantidad de proteínas presentes en cada alícuota. Con esta medición es posible realizar un seguimiento de la purificación y dilucidar si las repeticiones de la purificación dan resultados similares para poder estandarizarla. En base a estos resultados se construyó un gráfico que relaciona la absorbancia a 290 nm con el volumen eluido de la columna. Esta determinación se realizó por duplicado con el fin de evaluar la reproducibilidad de la técnica.

II.3.2.iv.b Evaluación de la actividad antagonista de las alícuotas eluidas de la columna de purificación

Para determinar la actividad antagonista de las alícuotas eluidas, se utilizó la TG. En primer lugar, se sembró una alícuota de 10 µl de cada una de las fracciones eluidas en una placa de agar BHI. Las placas se dejaron abiertas bajo flujo laminar por 1 hora para eliminar el solvente, y posteriormente se agregó, a cada placa, 5 ml de un inóculo de 10^6 UFC/ml de *L. innocua* (MyM generales sección 3.4.3), asegurando que cubra toda la superficie, y eliminando el excedente. Las placas se dejaron secar, bajo flujo laminar por 20 minutos para lograr la adsorción del inóculo en el agar. Luego se incubaron a 30 °C por 24 horas. Se realizaron controles negativos de los solventes (etanol 20 % y 40 %; isopropanol 40 %; isopropanol 70 % a pH 3,0), los cuales se dejaron evaporar bajo flujo laminar al igual que las muestras para descartar su posible actividad contra *L. innocua*. Como control positivo se utilizó el SLC sin ningún tratamiento. Las fracciones eluidas de la purificación que generaron un área translúcida en la placa se consideraron como las fracciones con actividad antimicrobiana. Todos los ensayos en los que se aplicó la TG se realizaron por triplicado.

Se optó por utilizar esta técnica, en lugar de la técnica TDA, ya que la TG permite primero el sembrado de las sustancias con actividad antimicrobiana y luego la siembra del microorganismo permitiendo primero la evaporación parcial del solvente de las fracciones

eluidas de la columna antes de sembrar el microorganismo y evitar así el contacto entre ellos y, por ende, minimizar la posible actividad inhibitoria del solvente.

II.3.2.iv.c Determinación del perfil proteico por medio de geles de poliacrilamida

El objetivo de este ensayo fue lograr un seguimiento de la composición peptídica a medida que se avanzaba en la purificación. La preparación de los geles se realizó según la técnica de Laemni (1970) modificada. Para lograr mejores resultados, se utilizó una mezcla de dos geles con tamaño diferente de poro; uno con poro abierto (6 % de acrilamida), donde se realizó la siembra de la muestra y uno de poro más pequeño (15 % acrilamida) para el resto del gel. Se utilizó una concentración alta de acrilamida ya que para poder retener la bacteriocina la tortuosidad del recorrido de la muestra debe ser máxima, pues las bacteriocinas son péptidos de peso molecular muy bajo, entre los 2 y los 30 KDa (Sahoo *et al.,* 2016). El dispositivo utilizado para realizar la electroforesis se muestra en la Figura II.6.

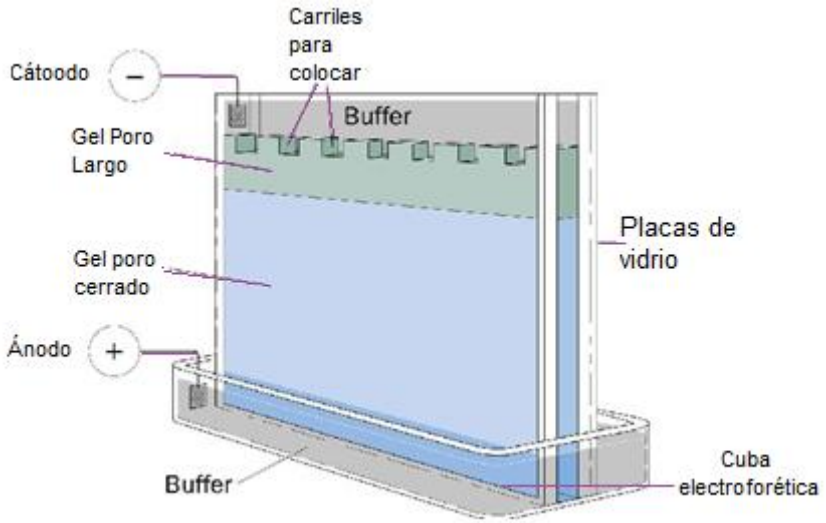


Figura II.6: Esquema de cuba electroforética con el gel de acrilamida colocado.

Los geles se prepararon a partir de distintas soluciones. La solución A se realizó disolviendo 2 g de acrilamida en 1 L de Buffer Bis 0,735 mg/ml. La solución B constó de Buffer Tris en una concentración 1,5 M a pH 6,0. La solución C se realizó disolviendo 10 mg de persulfato de amonio en 1 ml de agua bidestilada. También se utilizó una solución de tetrametiletilenodiamina (TEMED) y una solución de SDS al 1 %. Como buffer de corrida se utilizó una solución de glicina 0,348 M y SDS al 0,2 % en Buffer Tris 0,05 M a pH 8,30.

Brevemente, se mezclaron las soluciones A, B y SDS con agua destilada y luego se añadieron la solución C y TEMED, en ese orden. El volumen utilizado de cada solución para formar los geles deseados se encuentra en la Tabla II.2. Primero se mezcló el gel de poro

cerrado y se vertió en un soporte entre dos vidrios, hasta un 90 % de su capacidad. Luego se dejó solidificar parcialmente y se preparó y agregó el gel de poro abierto en el espacio restante entre los dos vidrios. Finalmente se colocó el peine para lograr la formación de los carriles donde se sembrarían posteriormente las muestras. Los geles se dejaron secar por lo menos por 2 horas antes de colocarlos en la cuba electroforética.

Tabla II.2: Volumen de mezclado de cada reactivo para la formación de los dos geles utilizados

Reactivo	Poro abierto	Poro cerrado
Agua	5,9 ml	1,85 ml
SDS	1,0 ml	1,0 ml
TG	1,25 ml	1,25 ml
Solución A	1,8 ml	5,4 ml
TEMED	0,02 ml	0,02 ml
Solución C	0,5 ml	0,5 ml

El montaje se realizó colocando hasta dos geles en la cuba y llenando el recipiente con el buffer de corrida. En cada carril se colocaron 20 µl de muestra y, según la muestra sembrada, se realizaron diferentes tratamientos previos. En el caso del MRS, se concentró 5 veces, y en el caso de las muestras que contenían solventes, primero se procedió a evaporar los solventes a 60 °C por el tiempo necesario en baño de agua. La corrida se realizó a 90 Volts y 70 amperes durante el tiempo suficiente para que las muestras llegaran a una distancia de 2 cm del borde inferior del gel (aproximadamente 3 horas). Las corridas para cada uno de los geles evaluados se realizaron por duplicado.

II.3.2.iv.c.1 Tinción de plata para proteínas

Para visualizar la presencia de péptidos en el gel de poliacrilamida se realizó una tinción con plata. Esta técnica consiste en una serie de hidrataciones y deshidrataciones del gel de poliacrilamida, que favorecen la tinción de las proteínas con nitrato de plata y la posterior formación de un pigmento marrón al revelar el gel con una solución de tiosulfato de sodio.

Se siguió la metodología propuesta por Blum *et al.* (1987). Primero se realizó la fijación del gel, sumergiéndolo por 30 minutos en una solución de 50 % de metanol, 38 % de agua bidestilada, 12 % de ácido acético y 25 µl de solución de formol al 37 %. Posteriormente, se realizaron 2 lavados de 20 minutos en una solución al 50 % de etanol absoluto, seguidos de 2 lavados adicionales en una solución al 70 % de etanol absoluto. El paso siguiente fue realizar un pretratamiento por 1 minuto en una solución de tiosulfato de sodio pentahidratado (0,01 g/50 ml). Luego, se procedió a la tinción con una solución de nitrato de

plata (0,1 g/50 ml) y 37,5 µl de formaldehido al 37 % por 20 minutos. Se reveló la tinción con carbonato de sodio (3 g/50 ml), 25 µl de formaldehido y tiosulfato de sodio (0,2 mg/50 ml) hasta que se notó la aparición de las bandas bien definidas en el gel (máximo 10 minutos). Finalmente, para frenar el revelado de la tinción, el gel se dejó en una solución igual a la primera por 30 minutos. Para preservar el gel para futuras comparaciones, el mismo se dejó en una solución 1:1 de metanol: agua.

II.3.2.iv.d Determinación de la concentración de proteínas de las muestras por medio de la técnica de Bradford

El objetivo de esta determinación fue obtener la concentración de proteínas en las muestras correspondientes a las fracciones finales de la purificación, con y sin actividad y también del MRS y el SLC. Para ello se utilizó la técnica de Bradford la cual se basa en la reacción entre el compuesto azul de *comassie* con aminoácidos específicos.

Se colocó en un tubo de ensayo una parte de muestra por cada 30 partes de reactivo de Bradford, se dejó en contacto por 5 minutos y luego se midió la absorbancia de la muestra a 595 nm. Como blanco se utilizó una solución de agua bidestilada. La curva de calibración se realizó con concentraciones de albúmina bovina de entre 0 y 700 µg/ml. Los resultaros se expresaron como concentración de proteínas (µg/ml) y como masa total de proteínas (µg) (Ecuación II.1). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

$$Masa\ total\ de\ proteínas\ = (Concentración\ de\ proteínas)x\ (volúmen\ de\ la\ alícuota)$$

Ecuación II.1

II.3.2.v Cálculo de rendimientos de la purificación

A partir de los datos obtenidos en la presente purificación y en la siguiente (Sección II.4.3), se calcularon los rendimientos de las purificaciones. En primer lugar, se calcularon las unidades arbitrarias relacionadas con la actividad antagonista contra *L. innocua* en cada uno de los pasos de la purificación. El uso de las unidades arbitrarias para cuantificar la actividad antagonista es utilizado para obtener valores de actividad más homogéneos y comparables. El cálculo se puede observar en la Ecuación II.2.a.

$$\text{Actividad (UA)} = 100 \text{ x } V_{\text{inicial}} \text{ x Título de purificación}^{-1} \qquad \textit{Ecuación II.2.a}$$

La actividad específica, representa la actividad antagonista por mg de proteínas presentes en la muestra (Ecuación II.2.b) e indica cuán eficiente ha sido la purificación, ya que se desea que exista una menor concentración de proteínas, y una mayor actividad remanente.

$$\text{Actividad específica (AEsp)} = \frac{\text{Actividad}}{\text{Masa total de proteínas } (\mu g)} \qquad \textit{Ecuación II.2.b}$$

La actividad remanente porcentual, se obtiene de realizar el cociente entre la actividad del producto de la purificación en una etapa determinada dividido por la actividad del SLC sin ser purificado (Ecuación II.2.c). Esta medida también está relacionada con la eficiencia de la purificación, pero al relacionarse únicamente la actividad antimicrobiana en el paso de purificación y no la concentración de proteínas, sólo denota la capacidad de la técnica para preservar dicha actividad.

$$\text{Actividad Remanente porcentual} = \frac{\text{Actividad}_{\text{etapa}}}{\text{Actividad}_{\text{SLC}}} \; x\; 100 \qquad \textit{Ecuación II.2.c}$$

La masa remanente porcentual de proteínas se obtuvo al realizar el cociente entre la masa total de proteínas de una etapa determinada por la del SLC (Ecuación II.2.d). Este cociente se realizó a fin de permitir una observación directa de las proteínas efectivamente remanentes en cada etapa de la purificación.

$$\text{Masa Remanente porcentual de proteínas} = \frac{\text{Proteínas}_{\text{etapa}}}{\text{Proteínas}_{\text{SLC}}} \; x\; 100 \qquad \textit{Ecuación II.2.d}$$

Finalmente, el factor de purificación relaciona la actividad específica del paso deseado de purificación y la del SLC (Ecuación II.2.e). Éste presenta una perspectiva global de la purificación, ya que relaciona tanto el contenido de proteínas como la actividad remanente. Un factor de purificación cercano a 1 indica una purificación en la cual la proporción entre las proteínas y la actividad se mantiene igual que en el SLC, si este es mayor a uno, denota una mejora en cuanto a la muestra original ya que a menor cantidad de proteínas existe una mayor actividad antagonista, y uno menor a 1 muestra que la pérdida de actividad fue mayor a la capacidad de la técnica para purificar las proteínas.

$$\text{Factor de purificación} = \frac{\text{Actividad específica}_{\text{etapa i}}}{\text{Actividad específica}_{\text{SLC}}} \qquad \textit{Ecuación II.2.e}$$

II.3.2.vi Aproximación del peso molecular de las bacteriocinas presentes en el SLC

Resultó de interés identificar la banda del gel de poliacrilamida que correspondía a las bacteriocinas, con el objetivo de obtener una aproximación de su peso molecular. Para ello,

se sembró el SLC concentrado 5 veces en los carriles externos del gel de poliacrilamida, por duplicado, y, en el carril adyacente a uno de los SLC, se sembró un estándar de peso molecular ultra bajo (tamaño desde 1060 hasta los 26600 Dalton). Luego de finalizada la corrida, se colocó el gel sobre una placa de Petri estéril y se separó en dos partes utilizando un bisturí, obteniéndose así una mitad que solo contenía la muestra del SLC, y otra que contenía el SLC y el estándar de peso molecular. A la porción que contenía el SLC y el estándar se le realizó una tinción de plata. El gel que tenía únicamente el SLC se lavó cinco veces en agua bidestilada (por 1 hora), para eliminar cualquier remanente de solvente presente en el gel.

Posteriormente, al finalizar la tinción de plata y observar las bandas, la otra mitad del gel se cortó en trozos de manera de poder separar las principales bandas características. Se determinó la actividad inhibitoria de este gel contra *L. innocua* utilizando la técnica definida por Khalkhali *et al.* (2017). En primer lugar, se preparó agar cerebro corazón blando (BHI 0,8 % de agar bacteriológico) y se agregó un inóculo de *L. innocua* de manera de obtener una concentración de 10^6 UFC/ml. El agar blando se adicionó sobre placas de agar BHI y se dejó solidificar. En estas placas se colocaron las porciones del gel cortadas previamente. La placa se incubó a 30 °C por 24 horas. En caso de observar zonas translúcidas sobre de las porciones del gel, estas se consideraron como inhibición del crecimiento de *L. innocua*. Este ensayo se realizó por duplicado utilizando dos geles independientes.

Finalmente, se procedió a comparar la zona en la que se obtuvo inhibición del crecimiento de *L. innocua* y la zona del gel teñido con plata con el objetivo de identificar cuál de las bandas pertenecía a las bacteriocinas y así estimar su peso molecular.

Resulta de interés destacar que se realizó la estimación del peso molecular de las bacteriocinas utilizando el SLC y no la muestra semipurificada, ya que de la última etapa de la purificación se obtiene un volumen muy pequeño y no fue posible eliminar la totalidad del solvente sin comprometer la actividad de las bacteriocinas. Es debido a esto, que no fue posible inyectar esta alícuota en el gel y verificar su actividad antagonista.

II.3.3 Purificación parcial por medio de le técnica de adsorción-desorción

El objetivo de desarrollar esta técnica fue evaluar la efectividad de un proceso más simple para la purificación del SLC seleccionado, mediante la cual fuera posible producir grandes cantidades de bacteriocinas semipurificadas. La presente técnica de purificación se basa en la capacidad de las bacteriocinas de interactuar con la pared celular de los microorganismos bajo determinadas condiciones del medio. Entre estas condiciones se destaca el pH ya que, modifica la afinidad de las bacteriocinas por la pared celular, permitiendo una adsorción estable a o una desorción sencilla (.

II.3.3.i Obtención del SLC y el pellet

Para realizar la purificación primero fue necesario obtener el SLC y el pellet sobre el cual se realizaría la adsorción. Para ello, se incubó la cepa seleccionada dos veces seguidas en caldo MRS por 24 horas a 30 °C. Luego, se realizó un tratamiento térmico (5 minutos a 100 °C) del inóculo, con el objetivo de inactivar las proteasas y las BAL y evitar así que interfirieran en la determinación de la actividad antagonista, debido a la producción de bacteriocinas *in situ.* Adicionalmente, este tratamiento térmico mejora la adsorción de las bacteriocinas a la pared celular de la bacteria (Parada *et al.,* 2007). Finalmente, se ajustó el pH del inóculo al pH de adsorción y se realizó una centrifugación a 10000 rpm y 4 °C por 10 minutos, separándose así el SLC del pellet.

II.3.3.ii Etapas del proceso de purificación parcial

En la Figura II.7 se muestra un esquema del proceso. Las etapas realizadas para obtener la semipurificación parcial por adsorción-desorción fueron las siguientes:

1. Adsorción selectiva de las bacteriocinas a la pared celular de la célula productora: para ello se colocó en contacto el SLC de la cepa seleccionada, con su pellet por 1 hora, y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm, por 6 minutos y a 4 °C, obteniendo, por un lado, el SLC con las bacteriocinas no adsorbidas (Alícuota Ads.) y, por el otro, el pellet y las bacteriocinas adsorbidas sobre su pared celular. Se evaluó la actividad de la Alícuota Ads. para conocer la concentración de bacteriocinas no adsorbidas, y se continuó con el procedimiento con el pellet.

2. Lavado-centrifugación del pellet: esta etapa se realizó con el objetivo eliminar cualquier contaminante no adsorbido a la pared celular de las bacterias. Para ello, se resuspendió el pellet en 6 ml de buffer fosfato 5 mM a pH 6,0, se homogenizó en agitador vortex por 30

segundos y se centrifugó en las mismas condiciones (Alícuota L_1). Este proceso se realizó dos veces seguidas. Posteriormente, se midió la actividad antagonista de la alícuota $L_{1.}$ La actividad de éste permitió conocer la irreversibilidad de la adsorción de las bacteriocinas a las células, ya que, de quedar éstas en el buffer de lavado, indicaría que éstas pierden afinidad por la pared celular. El pellet se conservó para la siguiente etapa.

3. Desorción de las bacteriocinas adsorbidas a la pared celular: para ello, se utilizaron 2 ml de una solución acuosa de NaCl (2 % m/m 1 M), a pH ácido, logrando así que la bacteriocina se protone y se desprenda de la pared celular. La solución se dejó en contacto con el pellet por 1 hora a 4 °C y luego de centrifugar (a 10000 rpm, por 6 minutos y a 4°C), se separó el SLC rico en bacteriocinas (Alícuota Des). Ésta alícuota contiene las bacteriocinas semipurificadas, por lo cual la evaluación de su actividad resulta necesaria para estudiar la eficiencia de la purificación.

4. Lavado- centrifugación: con el objetivo evaluar si aún persistían bacteriocinas adsorbidas a la pared de las células, se repitió un nuevo lavado al igual que en la etapa 2 (Alícuota L_2), midiéndose, también, su actividad antagonista.

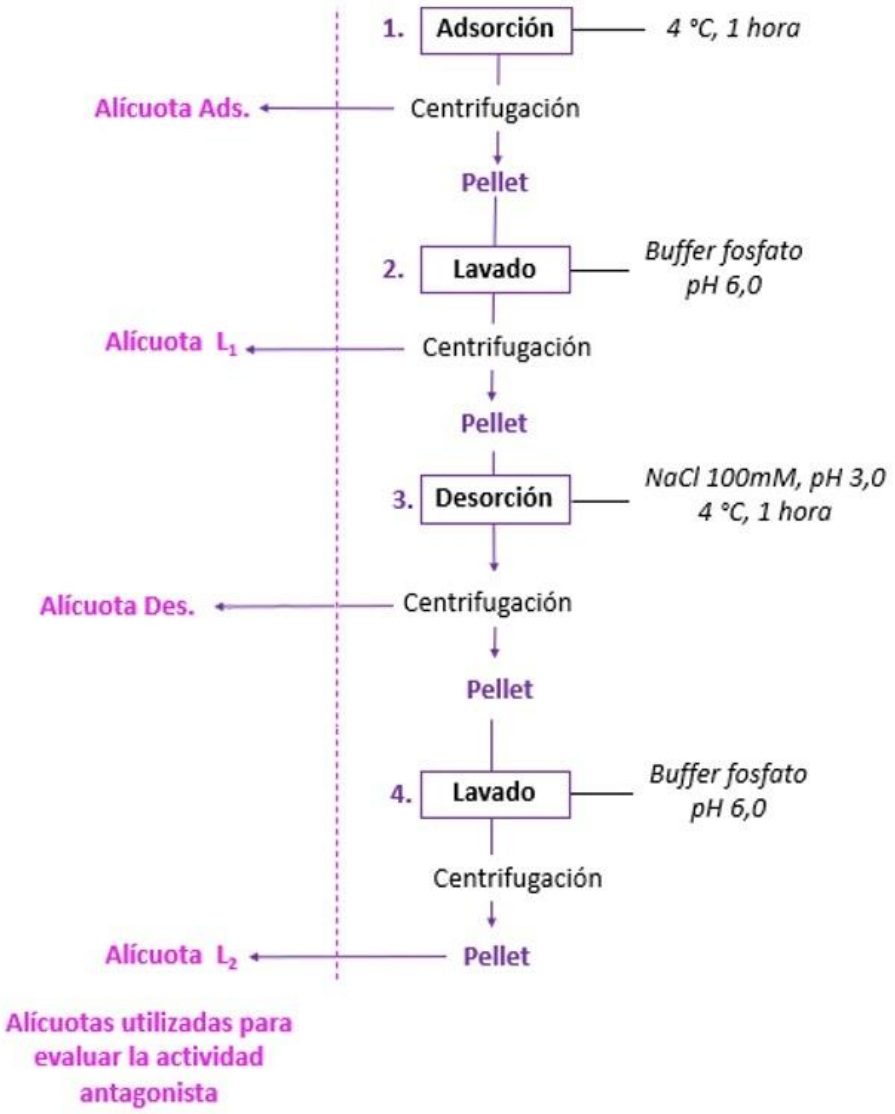


Figura II.7: Esquema de la purificación por medio de la técnica de adsorción-desorción. Todas las alícuotas nombradas y resaltadas en el gráfico, son aquellas en las que se evaluó la actividad antimicrobiana, con el fin de determinar la presencia de bacteriocinas.

De cada una de las etapas de la purificación se tomó una alícuota y se analizó su actividad antagonista sobre *L. innocua* por medio de la TG. Debido a que posteriormente se optimizaron condiciones tales como la temperatura, volumen de SLC y pH, éstos se detallan en las secciones siguientes.

Debido a que la afinidad de las bacteriocinas por la pared celular de las bacterias depende del pH, la temperatura y la cepa utilizada para realizar la adsorción, entre otros factores (Liu *et al.,* 2015; Liu *et al.,* 2009) se optimizaron algunos de estos parámetros. Se analizó el pH en el cual las bacteriocinas se adsorben mejor en la pared celular de las bacterias y el pH al

cual se pierde dicha afinidad. Adicionalmente, se evaluaron las condiciones óptimas de temperatura y la relación SLC/bacterias para lograr la mayor concentración posible de bacteriocinas en el sobrenadante semipurificado.

II.3.3.iii Evaluación preliminar del pH de adsorción de las bacteriocinas a las células productoras

El objetivo de esta evaluación previa fue conocer la capacidad de una concentración de 10^6 UFC/ml de células para adsorber las bacteriocinas. Es por esto, que en esta etapa no se procedió siguiendo las 4 etapas mencionas en el ítem anterior, sino que se procedió a lavar el pellet para que éste quede libre de bacteriocinas, luego se ajustó la concentración bacteriana y finalmente se evaluó el pH óptimo de adsorción como se amplía en los siguientes ítems.

II.3.3.iii.a Acondicionamiento de las células

El primer paso para definir el pH óptimo de adsorción fue la limpieza de las células. Las mismas se resuspendieron en 1 ml de buffer fosfato de sodio 5 mM pH 5,5, se agitaron en agitador vortex y centrifugaron a 6000 rpm y 4 °C por 10 minutos. Luego se separó el sobrenadante y las células se pusieron en contacto con 1 ml de una solución 1M NaCl pH 3,0, por 1 hora bajo agitación a 4 °C. El objetivo de este paso fue lograr la desorción completa de las bacteriocinas que pudieran quedar adheridas a la pared celular al pH de producción. Pasado este tiempo, se centrifugaron nuevamente y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados sucesivos con agua destilada y finalmente se resuspendieron en una cantidad de agua destilada 20 veces mayor al volumen del caldo de incubación (suspensión de bacterias), obteniéndose una concentración de 10^6 UFC/ml. Luego de todo este proceso se obtuvieron células acondicionadas para evaluar su capacidad para adsorber las bacteriocinas.

II.3.3.iii.b Optimización del pH de adsorción

Para realizar el proceso de optimización del pH de adsorción se pusieron en contacto 0,1 ml de una suspensión de células con 0,1 ml de SLC y 1,8 ml del buffer al pH deseado para el testeo. Los buffers utilizados fueron desde pH 5,5 hasta pH 8,0, a intervalos de 0,5 unidades de pH entre cada muestra. Como control negativo (control 1) se utilizó una mezcla de 0,1 ml de la suspensión de bacterias, 1,8 ml del buffer al pH de estudio, y 0,1 ml de agua destilada; este control fue necesario para asegurar que no hubiera bacteriocinas adsorbidas a la pared celular de las bacterias que se liberaran en presencia del buffer de estudio. El control

positivo (control 2) incluyó 0,1 ml de agua destilada, 0,1 ml de SLC y 1,8 ml de buffer; éste tiene la función de tener un control de la actividad del SLC en la dilución evaluada, ya que no se encuentran presentes las células con potencial de adsorber la bacteriocina.

Todos los sistemas se incubaron a 4 °C por 1 hora, se centrifugaron en las mismas condiciones que en el ítem anterior y se determinó el título de los sobrenadantes obtenidos contra *L. innocua* por medio de la TG. Éstos SLC representan las bacteriocinas que no han sido adsorbidas a la pared celular, por lo cual es deseable un título bajo, que indique que la mayor parte de las bacteriocinas quedaron adsorbidas. Posteriormente se realizó un lavado de las células con buffer fosfato pH 6,0. Para ello se adicionaron a las bacterias 2 ml del buffer y se agitaron con vortex por 1 minuto. Posteriormente se centrifugó el tubo a 12000 rpm por 15 minutos, se obtuvo el agua de lavado y su actividad también se evaluó utilizando la TG. Un título menor en la primera instancia indicó una mejor capacidad de adsorción de las células ya que, si las bacteriocinas quedan retenidas en la pared celular, no se encuentran presentes en el SLC. La capacidad de adsorción de las células a los diferentes pH fue calculada como:

$$\%\ bacteriocina\ adsorbida = \frac{100\ x\ \left(\frac{UA}{ml}\ SLC - \frac{UA}{ml}\ Control\ I\right)}{\frac{UA}{ml}\ Control\ II}$$

Ecuación II.3: Cálculo del porcentaje de bacteriocina adsorbida por las células bacterianas
**Las UA/ml expresadas en la fórmula, corresponden a la inversa de la dilución que representa el título, multiplicada por el tamaño del halo de dicha dilución y por 100*

II.3.3.iv Selección del pH de adsorción y desorción

Una vez que se obtuvieron los pHs óptimos de adsorción de las bacteriocinas, en el ensayo preliminar, fue necesario evaluar el pH de adsorción, en las condiciones en que se iba a realizar la técnica completa, tal como se indican los 4 pasos en la sección II.3.3.ii. Para ello, se evaluó la eficiencia tanto de la adsorción como de la desorción en simultáneo, ya que se requiere una adsorción eficiente, pero que también permita una buena desorción al sobrenadante luego. En esta etapa, debido a que el objetivo de la técnica fue obtener la mayor cantidad posible de bacteriocinas adsorbidas, no se realizó el paso de acondicionamiento de las células, estandarización de su composición, ni dilución del SLC. En el ensayo anterior los pH 6,0 6,5 y 7,0 de adsorción dieron resultados similares, se decidió evaluar distintos pH de desorción, para cada uno de los pH de adsorción óptimos (Tabla II.3).

Tabla II.3: Condiciones estudiadas para optimizar pH de adsorción y desorción de la bacteriocina

pH Adsorción	6,0			6,5			7,0		
pH Desorción	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0

Para realizar este proceso se evaluó la adsorción y la desorción de la bacteriocina a la pared celular de la cepa seleccionada según la sección II.3.3.ii. Luego de seleccionar el pH óptimo de adsorción y desorción se repitió el procedimiento por triplicado en dichas condiciones para asegurar su reproductibilidad, y estandarizar la purificación.

II.3.3.v Análisis de la temperatura y proporción bacteria-sobrenadante libre de células, para optimizar la extracción de bacteriocinas

En esta sección se optimizaron diferentes factores para lograr un mejor rendimiento de la purificación. Primero se evaluó la posibilidad de realizar el proceso de adsorción y desorción a 30 °C y no a 4 °C, ya que el proceso es dependiente de la temperatura. Luego, se evaluó la realización de dos ciclos de la purificación, utilizando la totalidad del SLC en cada ciclo o la mitad. Esto resultó de interés debido a que no se obtuvo una adsorción total de las bacteriocinas con la proporción SLC:bacterias utilizada originalmente. Según Yıldırım *et al.* (2002), la adsorción de las bacteriocinas a las células depende de receptores específicos y es posible que éstos lleguen a saturarse.

Las dos alternativas evaluadas se encuentran en la Figura II.8 y se detallan a continuación:

1. Realizar dos ciclos de purificación utilizando la totalidad del SLC (40 ml). Es decir, una vez realizada la primera purificación, el pellet fue lavado con buffer fosfato a pH 6,0, centrifugado a 6000 rpm por 6 minutos y la fracción no adsorbida del sobrenadante fue colocada nuevamente en contacto con el pellet y purificada.
2. Poner en contacto solo **la mitad** del SLC producido (20 ml) con la totalidad de las células productoras. Al finalizar la purificación, se puso en contacto la otra mitad del SLC con el pellet (ya utilizado y lavado con buffer pH 6,0) y se repitió el proceso de purificación, realizándose así dos ciclos de purificación, pero con la mitad del SLC cada vez.

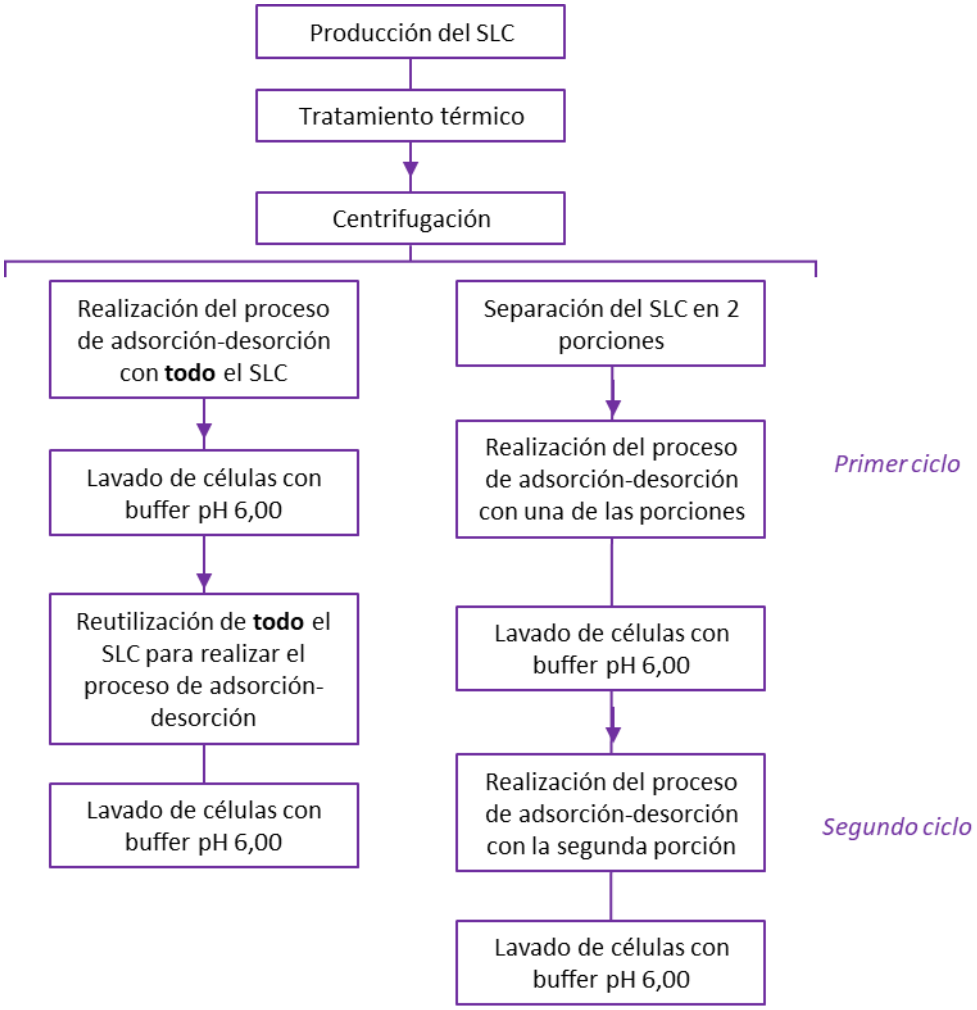


Figura II.8: Ensayos para evaluar la proporción SLC-pellet y la reutilización del pellet.

II.3.3.vi Técnica de Lowry para la cuantificación de proteínas

Con la finalidad de tener un seguimiento de la concentración de proteínas obtenidas en cada una de las etapas de la purificación, se decidió realizar la técnica de Lowry modificada según Peterson (1977). En primer lugar, se prepararon dos reactivos conformados de la siguiente manera:

Reactivo A:

- Solución 1: Carbonato sódico 2 % en solución de hidróxido de sodio 0,1 N
- Solución 2: Sulfato cúprico pentahidratado 1 % en agua
- Solución 3: Tartrato sódico potásico tetra hidratado 1 % en agua

Reactivo B:

- Solución de Folin-Ciocalteu 1:1 en agua

Al momento de realizar la determinación, se mezclaron las soluciones 1, 2 y 3 en proporciones 100:1:1 respectivamente para formar el reactivo A. Se adicionaron 100 µl de la

muestra y 100 µl de agua destilada a 1 ml del reactivo A. En el caso del blanco, se agregan 100 µl de agua destilada al reactivo A. Todas las muestras se agitaron en vortex y se incubaron por 20 minutos a 37 °C. Luego se agregaron 100 µl del reactivo B, nuevamente se agitó en vortex y se realizó la misma incubación. Se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 660 nm contra el blanco.

La curva de calibración se realizó utilizando como estándar albúmina de suero bovino disuelta en agua bidestilada. Se utilizaron concentraciones abarcando un rango comprendido entre 0 y 600 µg de proteína/ml. Los resultados se expresaron como concentración de proteínas y como masa total de proteínas (µg) según la ecuación II.1. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

II.3.4 Aplicación de las bacteriocinas semipurificadas en piezas de salmón rosado

Luego de obtener las bacteriocinas semipurificadas por medio de la técnica de adsorción en la pared celular, se aplicó dicha solución (ajustada a pH 6,0) por aspersión sobre piezas de salmón, con el objetivo de evaluar su efectividad para controlar la flora nativa del pescado y la población de *L. innocua.*

II.3.4.i Optimización de las condiciones de aplicación del pulverizador

Para aplicar el pulverizador de manera correcta, se debió decidir la distancia a la cual aplicarlo, de manera de obtener una cobertura homogénea de la pieza de salmón aplicando la cantidad mínima posible del producto, para evitar incorporar agua libre al recipiente. Para ello, se colocó en el pulverizador una solución acuosa de tinta azul, y se procedió a disparar el mismo a distancias de 5, 10 y 15 cm, y observar la dispersión de las gotas sobre papel adsorbente, teniendo en cuenta el tamaño de las piezas que se utilizarían (3 cm x 3 cm x 1 cm).

La aplicación del pulverizador se realizó 90° por encima del trozo y 45° en ambos bordes, manteniendo la distancia seleccionada anteriormente (Figura II.9). También se evaluó la cantidad de veces que se repetiría el proceso de las 3 pulverizaciones, permitiendo un tiempo de secado de 1 minuto entre cada ciclo de disparos. Se ensayó la posibilidad de disparar 1, 2, 3 o 4 veces el pulverizador de cada lado (en cada una de las 3 direcciones).

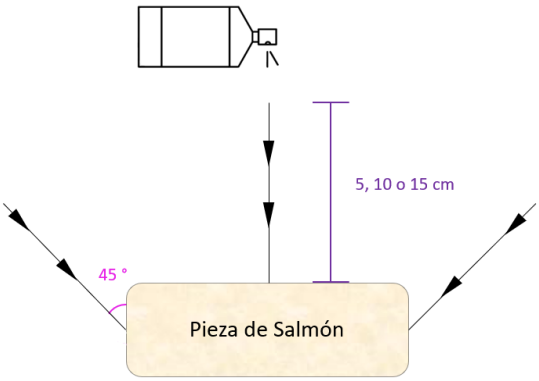


Figura II.9: Diagrama de pruebas de aplicación del aspersor sobre el filete de salmón

II.3.4.ii Preparación de las muestras

Para preparar las muestras, se partió de filetes de salmón fresco que llegaron al laboratorio cubiertos de hielo dentro de una conservadora. Inicialmente se les sacó la piel y una capa externa de 5 mm para disminuir la carga microbiológica, ya que en Argentina los filetes de salmón que se obtienen son importados desde Chile (SENASA, 2016) y no fue posible obtener filetes con una carga microbiana menor a 10^3 UFC/g. Posteriormente se procedió como en la Sección I.3.8.i en su lavado y se obtuvieron 9 piezas de salmón, con el objetivo de disponer de 3 tipos de muestras diferentes. La primera se sumergió en agua a pH 6,0 por 1,5 minutos, se le incorporó un inóculo de 10^4 UFC/ml de *L. innocua* ajustado según se indica en la sección 3.4.3 de MyM generales, se dejó secar por 2 minutos de cada lado y se pulverizó con la bacteriocina, a las condiciones óptimas de pulverizado, este tipo de muestra se denominó LB. El segundo tipo de muestra se sumergió en agua a pH 6,0 por el mismo tiempo, con agregado de un inóculo de 10^4 UFC/ml de *L. innocua* y se dejó secar, denominándose muestra L. El tercer tipo de muestra se sumergió en agua destilada a pH 6,0 por 1,5 minutos y luego se dejó secar por 2 minutos también de cada lado (muestra control, C). Cada una de las muestras se colocó en envases de polipropileno de 80 mm de diámetro, que se cerraron cuidadosamente y se almacenaron a 4 °C por 3 días (Figura II.10). Se tomaron muestras en el tiempo inicial, luego de 24 y 72 horas.

Figura II.10: trozo de salmón en envase de polipropileno para ser almacenado.

II.3.4.iii Masa de bacteriocina aplicada

Para estimar la masa de la bacteriocina aplicada a cada trozo de pescado, se volvieron a replicar las condiciones de preparación de las muestras L y LB con trozos nuevos de salmón. En este proceso, se incluyó la inmersión, el secado y la pulverización con sus correspondientes secados intermedios. Todos los trozos de salmón se pesaron luego de la inmersión y el primer secado (Masa A), y posteriormente luego de la aplicación de la totalidad de la pulverización y el tiempo de secado (Masa B). En el caso de los sistemas control, se les realizó la inmersión, y se dejaron secando durante el mismo tiempo que las muestras pulverizada, obteniéndose así, la masa perdida por secado (MPS). Para calcular la masa de bacteriocina por gramo de salmón, se procedió según la Ecuación II.4. Adicionalmente, también se calculó la masa total de bacteriocina por pieza de salmón.

$$Masa\ total = \frac{Masa\ B - Masa\ A + MPS^{*}}{Masa\ de\ salmón} \qquad \textit{Ecuación II.4}$$

**MPS: Masa perdida por secado.*

II.3.4.iv Análisis microbiológicos

Se realizó el recuento de bacterias aerobias mesófilas y de *Listeria* spp., según la sección 3.45 de MyM generales.

II.3.5 Análisis estadístico

Para analizar los datos se realizaron Análisis de la Varianza (ANOVA) de uno o dos factores, seguido por el test de Tukey para detectar diferencias significativas con un nivel de significancia de 0,05. A lo largo del capítulo de puede observar que los ensayos con dos letras representando diferencias significativas son, siempre, de dos factores; mientras que los ensayos que sólo poseen una letra se encuentran realizados a un solo factor.

II.4 Resultados y discusión

II.4.1 Selección de bacterias ácido lácticas para la purificación del sobrenadante libre de células

Para seleccionar que cepa productora del SLC más conveniente para purificar, fue necesario determinar cuál presentaba mejor actividad antagonista en condiciones óptimas de producción, y no en condiciones adversas (4 °C), como en el capítulo anterior. A 30 °C, ya se había realizado el título de todas las cepas, pero debido a su similitud, no fue posible seleccionar ninguna (sección I.3.4.iv), por lo cual se decidió realizar más ensayos para lograr diferenciar adecuadamente la cepa más apta para purificar su SLC.

En una primera etapa, se evaluó la actividad antagonista de los SLC utilizados en concentraciones subinhibitorias y una concentración de 10^4 UFC/ml de *L. innocua*. Las diluciones del SLC utilizadas fueron de 512^{-1} y 1024^{-1}. En este caso se midió la turbidez a lo largo de 92 horas y se marcó como positivo cuando la misma superaba los 2 grados McFarland ($6x10^6$ UFC/ml). En la Tabla II.4 se puede observar el tiempo en horas en el que se detectó crecimiento de la cepa indicadora. Las tres cepas que inhibieron el desarrollo de *L. innocua* por más tiempo fueron las STw26, 46 y 66.

Tabla II.4 Tiempo en horas al que comienza el crecimiento de L. innocua en presencia de concentraciones subinhibitorias del SLC de todas las BAL seleccionadas

Cepa	Dilución	
	512^{-1}	1024^{-1}
STw 26	**> 92***	**> 92**
STw38	> 92	53
STw46	**> 92**	**> 92**
STw60	92	70
STw66	**> 92**	**> 92**
STw79	70	53

Los resultados **destacados son los que ralentizaron por más tiempo a ambas concentraciones del SLC el desarrollo de L. innocua*

Posteriormente, se evaluó la actividad de las cepas STw26, STw46 y STw66 sobre la flora nativa aislada de pescado. El título obtenido por la cepa STw66 fue de 16^{-1} mientras que el

de la cepa STw46 fue de tan solo 4^{-1} y de 8^{-1} para la cepa STw26. Los halos obtenidos para la cepa STw66 se pueden observar en la Figura II.11.

Figura II.11: Título de E. mundtii STw66 contra la flora deteriorativa del pescado.

En base a los resultados comentados, se seleccionó a la cepa STw66 ya que además de estar entre los SLC que mejor pudieron controlar el crecimiento de *L. innocua* a concentraciones subinhibitorias, obtuvo el mayor título contra la flora nativa.

En esta sección fue posible seleccionar a la cepa E. mundtii STw66 por ser la más promisoria debido a su acción sobre la flora nativa presente en pescado, así como por su acción inhibitoria sobre L. innocua.

II.4.2 Purificación parcial del sobrenadante libre de células de la cepa seleccionada por medio de una columna de interacción hidrofóbica y un cartucho de extracción en fase sólida

II.4.2.i Estabilidad de las bacteriocinas en presencia de diferentes solventes y a pH 2,0

Dado que en el proceso de purificación se utilizan diferentes solventes, el primer paso fue estudiar la estabilidad de las bacteriocinas al estar en contacto con ellos. Para esto se realizó una solución que contenía un 10 % de SLC y un 90 % de la concentración de solvente deseada, se lo dejó incubar y posteriormente se evaluó la actividad remanente contra *L. innocua* por medio de la TG.

El SLC resultó estable luego de estar en contacto con una solución de isopropanol 70 % v/v a pH 3 por al menos 7 horas, pero perdió actividad luego de 2 horas en contacto con concentraciones de isopropanol mayores al 80 %. Además, el SLC mostró estabilidad frente a concentraciones de acetonitrilo de hasta un 60 % por hasta 7 horas.

En el caso del pH, se observó que al exponer el SLC a una solución de isopropanol al 70 % con pH 2,0, su actividad antagonista se mantuvo únicamente por 2 horas, luego de lo cual, la actividad comenzó a disminuir.

Conociendo estas limitaciones, fue posible establecer un rango de uso de solventes siendo éstos:

- concentraciones de isopropanol menores a un 80% a pH 3,0
- concentraciones de acetonitrilo menores a un 60 % a pH 6,0

En cuanto al pH, al resistir la bacteriocina únicamente por 2 horas a pH 2,0, se decidió no utilizar éste para asegurar su estabilidad. Excepcionalmente, en el análisis por medio de cromatografía líquida AKTA, se utilizaron concentraciones de acetonitrilo hasta un 90% ya que el objetivo fue conocer el perfil peptídico de la muestra, y no era necesario conservar la actividad de las bacteriocinas para cumplirlo.

II.4.2.ii Purificación en una columna de interacción hidrofóbica

La primera etapa de la purificación se realizó por medio de una columna rellena con resina de interacción hidrofóbica. A partir de esta etapa, fue posible obtener una purificación parcial de la bacteriocina. También fue posible validar la reproducibilidad de la técnica. A continuación, se detallan los resultados de cada una de las técnicas utilizadas para realizar el seguimiento de la purificación.

En primer lugar, el perfil cromatográfico se determinó tomando muestras de la columna luego de agregar el SLC. Desde ese momento, se recolectaron consecutivamente alícuotas de 5 ml en tubos de ensayo (Figura II.12), y se midió la absorbancia de cada una de ellas a 290 nm.

Figura II.12: Alícuotas eluidas de la columna separadas en fracciones de 5 ml.

En un proceso de purificación de péptidos esto es necesario para poder determinar en qué fracciones se puede encontrar el compuesto a purificar, y lograr una separación de las fracciones con una composición estable (Tulini, 2011). En la Figura II.13 se pueden observar los perfiles cromatográficos obtenidos. Debido a la similitud entre las curvas obtenidas para ambas replicas, se puedo concluir que el proceso de purificación fue reproducible.

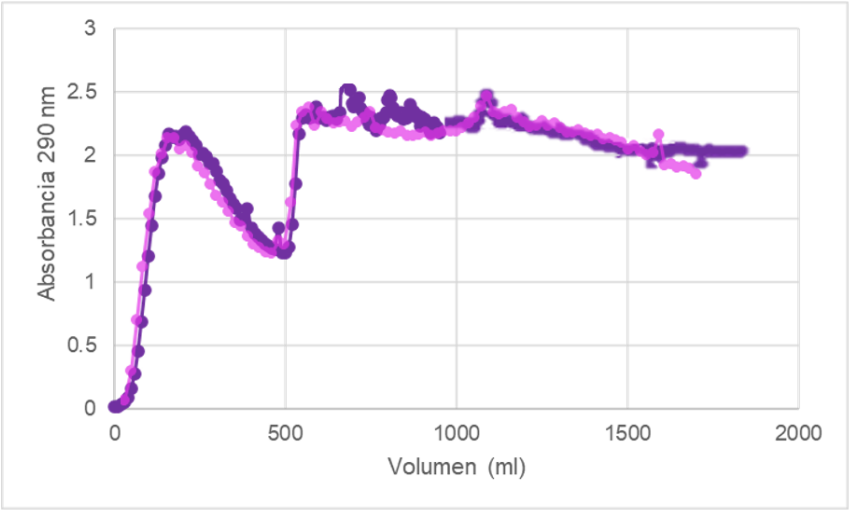


Figura II.13: Réplicas del perfil cromatográfico de la columna de purificación. Cada una de las líneas representan dos réplicas diferentes del proceso de purificación por medio de la columna de interacción hidrofóbica.

Por medio de la TG, se evaluó la actividad antagonista contra *L. innocua* de todas las fracciones de 5 ml eluidas de la columna luego de aplicar el SLC, es decir, las fracciones de etanol 20 % e isopropanol 70 % a pH 3. En la Figura II.14 se pueden observar algunos halos de inhibición obtenidos.

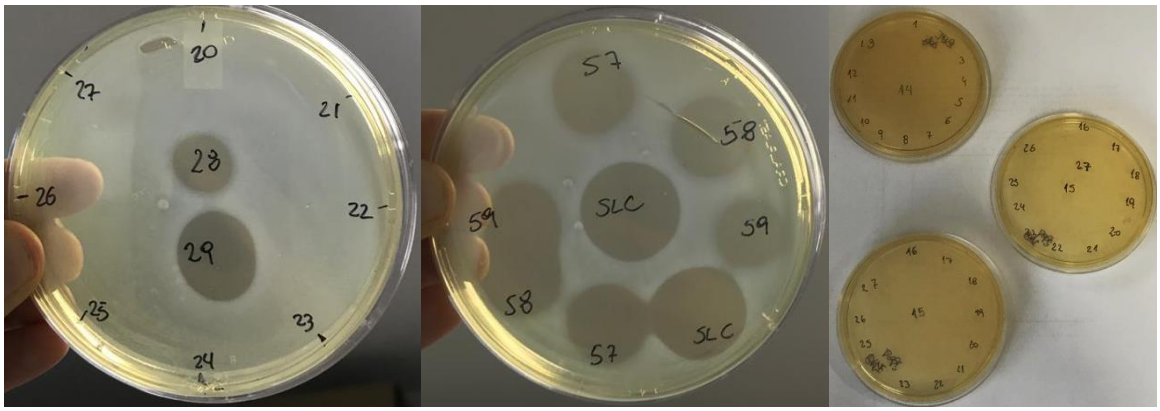


Figura II.14: Actividad antagonista de las fracciones eluidas de la columna de interacción hidrofóbica contra L. innocua.

Las fracciones que presentaron actividad antagonista fueron las que correspondían a las muestras entre la 28 y la 77 de isopropanol al 70 % a pH 3, es decir, entre los 145 y los 385 ml de elución del isopropanol (240 ml). Es interesante destacar, que el volumen eluido que corresponde a la fracción de isopropanol con actividad está relacionado con los picos de absorbancia en el perfil cromatográfico entre los 620 y los 860 ml del volumen total eluido. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Hu, *et al.* (2019) quienes realizaron una semipurificación con la misma columna, y lograron eluir las bacteriocinas de *C. maltaromaticum* con una solución de isopropanol 70 % ajustada a pH 2,0.

Luego de detectar las fracciones con actividad antagonista, todas ellas se unificaron, obteniéndose un extracto evaporado de 60 ml, con un título de 128^{-1} (siendo la actividad antagonista original del SLC de 256^{-1} y su volumen 136 ml). En este caso, se puede observar la pérdida de actividad, ya que se obtuvo un menor volumen con menor actividad antagonista que el SLC. En el proceso de purificación de las bacteriocinas, es esperable que se produzca una pérdida de actividad de los extractos semipurificados (Leite *et al.,* 2016).

Por otra parte, en el gel de poliacrilamida, teñido con plata, se observó cómo se fue modificando el perfil peptídico de las diferentes fracciones eluídas, conforme se aplicaron los diferentes solventes (Figura II.15). En la fracción de agua, la concentración de proteínas fue muy baja ya que apenas se observan bandas, al igual que en la fracción eluida con

isopropanol 70 % que no poseía actividad antagonista. Contrariamente, en la fracción de elución con etanol, es posible observar la presencia de varias bandas oscuras, indicando la presencia de compuestos contaminantes, el efecto de arrastre que se observa es característico de una elevada concentración de azúcares. Finalmente, se pudo observar una alta concentración de péptidos en la última banda, es decir la de isopropanol 70 % con actividad antagonista. Esta fracción fue la seleccionada para continuar con la purificación. En la misma, se observa una banda masiva y ancha, la cual demuestra que, en esta etapa, no se logró obtener una purificación total de las bacteriocinas, aunque se obtuvieron péptidos con un peso molecular cercano.

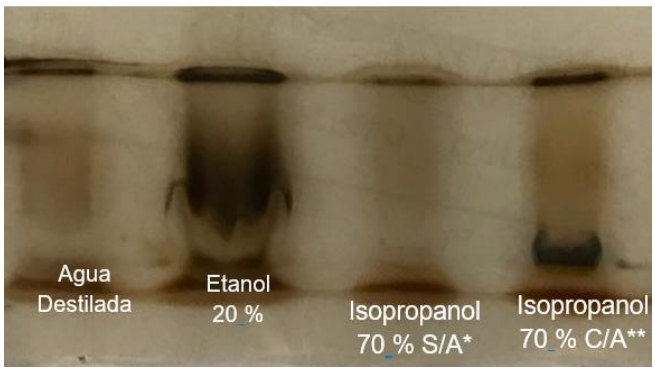


*Figura II.15: Gel de poliacrilamida de las fracciones eluídas de la columna de intercambio iónico. *Fracción Sin actividad antagonista. **Fracción con actividad antagonista.*

En la Tabla II.5 se muestra la concentración de proteínas de cada una de las fracciones eluídas y su relación con la concentración proteica total del SLC. En las fracciones sin actividad fue posible eluir un 19,8 % de la masa total de proteínas presentes en el SLC. En la fracción de isopropanol con actividad antagonista se obtuvo la mayor concentración de péptidos, lo cual no fue un resultado deseado, ya que se demuestra que la mayoría de ellos se liberaron de la columna de interacción hidrofóbica con el mismo solvente que la bacteriocina. La purificación en la columna no tuvo la especificidad requerida para separar las bacteriocinas, comprobándose lo observado en el gel, que, por medio de esta etapa de purificación, sólo se obtuvo una purificación parcial. Se decidió realizar una cromatografía líquida de la fracción con actividad antagonista, para obtener más información del perfil peptídico obtenido, y evaluar si era posible lograr, al menos, una separación parcial de alguno de los compuestos de interés.

Tabla II.5: Concentración de proteínas y masa total de proteínas de las fracciones eluidas de la columna de interacción hidrofóbica, y SLC por medio de la técnica de Bradford.

Fracción	Volumen eluido (ml)	Concentración de proteínas (µg/ml)	Masa total de proteínas (µg)
SLC	136	31,25 ± 0,44[a]	4250 ± 0,543[a]
Isopropanol C/A*	240	6,5 ± 0,02[b]	1558,8 ± 0,02[b]
Isopropanol S/A **	360	2,25 ± 0,20[c]	810 ± 3,20[c]
Etanol	300	2,12 ± 0,21[c]	634,5 ± 3,12[d]
Isopropanol evaporado***	60	25,98 ± 2,02	1558,8 ± 0,08[b]

*C/A = Con actividad antagonista **S/A = Sin actividad antagonista ***Fracción C/A luego de su evaporación.

II.4.2.iii Determinación del perfil proteico en cromatografía líquida AKTA

Por medio de una cromatografía en fase líquida AKTA, la cual es específica para caracterización de proteínas, se evaluó el perfil proteico de la fracción con actividad antagonista. El resultado se puede observar en la Figura II.16 donde se aprecia un pico masivo, de gran superficie a concentraciones de acetonitrilo desde un 10 % hasta un 60 %.

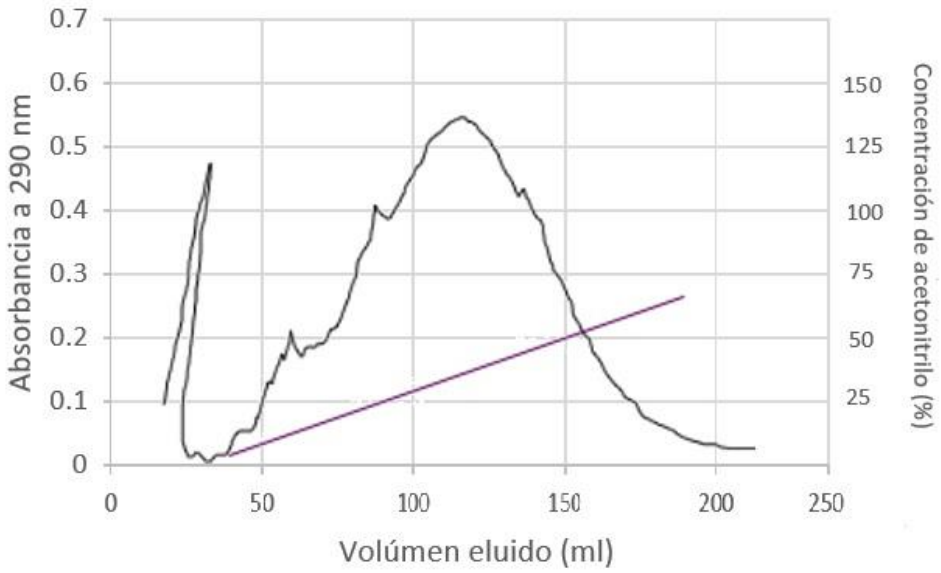


Figura II.16: Perfil cromatográfico de la fracción de isopropanol 70 % con actividad obtenida de la columna de interacción hidrofóbica. – absorbancia a 290 nm; – concentración de acetonitrilo.

La existencia del pico masivo, indica que en la muestra existen muchos péptidos con diferente afinidad por la columna. Dado que no se obtuvieron picos distintivos (como el que representa el estándar al comienzo del gráfico), no fue posible identificar alguno relacionado

con la bacteriocina y por ende continuar la purificación por medio de esta técnica. Estos resultados indican que, efectivamente, la banda que se observaba en el gel de poliacrilamida no correspondía a un único compuesto, por lo cual se decidió continuar con el proceso de purificación, utilizando un cartucho de extracción en fase sólida.

II.4.2.iv Purificación en un cartucho de extracción en fase sólida

Para continuar con la purificación se utilizó el cartucho de extracción en fase sólida MEGA BOND ELUT C18 10 g, 60 ml Varian EVA**.** En el cartucho se aplicaron 10 ml de la fracción con actividad inhibitoria obtenida en la columna, luego de evaporar el solvente, y se obtuvieron 10 ml de fracción con actividad antagonista contra *L. innocua* en isopropanol 70 %. Se pudo comprobar que el único solvente capaz de eluir compuestos con actividad antimicrobiana fue el isopropanol 70 %. El título de esta fracción fue de 16^{-1}, lo cual indica una pérdida de actividad, dado que la actividad del SLC de partida fue de 256^{-1}. Estos resultados se encuentran en línea con los observados por Vera Pingitore, *et al.* (2007) quienes indican que en cartuchos de extracción de fase sólida las bacteriocinas se suelen eluir a concentraciones de isopropanol comprendidas entre 20 y 80 %.

Los resultados de la electroforesis llevada a cabo en geles de poliacrilamida se encuentran en la Figura II.17. En esta instancia, fue posible observar, por un lado, la elevada concentración de proteínas de la fracción de isopropanol al 20 %, indicando que muchos de los contaminantes del SLC fueron eliminados en esta etapa. Adicionalmente, la fracción de isopropanol 70 % posee una banda bien distintiva, lo cual sería indicativo de una adecuada purificación de alguna de las bacteriocinas presentes en la muestra.

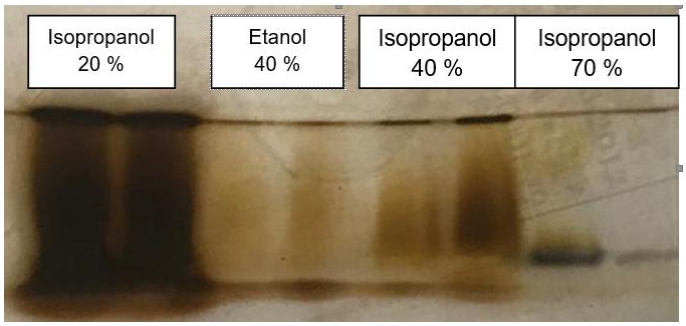


Figura II.17: *Gel de poliacrilamida de las fracciones eluídas del cartucho de extracción en fase sólida.*

Cada una de las fracciones eluídas del cartucho de extracción en fase sólida presentó diferentes concentraciones de proteínas (Tabla II.6). En la fracción isopropanol al 20 % y la de agua se eluyeron la mayoría de las proteínas, seguido por la fracción de isopropanol al

40 %. Esto indicaría que la mayoría de los compuestos peptídicos presentes en la muestra no demostraron una alta afinidad al cartucho. Finalmente, en la fracción de isopropanol al 40% y al 70 % se observó una concentración de proteínas menor. A diferencia de lo sucedido en la columna de interacción hidrofóbica, en este caso, una de las fracciones con la menor concentración de proteínas fue la que presentó actividad antagonista indicando una mayor especificidad de esta técnica, como era esperado (Sección II.1.4.ii).

Tabla II.6: Concentración de proteínas de las fracciones eluidas del cartucho de interacción en fase sólida

Fracción de elución	Volumen total (ml)	Concentración de proteínas (µg/ml)	Masa total de proteínas (µg)
Isopropanol evap*	10	25,98 ± 2,02^{d}	259,80 ± 2,08^{a}
Agua	10	7,90 ± 2,73^{a}	79,04 ± 5,11^{b}
Etanol 40 %	10	2,32 ± 1,81^{b}	23,21 ± 7,18^{c}
Isopropanol 20 %	10	9,80 ± 2,60^{a}	98,04 ± 3,94^{d}
Isopropanol 40 %	10	4,14 ± 1,03^{c}	41,40 ± 1,48^{e}
Isopropanol 70 %	10	3,94 ± 1,16^{c}	39,37 ± 1,90^{e}

**Fracción de isopropanol C/A obtenido de la columna de interacción hidrofóbica*

II.4.2.v Tabla de purificación

La Tabla II.7 muestra el rendimiento de la purificación del SLC realizada por medio de la columna de interacción hidrofóbica y del cartucho de extracción en fase sólida.

Tabla II.7: Purificación de proteínas del proceso de purificación completo.

Etapa	Volumen Total (ml)	Masa total de Proteínas (µg)	UA actividad	Actividad específica (U/µg)	Masa de Proteínas remanente (%)	Actividad remanente (%)	Factor de purificación
SLC	136	4250	3481600	819	100,00	100,00	1,00
XAD 16*	60	1559	768000	493	36,68	22,10	0,60
Cartucho	10	39	16000	406	0,92	0,45	0,49

Se puede observar que en la primera etapa de purificación la actividad remanente fue de un 22,1 % en comparación con el SLC. Observando la actividad específica (actividad/µg de proteína), ésta se redujo a aproximadamente la mitad en la primera etapa de purificación, indicando que existió una pérdida de actividad relativa y, también, una menor actividad por µg de proteína, lo cual no es deseado. Esto se refleja en las proteínas remanentes en esta etapa de purificación, que alcanzan un 36,68 %, siendo este porcentaje mayor a la actividad

remanente (22,1 %). Es decir, que existió una disminución mayor en la actividad antagonista que en la cantidad de proteínas. En cuanto al factor de purificación (relación entre las actividades específicas), éste disminuyó en un 40 %. Cintas *et al.* (2000) obtuvieron un rendimiento de un 70 % al purificar la enterocina P, y un 44 % al purificar la enterocina Q, dichos valores son cercanos a los obtenidos en la presente purificación con la columna de interacción hidrofóbica. De estos resultados se observa que la especificidad de la columna de adsorción hidrofóbica dependerá de la bacteriocina a ser purificada.

En el caso de la segunda etapa de purificación con el cartucho de extracción en fase sólida, existió una disminución mucho mayor de la actividad antagonista de la fracción purificada, pero también hubo una disminución significativa en la masa total de proteínas. La actividad antagonista remanente fue de un 0,45 % respecto al SLC. Estos resultados son menores que los obtenidos por Vera Pingitore *et al.* (2007) al purificar la salivaricina CRL35 por medio de una primera etapa de adsorción por pH y una segunda etapa de extracción con el mismo cartucho de extracción en fase sólida. En dicho ensayo, obtuvieron una actividad remanente de 7,3 % en comparación con el SLC luego de la purificación en el cartucho. Esta diferencia puede deberse a la diferencia en la primera etapa de purificación o bien a la naturaleza de la salivaricina CRL35.

El factor de purificación obtenido fue de 0,49, y el mismo de acuerdo con bibliografía puede variar entre un 0,70 como máximo, y valores mínimos tan bajos como 0,08, al utilizar un cartucho de extracción en fase sólida (De Kwaadsteniet *et al.,* 2005; Todorov y Dicks, 2007; Mota-Meira, 1997). De esta manera, el factor de purificación obtenido es muy similar al obtenido en la etapa de purificación por medio de la columna, indicando que no fue posible obtener una mejor actividad por unidad de proteína presente, aunque las proteínas presentes en la fracción semipurificada del cartucho sí hayan disminuido significativamente. La masa total de proteínas disminuyó siguiendo una proporción casi lineal con la actividad. Todos los resultados mencionados anteriormente, indican un bajo rendimiento de esta técnica de purificación ya que en cada etapa se perdió más actividad antagonista que las proteínas que se separaban en la fracción semipurificada.

II.4.2.vi Estimación del peso molecular de la bacteriocina

Para determinar el peso molecular de las bacteriocinas se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en el cual se sembró el SLC concentrado 5 veces, por duplicado y el marcador de peso molecular. El gel en el que se ensayó la actividad antimicrobiana fue cortado de manera tal que coincida con la posición de las bandas en el gel teñido con plata. En la Figura II.18 se observan los resultados de la actividad antagonista de las diferentes

porciones de gel y su adecuada correlación con las bandas. La parte que contiene actividad antimicrobiana contra *L. innocua* en el gel se evidenció por mostrar una zona translúcida.

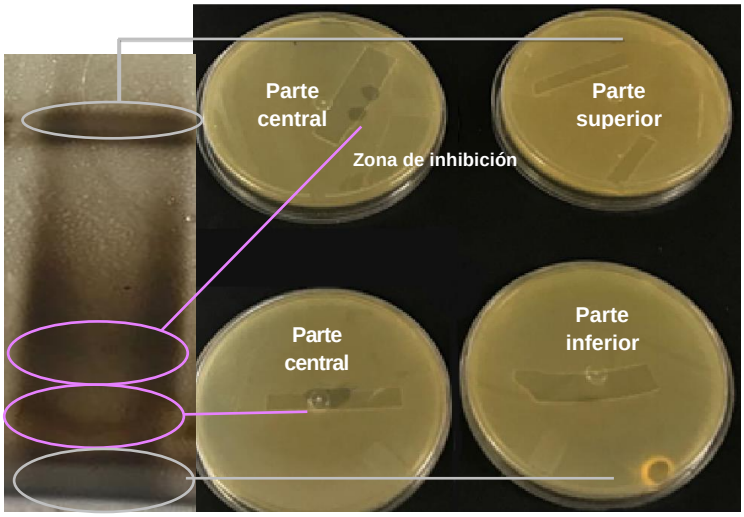


Figura II.18: Secciones del gel con actividad antagonista contra L. innocua y su correlación con la posición de las bandas del gel de acrilamida sujeto a tinción con plata. Los rectángulos son las fracciones del gel, y las zonas translúcidas las que presentaron inhibición.

La comparación entre la posición de las bandas y su peso molecular se puede observar en la Figura II.19.

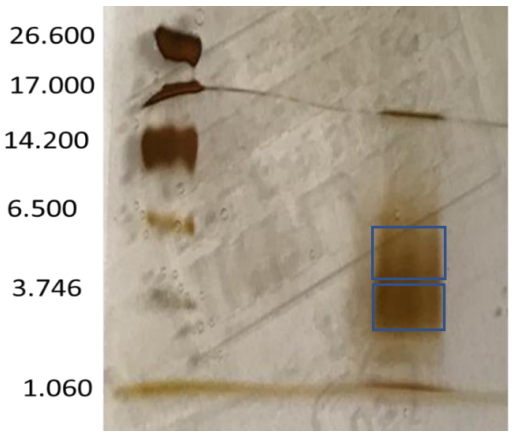


Figura II.19: Tamaño aproximado de las bacteriocinas presentes en el SLC de E. mundtii STw66. Las zonas demarcadas en azul son las que presentaron actividad, correspondientes a las fracciones de los geles.

El peso molecular de las bacteriocinas se encontró en un rango entre los 3000 y los 6000 Da, lo cual se encuentra en línea con lo obtenido por Izquierdo *et al.* (2008) que determinaron la masa de la enterocina L50A y de la enterocina Q, obteniendo valores de 5150 y 3980 Da, respectivamente. Adicionalmente, según Aguilar-Galvez, *et al.* (2011), el

peso molecular de la mundticina KS es de 4289,44 Da. Esto demuestra que en el rango de pesos moleculares en los cuales efectivamente se obtuvo actividad en el gel es posible que se encuentren presentes las dos bacteriocinas cuyos genes se detectaron por PCR en la sección I.4.4.1. No obstante, al ser los enterococos fuente constante de descubrimiento de nuevas bacteriocinas éstas podrían no ser las únicas producidas por la cepa analizada (Gao *et al.,* 2016; Phumisantiphong *et al.,* 2017; Qiao *et al.,* 2020; Vasilchenko *et al.,* 2018).

Se obtuvo un producto semipurificado conteniendo las bacteriocinas producidas por la cepa seleccionada E. mundtii STw66 utilizando una columna de interacción hidrofóbica y un cartucho de extracción en fase sólida lográndose un factor de purificación de 0,49. Fue posible estimar el peso molecular de las bacteriocinas, entre 3000 y 6000 Da.

II.4.3 Purificación parcial por medio de la técnica de adsorción desorción

II.4.3.i Evaluación preliminar del pH de adsorción

La técnica de purificación por adsorción-desorción se basa en la afinidad que tienen las bacteriocinas, a determinados pH, por la pared celular de bacterias. Para llevarla a cabo, en primer lugar, se realizó una prueba preliminar, para conocer a qué pH se obtenía un mínimo de actividad del SLC luego de dejarlo en contacto con el cultivo bacteriano a 4 °C por 1 hora. Este SLC representa las bacteriocinas no adsorbidas a la pared celular, por lo cual, se desea que su actividad sea mínima. Los cálculos del porcentaje de bacteriocina no adsorbida se realizaron utilizando la ecuación II.3 (sección II.3.2.i.a). En la Tabla II.8 se encuentran los resultados de esta determinación. A pH 5,5 no existió adsorción de las bacteriocinas y a pHs superiores a 7,0 se observó una disminución de la afinidad de la bacteriocina por la pared celular. Los valores se encuentran en línea con diversas publicaciones sobre purificación, ya que, si bien el pH óptimo de adsorción de cada bacteriocina depende de la cepa utilizada, existe una tendencia a la obtención de una mayor retención a pH cercanos a la neutralidad. Por ejemplo, Lyon, *et al.* (1995), quienes purificaron la enterocina EL1 aplicando la misma técnica, observaron una mejor adsorción a un pH de 6,5. Esta tendencia es coincidente con la menor actividad en el sobrenadante obtenida a los valores de pH 6,0, 6,5, y 7,0, no observándose además diferencias significativas entre ellos. Es por esta razón, que estos valores se seleccionaron para seguir optimizando la purificación.

Tabla II.8: Porcentaje de retención de bacteriocinas a la pared celular de células productoras a diferentes pH.

pH/ sistema	Bacteriocina no adsorbida (%)
CI*	0
CII	100,0 ± 7,2[a]
5,5	100,0 ± 11,2[a]
6,0	**50,0 ± 7,3[b]**
6,5**	**31,3 ± 5,5[b]**
7,0	**35,1 ± 4,6[b]**
7,5	41,6 ± 5,0[b]
8,0	62,0 ± 4,8 [c]

**CI representa el control negativo, sin presencia de SLC, y el CII representa el control positivo: el SLC sin presencia de las bacterias. **los resultados destacados muestran las condiciones de pH de adsorción óptimas seleccionadas.*

Si bien es posible observar que a pH 7,5 se obtiene un valor similar a los obtenidos a pH 6,0, 6,5 y 7,0 se decidió no trabajar con este valor de pH ya que la estabilidad de las bacteriocinas a pH más alcalinos disminuye, tal como se mencionó anteriormente.

1.4.3.ii Selección del pH de adsorción y desorción

Para lograr resultados exitosos mediante esta técnica no sólo es importante obtener una adsorción adecuada a la pared celular, sino que también, es necesario obtener una desorción óptima. Es por ello que se analizaron 3 valores de pH diferentes de desorción, combinados a los pH seleccionados de adsorción (6,0; 6,5 y 7,0). Los valores de pH de desorción fueron 2,0, 2,5 y 3,0. En la Tabla II.9 se puede observar que a pH 7,0 la actividad remanente de la Alícuota Ads. fue menor, lo cual indica una mejor adsorción de la bacteriocina a la pared celular. En este pH de adsorción, al desorber las bacteriocinas a pH 3,0 se obtuvo el mejor título, 128^{-1} (Alícuota Des.), por lo cual es más eficiente tanto el proceso de adsorción como el de desorción. Esta mejora puede deberse a que la bacteriocina tenga una mayor afinidad por las células productoras a pH 7,0, y luego la pierda más fácilmente al ser desorbida a pH 3,0.

Tabla II.9: Título de las diferentes alícuotas procedentes de la adsorción y desorción de las bacteriocinas a las células

pH Adsorción	6,0			6,5			7,0		
pH Desorción	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	3,0	2,0	2,5	**3,0***
Alícuota Ads.	128^{-1}	128^{-1}	64^{-1}	128^{-1}	64^{-1}	64^{-1}	64^{-1}	64^{-1}	**32^{-1}**
1° Lavado	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2° Lavado	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alícuota Des.	32^{-1}	64^{-1}	64^{-1}	64^{-1}	64^{-1}	64^{-1}	64^{-1}	64^{-1}	**128^{-1}**

los valores **destacados corresponden a las condiciones seleccionadas de purificación*

Para todos los pH de adsorción, se observa que a un pH de desorción de 2,0 no se obtienen mejores resultados que a 2,5 o 3,0. Resulta de interés destacar que en la sección II.4.2.i se evaluó la estabilidad del SLC a pH ácido, y su estabilidad era óptima hasta un pH de 3,0, mientras que a un pH de 2,0 la misma perdía su actividad luego de 2 horas. Este pH se probó igualmente ya que, si éste hubiera sido el pH óptimo de desorción hubiera sido posible alcalinizarlo inmediatamente después de la desorción y prevenir la pérdida de actividad.

Finalmente, las soluciones buffer utilizadas para el lavado, luego de la adsorción y posterior separación del SLC (L_1 y L_2), no presentaron actividad antagonista contra *L. innocua.* Esto indica que la bacteriocina forma una unión suficientemente fuerte a la pared celular como para poder soportar el lavado, y al no existir actividad luego del segundo lavado, implica una

desorción adecuada y altamente efectiva de las bacteriocinas adheridas a la pared celular. Según los resultados obtenidos se decidió elegir el pH 7,0 para la adsorción y el pH 3,0 para la desorción de las bacteriocinas. En la Figura II.20 se pueden observar los títulos obtenidos en cada alícuota a los pH seleccionados de adsorción y desorción.

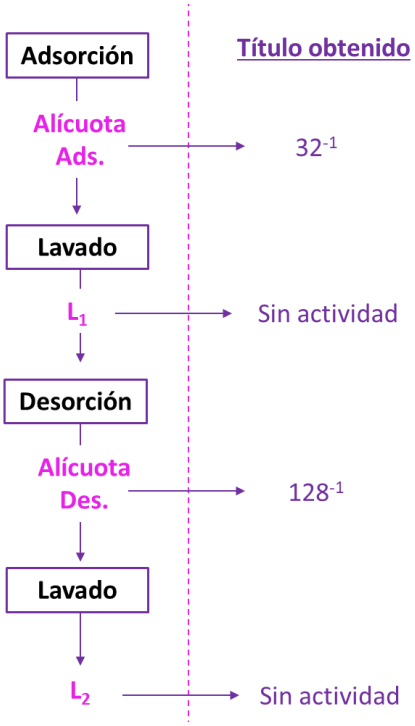


Figura II.20: Título de cada una de las alícuotas de la técnica de adsorción-desorción a los pHs seleccionados.

II.4.3.ii Elección de la temperatura y proporción del sobrenadante libre de células:bacterias

En esta etapa, se evaluó la realización del proceso de adsorción a 30 °C en lugar de a 4 °C, la posibilidad de recircular el mismo SLC original sobre las bacterias al terminar la primera purificación y la opción de realizar la purificación del SLC en dos ciclos, utilizando la mitad del SLC cada vez. En la Tabla II.10 se pueden observar los resultados de estas diferentes alternativas.

Tabla II.10: Resultados de variaciones sobre la técnica de adsorción-desorción en la purificación de las bacteriocinas

	Control	Adsorción a 30 °C	Doble paso SLC		50 % SLC por ciclo	
			1°	2°	1°	2°
Alícuota Ads.	32^{-1}	128^{-1}	32^{-1}	64^{-1}	32^{-1}	32^{-1}
Alícuota Des.	128^{-1}	32^{-1}	128^{-1}	64^{-1}	128^{-1}	128^{-1}

Para evaluar la dependencia del proceso con la temperatura, se utilizó una temperatura más cercana al ambiente (30 °C) ya que la temperatura óptima de adsorción depende de la cepa. El proceso de adsorción fue menos efectivo a esta temperatura obteniéndose un título de la Alícuota Ads. de 128^{-1} en comparación al control que fue de 32^{-1}. El efecto de la temperatura en la adsorción dependerá de la bacteriocina a ser adsorbida y de la bacteria utilizada. Elegado *et al.* (1997) lograron una purificación óptima de pediocina a temperatura ambiente, mientras que en el caso de Yıldırım, *et al.* (2002) la temperatura no afectó el proceso de purificación de buchnericina LB. Finalmente, Todorov *et al.* (2008) observaron que sí existía una diferencia en la adsorción de las bacteriocinas producidas por *L. plantarum* AMA-K, ya que a 45 °C se verificaba una mejora con respecto a los resultados obtenidos a 25 °C. Adicionalmente, observaron que la temperatura óptima dependió de la cepa de *Listeria* sobre la cual se adsorbió la bacteriocina.

Al realizar dos veces la purificación de la totalidad del SLC (Doble paso SLC), fue posible continuar extrayendo bacteriocina del SLC en el segundo proceso, pero la dilución que se obtiene en la desorción de la bacteriocina (Alícuota Des.) en el segundo ciclo es de 64^{-1}, la mitad que en el primero. Adicionalmente la capacidad de adsorción en el segundo ciclo, demostró ser menos eficiente que el control.

En el caso de repetir el proceso dos veces con la mitad de la cantidad del SLC utilizando inicialmente y la totalidad de las células productoras (50 % de SLC por ciclo), se obtuvo un título en la alícuota Des. en ambos ciclos de 128^{-1}, al igual que el control (Tabla II.10). De esta manera, con una dada cantidad de SLC producido, se obtuvo el doble de volumen de bacteriocinas semipurificadas, presentando cada alícuota la misma actividad antagonista que el control. En cuanto a la alícuota Ads. esta presentó el mismo título que el control en ambos ciclos.

A partir de los resultados expuestos, es posible inferir que, además de las bacteriocinas, existen otros compuestos presentes en el SLC que poseen afinidad por la pared celular de

las bacterias, ya que al realizar el proceso dos veces con el total del SLC y de las bacterias, en el segundo ciclo disminuye la adsorción, y la fracción purificada posee un título menor en el segundo ciclo. Por otra parte, al disminuir la cantidad de SLC (50 % SLC por ciclo), se observó una solución final con el mismo título frente a *L. innocua* que utilizando todo el SLC. Estos resultados pueden indicar una unión irreversible de algún compuesto a la pared celular que inhiba la adsorción de las bacteriocinas en el segundo ciclo al utilizar la totalidad del SLC dos veces. Al disminuir la cantidad de SLC, se favoreció la adsorción de las bacteriocinas en el segundo ciclo de purificación y su capacidad de ser liberada se mantuvo.

En todos los ensayos se observó una adsorción parcial de las bacteriocinas a la pared celular y nunca fue posible adsorber la totalidad. Esto podría deberse a la presencia de dos bacteriocinas presentes en el SLC, y que solamente una de ellas tenga afinidad por la pared celular en las condiciones ensayadas. Este resultado se encuentra en línea con lo identificado por PCR y con los resultados de la determinación del tamaño de las bacteriocinas, ya que en el mismo se observó un área de actividad extensa en el gel, y no puntual como sería si la actividad se debiera a un único compuesto (secciones I.4.4.1 y II.4.2.vi).

En base a los resultados comentados, se optó por realizar el proceso a 4 °C y purificar el 50 % del SLC en 2 ciclos para continuar los ensayos.

II.4.3.iii Concentración de proteínas en cada etapa de la purificación y tabla de purificación

Las proteínas presentes en la muestra fueron únicamente evaluadas para la técnica de adsorción-desorción más eficiente, es decir, en la que se pasaba un 50 % del SLC sobre el total de las células bacterianas en un proceso de dos ciclos. En este proceso se obtuvieron 4 ml de solución de NaCl con un título de 128^{-1} (Alícuota Des.). En la Tabla II.11 se puede observar la concentración de proteínas de las diferentes alícuotas y del SLC calculados por medio de la técnica de Lowry.

Tabla II.11: Concentración de proteínas en cada etapa de la purificación por adsorción-desorción (utilizando la técnica de Lowry).

	Volumen	Concentración de proteínas (µg /ml)	Masa total de proteínas (µg)
SLC	20	$23,1 \pm 0,14^{aA**}$	$462 \pm 0,59^{aA}$
Primer ciclo de purificación			
Alícuota Ads*	20	$21,84 \pm 0,52^{aA}$	$436,8 \pm 0,67^{bA}$
Alícuota L_1	6	$8,68 \pm 0,42^{bA}$	$52,08 \pm 0,78^{cA}$
Alícuota Des.	2	$7,57 \pm 0,11^{bA}$	$15,14 \pm 1,89^{dA}$
Alícuota L_2	6	$9,34 \pm 0,10^{bA}$	$56,04 \pm 0,78^{eA}$
Segundo ciclo de purificación			
Alícuota Ads	20	$22,87 \pm 0,61^{aA}$	$457,40 \pm 0,73^{bA****}$
Alícuota L_1	6	$4,34 \pm 0,61^{bB}$	$26,04 \pm 0,62^{bB}$
Alícuota Des.	2	$7,57 \pm 0,73^{cA}$	$15,14 \pm 1,96^{cA}$
Alícuota L_2	6	$7,43 \pm 0,31^{cB}$	$44,58 \pm 0,66^{cB}$
NaCl***	4	$15,14 \pm 0,18$	$30,28 \pm 0,95$

Los resultados indican la concentración de proteínas obtenida de cada una de las 4 etapas de la purificación de la (Figura II.6), para ambos ciclos de purificación; **las letras en minúscula indican diferencias entre las alícuotas, y en MAYÚSCULAS, las diferencias entre ambos ciclos de purificación; ***representa la suma de las proteínas en las "alícuotas Des." de los dos ciclos de la purificación. ** para la masa total de proteínas, se tomó como diferencia significativa una diferencia mayor a un 5 %*

En la presente técnica, se realizó constantemente agitación de las células en contacto con el SLC, por lo cual, es posible que se haya generado un desprendimiento de péptidos y proteínas de la pared celular de la cepa STw66. Esto explicaría que al sumar la masa total de proteínas de las alícuotas obtenidas a lo largo de la purificación, el resultado obtenido dio una cantidad mayor a la inicial (presente en el SLC).

En las etapas de adsorción (alícuota Ads.), ocurre la purificación de una mayor cantidad de proteínas, aproximadamente, un 94 % de las mismas no se adsorben a la pared celular de la cepa STw66 (Tabla II.11). En la etapa de lavado, continúa la purificación, quedando apenas, en el purificado final (NaCl), un 11 % de la masa total de proteínas presente en el SLC. Asimismo, se puede apreciar que en los lavados (L_1 y L_2) se eliminan más péptidos sin actividad antimicrobiana, mejorándose así, el rendimiento de la purificación.

Adicionalmente, la alícuota Ads. y la alícuota Des., en ambos ciclos de purificación, poseen igual concentración de proteínas, lo cual indica, una afinidad similar de las bacteriocinas por la pared celular de la cepa STw66 más allá de su reutilización para adsorber y desorber las bacteriocinas. En las etapas de lavados se observó una diferencia significativa en la

concentración de proteínas, siendo esta mayor en el segundo proceso. Este incremento de proteínas en el lavado puede deberse al desprendimiento de proteínas de la pared celular de *E. mundtii* STw66.

En la tabla II.12, se muestra la tabla de purificación de la presente técnica. En cuanto al rendimiento, se puede observar que la actividad específica aumentó desde 1108 hasta 1691, indicando que fue posible una concentración de la actividad del SLC, es decir, que se obtiene una mayor actividad por µg de proteína. La actividad porcentual remanente fue 5 % mientras que el porcentaje de las proteínas remanentes fue 3,28 %. El factor de purificación fue de 1,53, indicando que fue posible obtener una semipurificación adecuada.

Tabla II.12: Tabla de purificación de la técnica de adsorción-desorción.

Etapa	Volumen Total (ml)	Masa total de Proteínas (µg)	Actividad (UA)	Actividad específica (UA/µg)	Proteínas remanentes (%)	Actividad remanente (%)	Factor de purificación
SLC	40	924,0	1024000	1108	100	100	1
Adsorción-Desorción	4	30,3	51200	1691	3,28	5	1,53

**Los valores expresados son considerando ambas alícuotas obtenidas ricas en bacteriocinas.*

Según Jamaluddin *et al.* (2018), por medio de la técnica de adsorción-desorción, es posible obtener una actividad remanente de un 64 % y un 7 %, al aplicarse posteriormente otras técnicas. En la presente purificación, este rendimiento fue algo menor, pero no se utilizaron pasos posteriores para purificar la bacteriocina. Cabe destacar, que en general, esta técnica se utiliza como una primera instancia para la purificación y luego se realizan otras etapas, como se detalló en la introducción (Sección II.1.4.1), y es por ello, que en bibliografía no se suele informar el rendimiento únicamente de esta etapa. En la presente tesis como el objetivo fue la aplicación del SLC semipurificado en alimentos, y no de separar las bacteriocinas presentes en el SLC para caracterizarlas, únicamente se aplicó esta técnica.

En esta sección fue posible obtener una purificación parcial de las bacteriocinas presentes en el SLC de E. mundtii STw66 por medio de la técnica de adsorción por pH. Se optimizó la técnica para realizarla poniendo en contacto el 50 % del SLC a pH 7,0 con las células productoras a 4 °C por 1 hora, seguido por un proceso de desorción en una solución de NaCl 100 mM a pH 3,0. De esta manera se obtuvo un factor de purificación de 1,53.

II.4.4 Comparación de las técnicas de purificación evaluadas

En cuanto a la comparación de ambas técnicas de purificación aplicadas, (por medio de la columna de interacción hidrofóbica y el cartucho de extracción en fase sólida y la técnica de adsorción-desorción), se puede observar que la técnica de adsorción presentó mejores resultados (Tabla II.13).

Tabla II.13: Comparación de la actividad específica, rendimiento y factor de purificación de las técnicas de purificación evaluadas

Purificación	Actividad específica (UA/mg)	Actividad remanente (%)	Factor de purificación
Columna*	406	0,45	0,49
Adsorción-Desorción	1691	5,00	1,53

**Refiere a la purificación por medio de la columna de interacción hidrofóbica y el cartucho de extracción en fase sólida.*

En cuanto a la actividad específica, se puede notar que la de la técnica de adsorción-desorción es 4 veces mayor, lo cual indica una mayor actividad antagonista por mg de proteína presente en la muestra, es decir que la muestra semipurificada contiene menor masa total de proteínas, y una mayor actividad antagonista. En cuanto a la actividad remanente, se puede observar que, también por medio de la técnica de adsorción-desorción se mantiene un porcentaje mayor de la actividad antagonista inicial del SLC. Finalmente, el mayor factor de purificación también demuestra una mejor relación entre las proteínas presentes y la actividad remanente en la técnica de adsorción desorción.

En base a lo expuesto, es posible concluir que la técnica de adsorción-desorción resultó ser más satisfactoria que la de columna de interacción hidrofóbica y cartucho de extracción en fase sólida ya que permitió obtener un mayor volumen de purificado con mejor actividad antagonista, de una forma más sencilla y sin emplear solventes. Por lo tanto, se seleccionó para aplicar en piezas de salmón rosado.

La técnica de adsorción-desorción resultó más sencilla, amigable con el medio ambiente y con un factor de purificación mayor a la técnica de purificación en columna de interacción hidrofóbica y cartucho de extracción en fase sólida, siendo por ello, seleccionada para aplicar su producto en la preservación de piezas de salmón rosado.

II.4.5 Aplicación de bacteriocinas semipurificadas en piezas de salmón

II.4.5.i Condiciones de aplicación del pulverizado

En la Figura II.21 se pueden observar las 3 pruebas realizadas con el objetivo de evaluar la distancia óptima para aplicar el pulverizador. A 5 cm de distancia, existe una alta densidad de color sobre el papel, pero el mismo no llega a abarcar completamente la superficie del trozo de salmón, generando una dispersión no homogénea. A 10 cm, se observa una dispersión más pareja, aunque siguen distinguiéndose dos áreas diferentes en la superficie que ocuparía el salmón. Finalmente, al aplicar el pulverizador a 15 cm, se observa una distribución homogénea de las gotas y se observa que se cubre adecuadamente el tamaño del trozo de salmón, por lo cual se seleccionó esta distancia para la aplicación. En la Figura II.22 se puede observar el resultado de las tres pulverizaciones (a 90° y a 45° por ambos lados) manteniendo una distancia de 15 cm de aplicación.

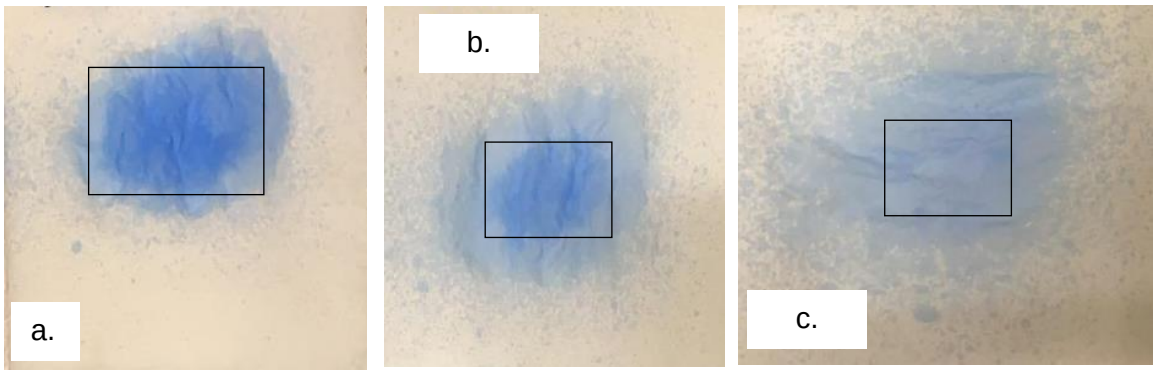


Figura II.21: Pruebas de aspersor a diferentes distancias con tinta azul

Figura II.22: Trozo de salmón expuesto al aspersor con tinta azul lavable.

Luego, se evaluó sobre trozos de salmón la capacidad de adsorción de 1, 2, 3 o 4 pulverizaciones, por todos los lados, permitiendo un tiempo de secado de 1 minuto entre cada una. Se comprobó que repitiendo la pulverización por ambos lados y en todas las direcciones tres veces, el trozo de salmón se secaba adecuadamente y que, al disparar una cuarta vez, el secado resultaba más costoso. Como consecuencia, se decidió repetir el ciclo de pulverizaciones, 3 veces por cada lado.

II.4.5.ii Masa de bacteriocinas semipurificadas aplicada

En base a determinaciones gravimétricas, se estimó la masa de bacteriocinas semipurificadas presente sobre los trozos de salmón que fue de 0,18 g/pieza de salmón. Este valor equivale a 0,013 g de bacteriocinas semipurificadas por g de salmón. Considerando el rendimiento de la purificación, la aplicación por gramo de pescado equivale a la purificación de 1,8 ml de SLC producido por *E. mundtii* STw66.

II.4.5.iii Calidad microbiológica

Todas las piezas de salmón obtuvieron un recuento de bacterias totales en el orden de 6 x 10^3 UFC/g, lo cual indica una calidad microbiológica adecuada del salmón utilizado.

En cuanto al desarrollo de la flora nativa, no hubo diferencias significativas entre los sistemas, observándose un aumento de 1 ciclo logarítmico a las 24 horas, y de 3 ciclos para todos los sistemas luego de 72 horas de almacenamiento.

En la Figura II.23, se puede observar el crecimiento de *L. innocua* en el tiempo para los sistemas L y LB. En el sistema control, no se detectó población de *Listeria* spp. a lo largo del almacenamiento, lo cual indica que su población fue menor a 20 UFC/g.

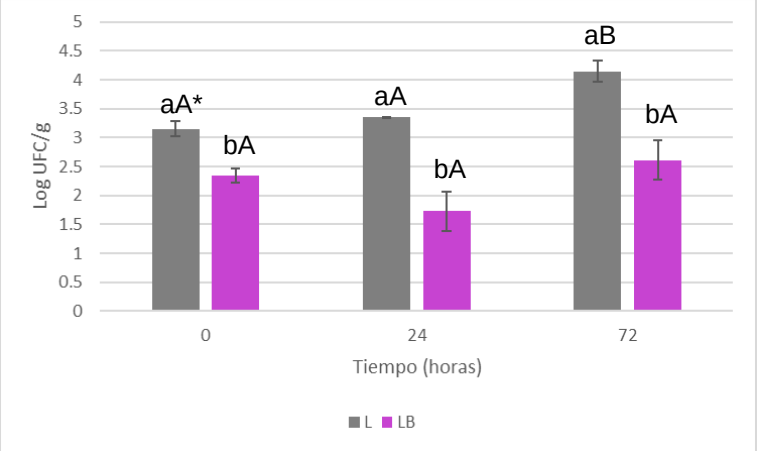


*Figura II.23: Crecimiento de L. innocua en los sistemas L y LB a lo largo del almacenamiento. *Las letras en minúscula representan las diferencias entre sistemas y en mayúsculas, las diferencias en el tiempo dentro de un mismo sistema.*

En el sistema L, la población de *L. innocua* se mantuvo constante luego de 24 horas de almacenamiento, mientras que luego de 72 horas aumentó en 1 ciclo logarítmico. Por el contrario, en el sistema adicionado con las bacteriocinas semipurificadas (LB), se observó una disminución en el recuento de *L. innocua* de 0,7 ciclos logarítmicos al inicio, indicando un efecto en la capacidad de crecimiento del microorganismo objetivo de manera inmediata.

Luego de 24 horas y 72 horas, su recuento permaneció constante. Es de interés destacar que, en todos los tiempos, los recuentos de *L. innocua* fueron menores para el sistema LB que para el sistema L. Si bien el proceso de purificación tuvo un rendimiento del 5 % (sección II.4.3.iv), el purificado obtenido a muy baja concentración logró un efecto deseable sobre el desarrollo de *L. innocua* presente en las piezas de salmón. Es probable que la aplicación de una concentración más alta de bacteriocinas permita obtener un mayor efecto inhibitorio.

Los resultados comentados se encuentran en línea con lo hallado por Anacarso *et al.* (2014) quienes aplicaron péptidos con actividad antimicrobiana producidos por *L. pentosus* en filetes de salmón para controlar la población de *L. monocytogenes.* En este estudio se logró una disminución de casi 3 ciclos logarítmicos a lo largo de un almacenamiento de 144 horas. Resulta de interés destacar que existen bacteriocinas producidas por *L. pentosus* pertenecientes a la clase IIa, al igual que la mundticina KS producida por la cepa STw66. En otro estudio Gómez-Sala *et al.* (2016a) al aplicar el SLC de dos cepas bacteriocinogénicas (*L. curvatus* BCS35 y *E. faecium* BNM58) en filetes de merluza, no lograron un control de la flora nativa del pescado, pero sí una disminución del recuento de coliformes a lo largo de 7 días de almacenamiento. En base a los resultados mencionados, se puede observar una gran variabilidad de resultados en cuanto a la aplicación de diferentes bacteriocinas en distintos tipos de pescado. Esto destaca la necesidad de realizar estudios específicos para cada tipo de pescado y de bacteriocina a emplear.

Finalmente, según lo citado anteriormente, en este estudio fue posible disminuir el recuento de *L. innocua* por 3 días, pero no de la flora nativa del pescado, por lo cual, la bacteriocina aplicada por aspersión puede favorecer la preservación de piezas de salmón, pero debe ser utilizada en combinación con otros factores de preservación para mejorar la calidad global del producto.

La aplicación de las bacteriocinas semipurificadas de la cepa E. mundtii STw66 mediante pulverización fue capaz de controlar la población de L. innocua por 72 horas, pero no la flora nativa presente en el pescado. Se logró utilizar un volumen muy bajo de las bacteriocinas semipurificadas en cada pieza, por lo cual esta técnica resultaría adecuada para aplicar en combinación con otras técnicas de preservación para extender la vida útil del salmón.

II.5 Conclusiones

En este capítulo fue posible seleccionar la bacteria *E. mundtii* STw66 para purificar su SLC debido a su mayor actividad antagonista contra la flora nativa del pescado.

En cuanto a la purificación del SLC se aplicaron satisfactoriamente dos técnicas obteniéndose semipurificaciones ricas en bacteriocinas. El factor de purificación fue mejor para la purificación por medio de la técnica de adsorción-desorción que para la columna de interacción hidrofóbica y el cartucho de extracción en fase sólida y su procedimiento resultó más sencillo y amigable con el medioambiente ya que no se utilizan solventes. Esta metodología se optimizó, realizando una extracción a pH 7,0 por una hora a 4°C y una desorción de las bacteriocinas en una solución de NaCl 100mM a pH 3,0, realizando dos ciclos de adsorción-desorción con un 50 % del SLC en cada ciclo. Al aplicar por aspersión este purificado para preservar piezas de salmón rosado almacenado bajo refrigeración, se logró controlar el desarrollo de *L. innocua* por 3 días, pero no el de la flora nativa del pescado. Es debido a esto que las bacteriocinas producidas por *E. mundtii* STw66 resultan promisorias para su aplicación en productos de la pesca junto con otros factores de preservación.

Capítulo III

Determinación de la actividad antagonista de aceites esenciales en fase vapor y su aplicación en filetes de merluza frescos

III.1 Introducción

III.1.1 Generalidades sobre la composición química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son líquidos aromáticos y volátiles obtenidos de distintas partes de plantas, incluyendo flores, tallos, raíces, hojas, semillas, cáscara, frutos y corteza, o de plantas enteras. Se forman como metabolitos secundarios en el citoplasma de la planta y normalmente están presentes como pequeñas gotas entre las células (Sonwa, 2000). Pueden actuar como agentes polinizadores, como mecanismo de defensa contra posibles patógenos y/o como antioxidantes (Evans, 2009). Presentan baja solubilidad en agua, pero ésta es elevada en solventes orgánicos. Asimismo, su punto de evaporación es bajo y son translucidos, con color amarillo claro.

La obtención de AE, por lo general se realiza por destilación, ya sea por arrastre con vapor o fraccionada debido a la alta volatibilidad de los compuestos (Ríos, 2016). En los últimos años, también comenzaron a utilizarse otras opciones de extracción, tales como la extracción supercrítica con dióxido de carbono o la hidrodestilación asistida por microondas (Pateiro *et al.,* 2018). Cabe mencionar que, la extracción con solventes puede generar una modificación en los componentes y por lo tanto no se considera que estos sean AE (Giwa *et al.,* 2018).

En cuanto a la composición de los AE, los principales componentes son terpenos, sesquiterpenos y sus derivados tanto hidrocarburos, como compuestos oxigenados. También, en el proceso de destilación, se pueden extraer otros compuestos tales como cumarinas, antraquinonas, alcaloides, y derivados de glicósidos generados en la destilación. La fracción de terpenos puede constituir entre un 50 % y un 95 % de los componentes (Chanthaphon *et al.,* 2008). Cada AE suele contener entre 20 y 80 compuestos, de los cuales apenas unos pocos, pueden representar hasta un 80 % de la composición total (Solórzano-Santos y Miranda-Novales 2012). En la Figura III.1 se pueden observar los compuestos principales de algunos AE ampliamente aplicados. Resulta importante mencionar, que la estandarización de la producción de AE resulta muy complicada, dado que la composición de los mismos depende de numerosos factores, tales como la forma de obtención, el momento de recolección de los especímenes según su ciclo de floración, el origen geográfico, las condiciones climáticas, y la calidad de los suelos (Patel, 2015).

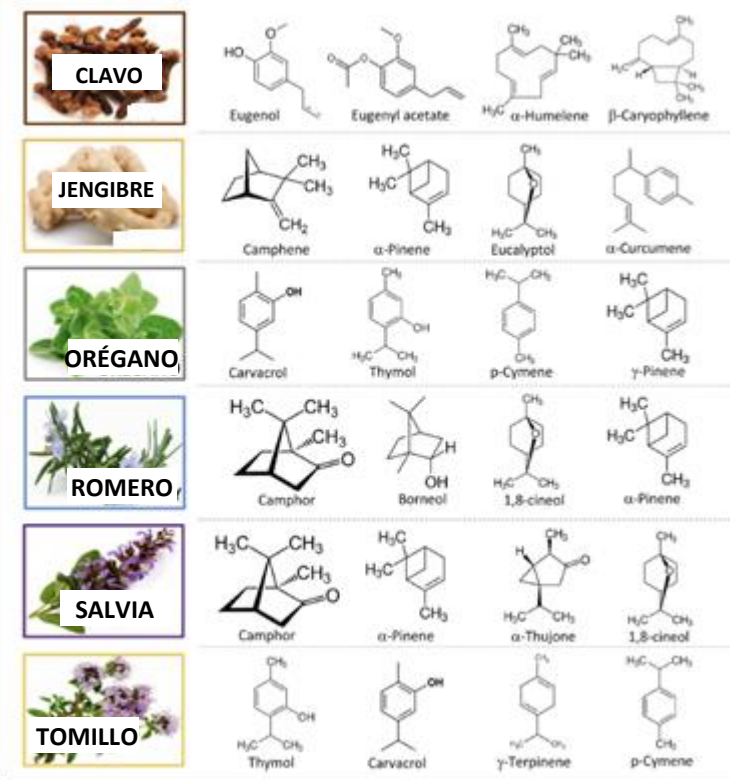


Figura III.1: Principales componentes de AE (Pateiro et al., 2018).

Los AE han sido utilizados desde la antigüedad, en culturas como la egipcia o la mapuche, adicionados a cosméticos, perfumes y alimentos, o como medicina para diferentes dolencias, por lo cual poseen un historial de uso seguro y nivel de GRAS para aplicación en alimentos (Es *et al.,* 2017; González *et al.,* 2018). Hoy en día, se estima que se producen a escala industrial aproximadamente 25000 toneladas por año, presentando numerosas aplicaciones en la industria alimentaria (Ribeiro-Santos *et al.,* 2018). Dentro de ellas, pueden mencionarse la aplicación para preservar frutas y verduras frescas y mínimamente procesadas, productos lácteos y productos cárnicos (Falleh *et al.,* 2020).

III.1.2 Funcionalidad de los aceites esenciales en alimentos

Los principales AE aplicados en alimentos son, entre otros, orégano, menta, romero, naranja, salvia, canela, lavanda, clavo, comino, coriandro, laurel, tea tree, hinojo y eucaliptus (Tahlan, 2014). Éstos se aplican para obtener diferentes efectos, dentro de los cuales, los principales son mejorar las cualidades sensoriales, generar un efecto antioxidante e inhibir el desarrollo de microorganismos tanto patógenos como deteriorativos.

En cuanto a su uso para mejorar las características sensoriales, los AE proporcionan un sabor y un aroma agradables en bajas concentraciones. En el Código Alimentario Argentino se encuentra permitida la aplicación de 40 AE como aromatizantes en alimentos, con definiciones acerca de su composición y proceso de extracción, pero no se estipula una concentración máxima permitida de los mismos (Código Alimentario Argentino, 2021). Adicionalmente, su uso ha mejorado otras propiedades como la textura, por ejemplo, al aplicarlos en salchichas españolas fermentadas (Martín-Sánchez *et al.,* 2011).

La aplicación de los AE como antioxidantes, se basa en la presencia de componentes fenólicos, cuya acción antioxidante es debida a su capacidad para ralentizar la oxidación de lípidos insaturados donando un átomo de hidrógeno del grupo hidróxido del fenol a los radicales peróxido, que son los responsables de la propagación del radical oxidativo (Amorati *et al.,* 2016). Además, en los AE también están presentes otros compuestos no fenólicos con actividad antioxidante como, por ejemplo, el linalool, limoneno y citral. Éstos actúan como antioxidantes mejoradores de la terminación de la oxidación, sin estar involucrado el radical superóxido, como en el mecanismo fenólico. Debido a que la capacidad antioxidante de todos los AE depende de su composición y de los compuestos presentes en el alimento, la misma se debe evaluar particularmente en el sistema en el que se apliquen (Baschieri *et al.,* 2017).

La actividad antimicrobiana de los AE depende de los componentes principales de los mismos. Se ha observado que los AE con actividad antimicrobiana son aquellos que presentan compuestos fenólicos, tales como cinamaldehído, citral, carvacrol, eugenol o timol, los cuales alteran el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación de los componentes celulares. Asimismo, los terpenos también poseen actividad antimicrobiana. En términos generales, su actividad se debe a la interacción de los compuestos lipofílicos de los AE con la membrana de los microorganismos, pudiendo estos penetrarla con facilidad. De esta manera, son capaces de modificar la permeabilidad de la membrana, generando la pérdida de iones y de material intracelular (Dorman *et al.,* 2000). Por ejemplo, el trans cinamaldehído, uno de los principales compuestos presentes en el AE de canela puede controlar el crecimiento de *S.* Typhimorium y *E. coli* al consumir el ATP celular. Otro componente con actividad antagonista es el carvone, el cual ha sido capaz de actuar sobre el *quorum sensing* de *Cronobacterium violaceum* inhibiendo la formación de biofilms (Kanekar *et al.,* 2021). La Figura III.2 muestra los diferentes mecanismos mediante los cuales los AE actúan en las células microbianas.

Figura III.2: Mecanismo de acción de los AE en microorganismos (Bhavaniramya *et al.,* 2019).

Respecto al rango de acción antagonista, los AE son más efectivos contra las bacterias Gram positivas, ya que contienen péptidoglicano en la parte externa de su pared celular. Las bacterias Gram negativas, poseen una capa externa de fosfolípidos y una segunda capa de lipopolisacáridos, como consecuencia, la difusión de los compuestos lipofílicos de los AE se ve más restringida (Bhavaniramya *et al.,* 2019). En la Tabla III.1, se puede observar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de diferentes AE contra bacterias patógenas y deteriorativas presentes en alimentos. Se puede notar que las concentraciones requeridas para inhibir diferentes patógenos son variables entre los AE. Incluso, utilizando AE de la misma especie botánica varían los resultados ya que, como se mencionó anteriormente, su composición depende de la forma de extracción del AE y de los factores climáticos a los cuales se encuentren sujetos los diferentes especímenes utilizados para la extracción (Benbelaïd *et al.,* 2014). En muchos casos esta variación puede ser cercana a un 500%, aunque en otros casos, cuando los AE utilizados son similares, los valores obtenidos para la CMI resultan muy cercanos.

Tabla III.1: Concentración mínima inhibitoria de AE (µl de AE/l de aire) para algunas bacterias patógenas y deteriorativas presentes en alimentos.

Microorganismo evaluado	AE	CMI	Referencia
L. monocytogenes	Orégano	78	Lee *et al.,* 2018
	Tomillo	78	
		400	Lorenzo-Leal *et al.,* 2019
	Romero	2700	
	Corteza de canela	78	Lee *et al.,* 2018
	Hoja de canela	156,3	
	Albahaca	625	
	Clavo	18	
		17	Lopez *et al.,* 2005
	Canela	34	
S. aureus	Canela	54	Goñi *et al.,* 2009
		34	Lopez *et al.,* 2005
	Clavo	18	Goñi *et al.,* 2009
		26	Lopez *et al.,* 2005
	Eucalypthus globulus	2225	Tyagi y Malik, 2011
	Mostaza	12	Reyes- Jurado *et al.,* 2019
B. subtilis	*Eucalypthus globulus*	2225	
	Mostaza	12	Reyes- Jurado *et al.,* 2019
B. cereus	Canela	18	Goñi *et al.,* 2009
	Clavo	18	
E. coli	*Origanum majorana*	26	Nedorostova *et al.,* 2009
	Canela	18	Goñi *et al.,* 2009
		17	Lopez *et al.,* 2005
	Clavo	27	Goñi *et al.,* 2009
		26	Lopez *et al.,* 2005
	Mostaza	50	Reyes- Jurado *et al.,* 2019
	Tomillo	400	
	Orégano mejicano	400	
P. fluorescens	*Mentha piperita*	1125	Tyagi y Malik 2011
	Mentha arvensis	567	
	Eucalypthus globulus	2225	
	Canela	375	Bahurmiz *et al.,* 2020

Adicionalmente, existe evidencia de una actividad sinérgica entre los componentes presentes en AE, dado que la mezcla de dos o más compuestos en concentraciones subinhibitorias genera una amplia mejora en la actividad antagonista (Lambert *et al.*, 2001; Rattanachaikunsopon *et al.,* 2010). Por ejemplo, Mikolo *et al.* (2020) al evaluar la actividad antagonista de mezclas de AE de *Plectranthus glandulosus, Ocimum gratissimum,*

Cymbopogon citratus, Cymbopogon nardus y *Eucalyptus* PF1 contra *Klebsiella spp, P. aeruginosa, E. coli, Bacillus subtilis, Salmonella* spp*., S. aureus* y *Candida albicans,* observó halos de inhibición significativamente mayores para algunas de las cepas a concentraciones subinhibitorias.

Para concluir, es de interés resaltar que, debido a la variabilidad existente en la composición de los AE por las razones citadas anteriormente, resulta imperativo una homogenización de las técnicas de extracción utilizadas, para poder asegurar AE estables en su composición a la hora de aplicarlos en alimentos. Es necesario obtener productos seguros, que no dependan del lote de AE que se utilice. Para ello, los proveedores deben presentar la composición de los AE, estandarizar su proceso de producción y brindar a sus clientes información sobre estas condiciones.

III.1.3 Interacción de los aceites esenciales con componentes presentes en los alimentos

En los últimos años se ha estudiado sistemáticamente la aplicación de AE en toda clase de alimentos, desde cárnicos hasta vegetales y productos lácteos. Los resultados de estas aplicaciones son variados ya que la capacidad de los AE para preservar los alimentos depende de la composición de la matriz en la que se apliquen, de la atmósfera en la cual se envasen, del recuento inicial de microorganismos y del pH (Hyldgaard *et al.,* 2012; Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn, 2010; Adelakun *et al.,* 2016; Rodriguez-Garcia *et al.,* 2016). Según lo hallado por Skandamis y Nychas (2000), el AE de menta peperina, ejerce una mejor actividad antagonista contra *L. monocytogenes* en ensaladas de pepinos, un producto bajo en lípidos, que en ensaladas conteniendo trozos de pescado. Es interesante destacar que, si bien este efecto fue observado en cuanto a la actividad antimicrobiana, sucede lo opuesto con la actividad antioxidante, ya que cuando el alimento contiene mayores componentes lipídicos, los AE se disuelven en dicha fracción, inhibiendo la oxidación con mayor facilidad. En cuanto a la interacción de los AE con las proteínas, éstas pueden interactuar con algunos compuestos tales como el carvacrol, y limitar su capacidad antimicrobiana. Adicionalmente, existe una diferencia en la CMI de diferentes AE al evaluarlos en medio sólido o en medio líquido, aumentando al ensayarse en medio sólido, lo cual indica que su capacidad de preservación depende, también, de las propiedades físicas del alimento (Adelakun *et al.,* 2016).

Finalmente, al igual que con cualquier aditivo alimentario, la efectividad de los AE en la preservación de alimentos depende de la composición de los mismos y su aptitud debe ser estudiada específicamente en el producto en el cual se deseen utilizar.

III.1.4 Formas de aplicación en alimentos

Dentro de la aplicación en alimentos, los AE han sido utilizados de forma directa sobre la matriz alimentaria, en fase vapor o en películas comestibles. Cada una de estas aplicaciones posee ventajas y desventajas. En el caso de la aplicación directa en la matriz, en ocasiones, se requieren de concentraciones muy elevadas para obtener el efecto deseado y éstas no siempre son sensorialmente aceptables para los consumidores. Adicionalmente, el contacto con el alimento podría no ser total, presentándose así, áreas sin presencia de AE (Hyldgaard *et al.,* 2012).

En cuanto a las películas comestibles, éstas pueden formularse con gelatina, celulosa quitosano u otros compuestos y pueden ser utilizadas como una barrera extra para prevenir el crecimiento de los microorganismos. Se ha demostrado que al adicionar AE a películas comestibles, los mismos mantienen su actividad antimicrobiana y antioxidante y al ser utilizados en bajas concentraciones no afectan las propiedades mecánicas de las películas (Al-Hashimi *et al.,* 2020; Janes y Dai, 2012; Naseri *et al.,* 2020). Además, este tipo de aplicación permite una liberación controlada de los AE y así, se genera una disminución de su impacto sobre las propiedades sensoriales del alimento.

La aplicación de AE en fase vapor es una técnica que hasta la actualidad no ha sido utilizada ampliamente en alimentos, pero cuyo futuro es prometedor debido a su alta eficacia con un impacto favorable en el flavor del producto (Reyes-Jurado *et al.,* 2020). En esta técnica, los AE se incorporan sin estar en contacto directo con los alimentos, permitiendo su volatilización, sobre algún soporte, como un disco de papel. Durante el almacenamiento, se evaporan los compuestos más volátiles. De esta manera, el alimento se encuentra constantemente en contacto con dichos compuestos, ya que, conforme estos se adsorben en la superficie, su evaporación aumenta. Por último, dado que una menor cantidad de AE entra en contacto con el alimento, su efecto sobre las propiedades sensoriales tiende a ser más favorables para los consumidores (Lee *et al.,* 2018).

III.1.5 Combinación de los aceites esenciales con otras técnicas de preservación

Es posible utilizar los AE en combinación con otras técnicas de preservación, mejorando así su actividad antioxidante y antimicrobiana. La ventaja de la combinación es crear una tecnología de obstáculos, mediante la cual sea posible disminuir la concentración o intensidad de cada obstáculo logrando minimizar la modificación de las propiedades del alimento fresco y extendiendo aún más su vida útil.

La combinación de AE con atmósfera modificada o con envasado al vacío ha demostrado mejorar el desempeño de ambas tecnologías. Por ejemplo, en filetes de pez espada adicionados con un 1 % de AE de orégano, y envasados bajo atmósfera modificada, se logró prolongar la vida útil 5 días (Giatrakou *et al.,* 2008). En cuanto a la utilización de envasado al vacío, en la conservación de trozos de pollo adicionados con AE de tomillo y EDTA, su vida útil se pudo extender 10 días en comparación al control (Pavelková *et al.,* 2014).

Al combinar AE con irradiación, funcionaron como sensibilizadores de los microorganismos al aplicarlos antes de dicha tecnología (Huq *et al.,* 2015; Turgis *et al.,* 2018). Por otra parte, los AE han sido combinados con otros antimicrobianos como nisina, y con técnicas de preservación tradicionales tales como salado y adición de ácidos obteniéndose también una mejora en la vida útil (Boziaris *et al.,* 2011; Mahmoud *et al.,* 2006; Mexis *et al.,* 2009).

III.1.6 Aplicación de aceites esenciales en productos de la pesca

La aplicación de AE en productos de la pesca ha sido utilizada en los últimos años en respuesta a las demandas de los consumidores de productos con aditivos naturales. Son efectivos contra bacterias tanto patógenas como deteriorativas presentes en el pescado, tales como *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. y *L. monocytogenes* (Anastasiou *et al.,* 2020; Bahurmiz *et al.,* 2020; Lee *et al.,* 2018). Dentro de los AE más utilizados, se destacan los de romero, orégano, tomillo, clavo y ajo (Cai *et al.,* 2015; Frangos *et al.,* 2010; Guerrero Pacheco *et al.,* 2011; Hassoun y Emir Çoban, 2017). Estos AE, podrían ser los más elegidos debido a su compatibilidad con el sabor del pescado. En cuanto a la efectividad de los AE sobre los microorganismos presentes en pescado refrigerado, según Hao *et al.* (2021), los más eficientes en orden decreciente serían el orégano, los del género *Zingiberaceae* (como el jengibre o la canela) y el tomillo.

Dentro de los efectos positivos de su agregado, se pueden incluir acción antioxidante, aumento de la vida útil, disminución de la población de bacterias totales y de las productoras de aminas biogénicas, y mejora del sabor de los productos (Abdollahzadeh *et al.,* 2014; Anastasiou *et al.,* 2020; Dorman *et al.,* 2000; Falleh *et al.,* 2020).

En la Tabla III.2 se detallan los principales trabajos donde se emplean AE para la preservación de pescado y sus efectos en la calidad final del producto.

Tabla III.2: Aplicaciones de AE en productos de la pesca y sus efectos.

Pescado	AE	Forma de aplicación	Efecto	Referencia
Caballa (Scomber scombrus)	Romero y albahaca	Inmersión (1 %)	Disminución de compuestos volátiles y productos de oxidación; extensión de la vida útil de 2 a 5 días	Karoui y Hassoun, 2017
Carpa (*Cyprinus carpio*)	Ajo y componentes de AE	Inmersión (1 y 2 %)	Reducción del crecimiento microbiano	Mahmoud *et al.,* 2004
Anjova *(Pomatomus saltatrix)*	Tomillo y Laurel	Inmersión (1 %)	Reducción del crecimiento microbiano y de la oxidación de lípidos; 4 días de extensión de la vida útil	Erkan *et al.,* 2011
Bonito del atlántico (*Sarda sarda*)	Jengibre	Adición directa (0,5 y 1 %)	Extensión hasta 17 días de la vida útil (en comparación al control, 5 días)	Emir Çoban *et al.,* 2013
Trucha arcoíris (Oncorhynchus mykiss)	Clavo	Inmersión (0,1 0,5 y 1 %)	Disminución en los recuentos de bacterias deterioriativas, y en la oxidación lipídica, extensión de 4 o 5 semanas de la vida útil	Ozogul *et al.,* 2017
Trucha arcoíris (Oncorhynchus mykiss)	Romero, laurel, tomillo y salvia	Nanoemulsión	Acción antimicrobiana y antioxidante, generando sabor amargo en el pescado	Alparslan *et al.,* 2016
Corvinón ocelado (*Sciaenops ocellatus*)	Clavo, comino, hierbabuena	En fase vapor	Disminución de bacterias totales y aminas biogénicas, mejora de la aceptabilidad sensorial por 20 días	Cai *et al.,* 2015
Bacalao (*Gadus morhua*)	Clavo	Película de Gelatina de cuero bovino o de quitosano y gelatina	Disminución del recuento de bacterias totales y del nitrógeno básico volátil	Gomez-Estaca *et al.,* 2010

Si bien es posible observar diferentes aplicaciones de AE, su uso en fase vapor para preservar productos de la pesca no ha sido ampliamente explorado (Hao *et al.*, 2021). Es por todo lo mencionado anteriormente, que en este capítulo se utilizarán AE en fase vapor para preservar filetes de merluza refrigerados.

III.2 Objetivos

III.2.1 Objetivos generales

Evaluar la aptitud de AE en fase vapor solos o en combinación con la cepa bacteriocinogénica *E. mundtii* STw38 para mejorar la vida útil de filetes de merluza conservados en refrigeración.

III.2.2 Objetivos particulares

- Caracterizar la actividad antagonista de AE de lemongrass, orégano, tomillo y romero aplicados en fase vapor a fin de seleccionar los más efectivos.
- Evaluar la interacción entre los AE más efectivos para hallar mezclas sinérgicas.
- Evaluar el efecto de mezclas sinérgicas seleccionadas sobre la hidrofobicidad de la pared celular de *L. innocua* y *S. putrefaciens.*
- Determinar la composición química de los AE seleccionados y de la fracción volátil de una mezcla sinérgica seleccionada.
- Determinar la capacidad de la cepa bacteriocinogénica *E. mundtii* STw38 para ser aplicada en combinación con la mezcla sinérgica seleccionada.
- Aplicar la mezcla sinérgica de AE en combinación con *E. mundtii* STw38 para la preservación de filetes de merluza

En la Figura III.3 se puede observar une esquema de los objetivos del presente capítulo.

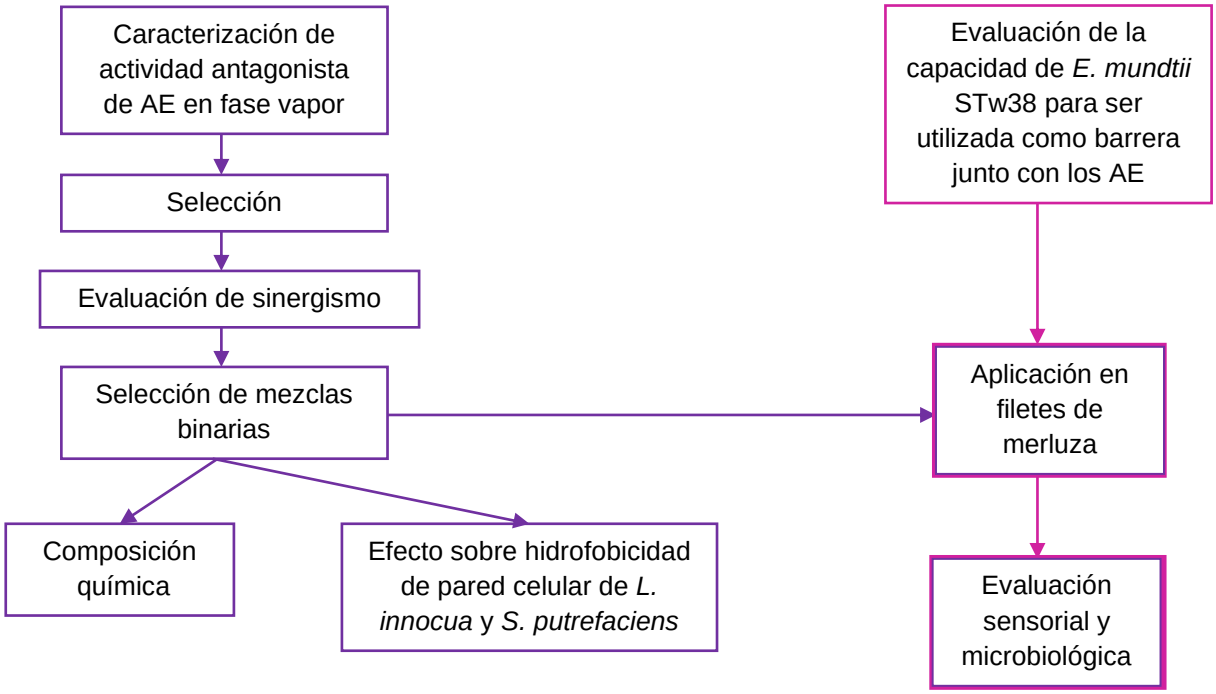


Figura III.3: Diagrama de objetivos particulares del Capítulo III

III.3 Materiales y Métodos

III.3.1 Evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro*

III.3.1.i Screening de la actividad antimicrobiana

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de los AE en fase vapor sobre la flora nativa y bacterias de colección presentes en el pescado, se aplicó la técnica propuesta por Goñi *et al.* (2009). Para ello, se llenaron placas de Petri de 50 mm de diámetro con 15 ml de TSA. Luego de solidificado el agar, se sembraron en la superficie 500 µl de un inóculo del microorganismo deseado con una concentración de 10^6 UFC/ml (ajustado a dicho nivel según la sección 3.4.3 de MyM generales), se distribuyó en forma uniforme por la superficie de la placa y se quitó el excedente. Las placas inoculadas se dejaron secar por 5 minutos bajo flujo laminar. Posteriormente, se colocó un disco de papel estéril (diámetro de 6 mm) en el centro de la tapa de la placa de Petri y se agregaron 10 µl del AE en estudio (1,172 µl/ml de aire en la placa, Figura III.4). Inmediatamente se cerraron las placas invertidas y se sellaron con Parafilm. La incubación se realizó por 24 horas a 30 °C y la actividad antagonista se evidenció por la aparición de un halo translúcido sobre el agar ubicado a partir del centro de la placa en concordancia con la ubicación del disco de papel conteniendo el AE. Este ensayo se realizó por quintuplicado.

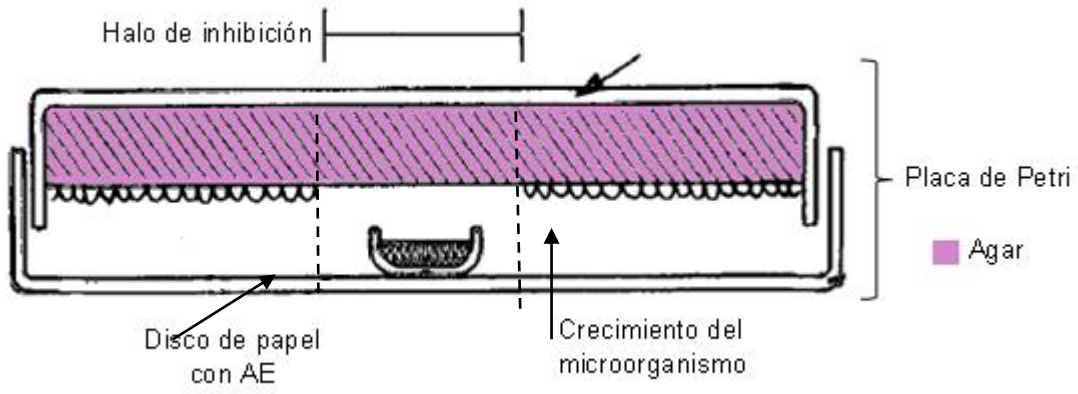


Figura III.4: Diagrama de ensayo de actividad antimicrobiana de AE en fase vapor.

III.3.1.ii Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó para *L. innocua* como un patógeno subrogante de *L. monocytogenes* y para *S. putrefaciens,* como microorganismo indicador representante de la flora deteriorativa Gram negativa presente en pescado. Para determinar la CMI de los AE en fase vapor se realizó la técnica descripta anteriormente, diluyendo los

AE con dimetilsulfóxido (DMSO). Las diluciones realizadas se encontraron en el rango comprendido entre 1/2 y 1/32. La CMI se definió como la mayor dilución a la cual se detectó un halo de inhibición. Previamente se evaluó si el DMSO presentaba actividad antagonista frente a las bacterias ensayadas, y se comprobó la ausencia de actividad. Todas las CMI se evaluaron por quintuplicado.

III.3.1.iii Concentración fraccionaria inhibitoria de mezclas de aceites esenciales contra *L. innocua* y *S. putrefaciens*

Se realizó la evaluación del tipo de interacción existente entre los AE que presentaron la mayor CMI contra las bacterias evaluadas. Las concentraciones utilizadas para realizar las mezclas de los AE se seleccionaron siguiendo el modelo de Berembaum modificado (Tabla III.3), el cual incluye la CMI de cada AE y concentraciones subinhibitorias (Schelegueda *et al.,* 2016b).

La actividad antagonista se evaluó de la misma forma que en las secciones anteriores, con cinco réplicas por sistema. La clase de interacción existente entre los AE se determinó calculando el índice de concentración fraccionaria inhibitoria (CFI_i) (Ecuación III.1), al igual que en la Sección I.3.6 del Capítulo I.

$$CFI_I = \sum \frac{CMI\ de\ AE\ utilzado\ combinado}{CMI\ de\ AE\ utilizado\ solo} \qquad \textit{Ecuación III.1}$$

Un CFI_i menor a 1, indica un comportamiento sinérgico, debido a que una concentración menor a la CMI de cada AE es capaz de inhibir el desarrollo del microorganismo objetivo. Si el CFI_i es igual a 1, el comportamiento es aditivo ya que tanto la mezcla de los AE como los mismos por separado presentan la misma CMI.

Tabla III.3: Diseño de Berembaum para la evaluación del tipo de interacción existente entre los AE contra L. innocua y S. putrefaciens.

Mezcla	AE A	AE B	CFI_i
A	1*	0	1,00
B	0	1*	1,00
C	1/2	1/2	1,00
D	1/3	1/3	0,66
E	1/3	1/2	0,84
F	1/2	1/3	0,84

**Los valores expresados representan las fracciones de la CMI obtenida para cada AE.*

En esta sección, fue posible seleccionar dos mezclas sinérgicas contra *L. innocua* y *S. putrefaciens* (FL y FS, respectivamente), para realizar evaluaciones adicionales.

III.3.1.iv Acción de los AE sobre la hidrofobicidad de la pared celular de *L. innocua* y *S. putrefaciens*

La hidrofobicidad de la pared celular se encuentra relacionada con la composición de la membrana, por lo cual una modificación en este indicador demuestra una alteración, y un posible daño en la membrana del microorganismo objetivo (Schelegueda *et al.,* 2016b).

La posibilidad de los AE de causar daño en la pared celular de *L. innocua* y *S. putrefaciens,* se evaluó utilizando la técnica desarrollada por González *et al.* (2021) con algunas modificaciones para simular la forma en la cual los microorganismos entran en contacto con los AE en fase vapor. Para ello se realizó un inóculo de 24 horas de ambos microorganismos y se centrifugó a 10000 rpm para separar el pellet del SLC. Se descartó el SLC y el pellet se lavó dos veces con 10 ml de solución Ringer ajustada a pH 6,0. Luego, el pellet se resuspendió en la misma solución a la mitad del volumen original y se adicionaron 10 ml a placas de Petri con un diámetro de 100 mm y 20 mm de altura. En la tapa, se pegó un disco de papel aluminio utilizando cinta doble faz y a dicho disco se le adicionó un disco de papel filtro de 20 mm de diámetro utilizando un broche metálico (Figura III.5). Se agregaron dos concentraciones diferentes de AE al papel filtro: dos veces la mezcla sinérgica FS para *S. putrefaciens* y dos veces la mezcla FL para *L. innocua*. Todas las placas de Petri se envolvieron en Parafilm y se incubaron por 24 horas a 15 °C con agitación moderada.

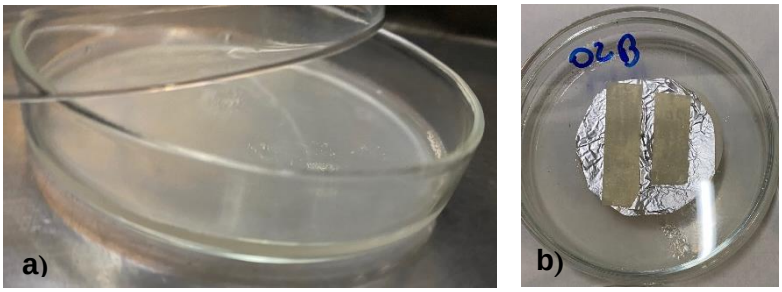


Figura III.5: Sistema utilizado para evaluar el efecto de los AE en fase vapor en la membrana celular de L. innocua y S. putrefaciens. a) vista de lado de la placa de Petri conteniendo la suspensión densa de células; b) Vista superior de la placa de Petri con el disco de aluminio y la cinta doble faz.

La suspensión densa de células expuestas a los AE por 24 horas se ajustó a una turbidez de 0,5 McFarland (en solución Ringer) y se agregaron 4 ml de cada sistema a tubos de

ensayo. A la mitad de los tubos se les agregó 1 ml de xileno, y a la otra mitad no. Todos los tubos se incubaron a 30 °C por 10 minutos. Luego, cada tubo de ensayo se agitó en vortex por 30 segundos y se incubaron 20 minutos adicionales a la misma temperatura. Finalmente, los tubos se dejaron reposar para que se separaran ambas fases (fase xileno y fase acuosa), se descartó la fracción de xileno y se midió la absorbancia de la fracción acuosa a 600 nm. La hidrofobicidad de la pared celular (HPC) se calculó como:

$$\%\,HPC = \frac{Abs\ s/\ xileno^{*} - Abs\ c/xileno^{**}}{Abs\ s/xileno}$$

Ecuación III.2

**muestras tratadas con xileno; **sin xileno*

La temperatura seleccionada (15 °C) fue un equilibrio entre una evaporación adecuada de los AE y una evaporación limitada de la solución Ringer para prevenir la solubilización de los componentes de los AE por la evaporación del solvente.

Para evaluar la evaporación del solvente, se prepararon los sistemas sin el agregado del inóculo y el papel de filtro se coloreó con fibra negra soluble en agua (Figura III.6). Los sistemas se incubaron por triplicado a 30 °C, 15 °C y 4 °C por 24 horas con agitación suave. La solubilización del solvente se evidenció por la pérdida del color del marcador en el papel de filtro. Se seleccionó la temperatura a la cual dicha pérdida fue menor.

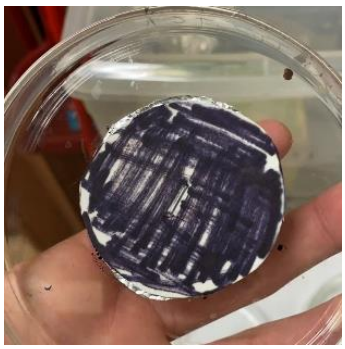


Figura III.6: Papel de filtro pintado con marcador de tinta soluble para evidenciar la evaporación de la solución Ringer.

III.3.1.v Evaluación de la supervivencia de *E. mundtii* STw38 y su capacidad para inhibir el crecimiento de *L. innocua* en presencia de aceites esenciales en fase vapor

Con la finalidad de evaluar la capacidad de la cepa bacteriocinogénica para ser utilizada junto con los AE en fase vapor, fue necesario realizar algunos ensayos previos. En primer lugar, se analizó la supervivencia de la cepa realizando ensayos *in vitro* utilizando la TDA

modificada aplicando la mezcla FL en fase vapor (Sección III.3.1.i). Como control se incubó la cepa STw38 únicamente en presencia de DMSO.

Para evaluar la capacidad de la cepa de ejercer actividad antagonista en presencia de la mezcla sinérgica de los AE, se realizó la TDA, y luego de sembrar el césped de *L. innocua*, se adicionaron estrías de *E. mundtii* STw38. En la Figura III.7 se muestra un esquema de la siembra en la placa de Petri. Como control positivo de actividad antagonista se realizó el ensayo sin la adición de los AE, y como control positivo de la actividad de los AE, se utilizó una placa únicamente con la mezcla de AE y el césped de *L. innocua*. La actividad se evidenció por un halo de inhibición alrededor de las estrías de *E. mundtii* STw38, fuera del área de inhibición en el centro de la placa debido a la actividad antagonista del AE.

Para este ensayo se decidió utilizar *L. innocua* ya que es un patógeno subrogante de *L. monocytogenes* y, previamente, en la sección I.3.1.ii ya se había comprobado la actividad antagonista de la cepa bacteriocinogénica contra ella. Todos los ensayos de actividad antagonista *in vitro* se realizaron por quintuplicado.

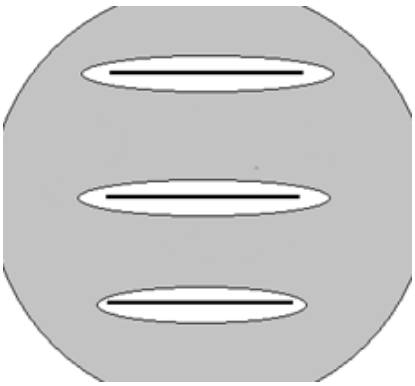


Figura III.7: Siembra de E. mundtii STw38 sobre césped de L. innocua. ■ *Césped de L. innocua;* **-** *Estría de E. mundtii STw38;* □ *posible área de inhibición debido al crecimiento de E. mundtii STw38*

III.3.2 Análisis químico de la composición de los aceites esenciales seleccionados

Se analizó la composición de los AE seleccionados, así como la composición de la fracción volátil de la mezcla sinérgica FL por medio de cromatografía gaseosa FID acoplada a un espectrómetro de masa. En el caso de la composición de la fracción volátil de los AE, antes del análisis, se realizó una micro extracción en fase sólida con una fibra de soporte recubierta con polidimetilsiloxano para absorber los compuestos volátiles. La extracción de los compuestos se realizó en un baño de ultrasonido a 45 °C por 6 minutos. El tiempo requerido para la extracción térmica fue de 3 minutos.

Para el análisis cromatográfico de las muestras, se utilizó un sistema GC-FID-MS acoplado con un inyector con o sin fraccionamiento. Este último estaba conectado por medio de un separador de flujo a una columna capilar de polietilenglicol MW ca. 20.000 y a otra columna de 5 % fenil-95 % metil silicona. Las dimensiones de ambas columnas fueron de 60 m y 0,25 mm con 25 mm de fase fija. La metodología utilizada fue la propuesta por Gil, *et al.* (2007).

III.3.3 Aplicación de los antimicrobianos estudiados en filetes de merluza

III.3.3.i Preparación de los sistemas

Dado que los AE en fase vapor, así como también las mezclas sinérgicas demostraron tener actividad antagonista contra *L. innocua* y *S. putrefaciens,* se evaluó su efectividad para controlar el recuento total de bacterias aerobias mesófilas presentes en filetes de merluza. Adicionalmente, dado que en la sección I.3.4, *E. mundtii* STw38 demostró tener capacidad para inhibir el crecimiento de *L. innocua* y *Lb. plantarum*, y también creció y presentó actividad antagonista en presencia de AE, se evaluó su capacidad para controlar la flora nativa del pescado junto con la mezcla sinérgica FL.

Se diseñaron 5 sistemas:

- Sistema control (S-C): sin adición de AE.
- Sistema AE A (S-A): con la adición del doble de la CMI del AE A
- Sistema FS (S-FS): con la adición de la mezcla sinérgica FS
- Sistema FL (S-FL): con la adición de la mezcla sinérgica FL
- Sistema STw-FL (S-STw): con la adición de la mezcla sinérgica FL y un inóculo de 10^6 UFC/ml de *E. mundtii* STw38.

La merluza fresca llegó al laboratorio y se procesó según lo descripto en la sección I.3.8.i del Capítulo I. Los filetes se cortaron en trozos de 3 x 3 x 1 cm y se colocaron en contenedores de polipropileno con un diámetro de 90 mm y 40 mm de altura. En la tapa de los contenedores, se adicionó papel de filtro, unido a papel metalizado de 30 mm. Sobre el papel de filtro se sembraron 77 µl de los AE de manera de obtener las concentraciones deseadas. Para adicionar el inóculo de *E. mundtii* STw38 de 10^6 UFC/g se realizó una inmersión de los trozos de pescado en agua ajustada a pH 6,0 con una concentración de 10^7 UFC/ml del inóculo por 2 minutos. Luego se dejó escurrir por 5 minutos en una malla metálica bajo flujo laminar. Para el resto de los sistemas, se realizó una inmersión en agua

destilada ajustada a pH 6,0 según lo descripto anteriormente. En la Figura III.8 se pueden observar los sistemas terminados.

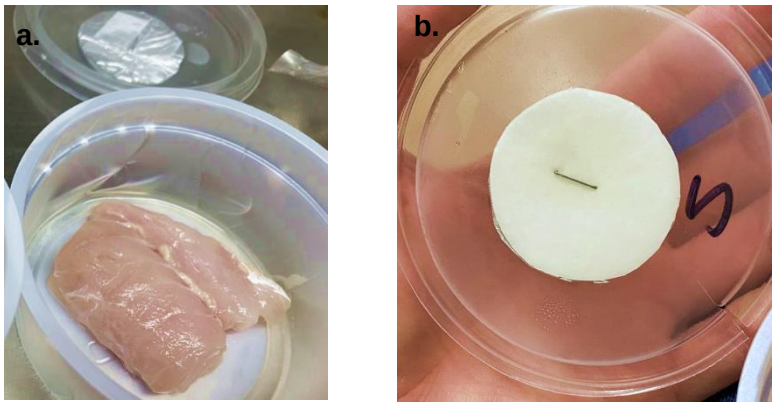


Figura III.8: Sistemas utilizados para evaluar la acción de los AE sobre la flora nativa de filetes de merluza. a. Filete de merluza y parte exterior de la tapa, pegada con el papel aluminio. b. Parte interior de la tapa con el papel de filtro embebido en AE.

Finalmente, se agregaron los AE sobre el papel de filtro y los contenedores se cerraron herméticamente con dos vueltas de filme extensible para prevenir la salida de los mismos. Todos los sistemas se almacenaron a 4 °C por 7 días y se tomaron muestras en el tiempo inicial y luego de 3, 5 y 7 días. Por cada sistema y cada tiempo, se tomaron muestras independientes por triplicado.

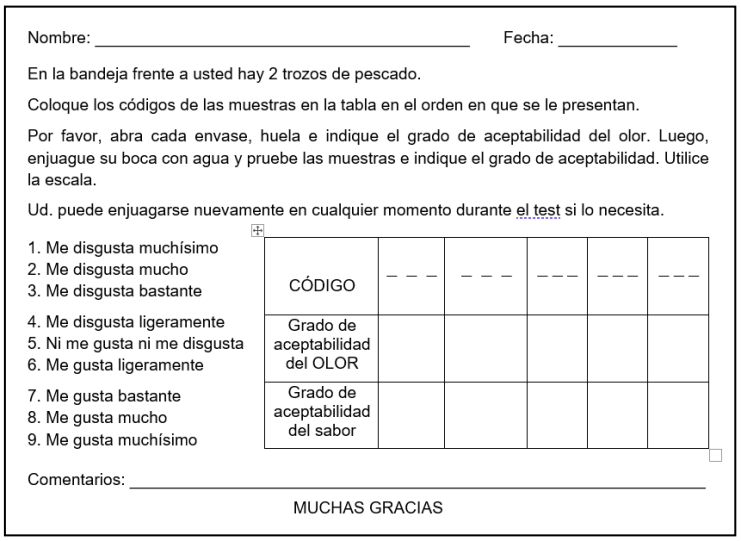
III.3.3.ii Análisis microbiológicos

El recuento de bacterias totales y de *Enterococcus spp.* se realizó según la sección 3.4.4 de MyM generales.

III.3.3.iii Análisis sensorial

Se evaluó la aceptabilidad de los filetes de merluza según la metodología descripta por Meilgaard *et al.* (1999). Para ello, se almacenaron por 24 horas en la presencia de las mezclas sinérgicas FS, FL y del AE A (con una concentración de dos veces la MIC) y un sistema control con 24 horas de almacenamiento sin exposición a ningún AE. Luego del almacenamiento, los trozos de merluza se sacaron de los contendores de plástico, se expusieron al aire por 5 minutos y se cocinaron en horno microondas a potencia máxima por 1 minuto. Inmediatamente alícuotas de los filetes se colocaron en envases de plástico pequeños con tapa hermética, para preservar los compuestos volátiles. Los envases se marcaron con códigos aleatorios de 3 cifras y se presentaron en orden aleatorio a 24 panelistas. La aceptabilidad se evaluó para el sabor y para el aroma utilizando una escala

hedónica donde 1 significaba “me disgusta muchísimo” y 9 “me gusta muchísimo” (Schelegueda *et al.* 2016a). En la Figura III.9 se puede apreciar la planilla entregada a los panelistas.



Nombre: _____ Fecha: _____

En la bandeja frente a usted hay 2 trozos de pescado.

Coloque los códigos de las muestras en la tabla en el orden en que se le presentan.

Por favor, abra cada envase, huela e indique el grado de aceptabilidad del olor. Luego, enjuague su boca con agua y pruebe las muestras e indique el grado de aceptabilidad. Utilice la escala.

Ud. puede enjuagarse nuevamente en cualquier momento durante el test si lo necesita.

1. Me disgusta muchísimo
2. Me disgusta mucho
3. Me disgusta bastante
4. Me disgusta ligeramente
5. Ni me gusta ni me disgusta
6. Me gusta ligeramente
7. Me gusta bastante
8. Me gusta mucho
9. Me gusta muchísimo

CÓDIGO	_ _ _	_ _ _	_ _ _	_ _ _	_ _ _
Grado de aceptabilidad del OLOR					
Grado de aceptabilidad del sabor					

Comentarios: _____

MUCHAS GRACIAS

Figura III.9: Planilla de análisis sensorial entregado a los panelistas para evaluar la aceptabilidad de filetes de merluza adicionados con AE.

III.3.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la hidrofobicidad y del análisis sensorial se analizaron utilizando un ANOVA de un factor y el tamaño de los halos y los resultados microbiológicos se realizaron utilizando un ANOVA de dos factores, AE y cepa o tiempo, respectivamente. En todos los casos luego del ANOVA se realizó una prueba de Tukey de comparación múltiple. El nivel de significancia fue de 5 % para todas las comparaciones.

III.4 Resultados y discusión

III.4.1 Evaluación de actividad antimicrobiana *in vitro*

III.4.1.i Screening de actividad antimicrobiana *in vitro* y concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales

Todos los AE presentaron actividad antagonista sobre *L. innocua*, *Lb. plantarum, S. putrefaciens* y la flora nativa del pescado (Tabla III.4). El AE de romero generó el halo de mayor diámetro frente a *L. innocua* y el de tomillo sobre *L. plantarum*, ambas bacterias Gram positivas. El AE de lemongrass resultó ser el más efectivo sobre *S. putrefaciens* y el de romero el más efectivo sobre la flora nativa del pescado. La actividad antimicrobiana de los AE sobre dicha flora dependió del AE ensayado. Esta tendencia puede vincularse con la heterogeneidad frecuentemente presente en la flora nativa del pescado (Hassoun y Emir Çoban, 2017). Los resultados obtenidos se encuentran en línea con los reportados por Ács *et al.* (2018) quienes hallaron que el AE de tomillo en fase vapor posee actividad antagonista frente a microorganismos Gram negativos del género *Haemophilus*, y Gram positivos del género *Streptococcus*. Ninguno de los AE presentó actividad contra *P. aeruginosa* o *P. fluorescens*.

Tabla III.4: Diámetro de los halos de inhibición (mm) producidos por una concentración de 1,172 µl/ml de AE en el espacio de cabeza de la placa.

AE/microorganismo	*L. innocua*	*S. putrefaciens*	*L. plantarum*	Flora nativa del pescado
Lemongrass	$15,7 \pm 0,6^{aA}$	$36,0 \pm 4,4^{aB}$	$17,5 \pm 0,7^{aA}$	$13,0 \pm 1,7^{aA}$
Orégano	$21,3 \pm 0,6^{bA}$	$24,7 \pm 0,6^{bB}$	$20,7 \pm 1,2^{bA}$	$15,3 \pm 1,5^{aC}$
Tomillo	$22,5 \pm 0,7^{bA}$	$20,7 \pm 0,6^{cB}$	$25,3 \pm 2,1^{cC}$	$12,5 \pm 0,7^{aD}$
Romero	$24,2 \pm 0,5^{cA}$	$17,5 \pm 2,1^{dB}$	$21,0 \pm 1,4^{bC}$	$19,0 \pm 5,6^{bC}$

**La primera letra indica diferencias significativas entre AE y la segunda, en mayúsculas, diferencias significativas entre microorganismos.*

Al evaluar la CMI frente a *L. innocua* y *S. putrefaciens,* los AE que mostraron una mayor eficacia fueron los de orégano y lemongrass, dado que, una menor concentración de AE generaron halos de inhibición (Tabla III.5). El AE de romero y el de tomillo, solo afectaron a los microorganismos evaluados a la concentración inicial. En consecuencia, los AE de

lemongrass y orégano se seleccionaron para evaluar el tipo de interacción existente entre ellos al ser combinados, siendo lemongrass el “AE A” y orégano el “AE B” (Tabla III.3, MyM).

Tabla III.5: CMI de AE expresadas en µl de AE/ml de espacio de cabeza en la placa de Petri

AE/ microorganismo	*L. innocua*	*S. putrefaciens*
Lemongrass	0,293	0,146
Orégano	0,586	0,586
Romero	1,172	1,172
Tomillo	1,172	1,172

En cuanto a otros estudios realizados, Lee *et al.* (2018) evaluaron la CMI para *L. monocytogenes* de los AE de orégano y tomillo en fase vapor y determinaron que las mismas fueron de 0,078 µl/ml de espacio de cabeza, una concentración 10 veces menor a la obtenida para *L. innocua.*

III.4.1.ii Concentración fraccionaria inhibitoria de mezclas de aceites esenciales sobre *L. innocua* y *S. putrefaciens*

Respecto a *S. putrefaciens* todas las mezclas evaluadas mostraron actividad antagonista, con excepción de la mezcla D, que era la más diluida. Se verificó que la mezcla C funcionó de forma aditiva y la E y la F de forma sinérgica. En cuanto a *L. innocua,* sólo se observó un efecto aditivo en la mezcla C y un efecto sinérgico en la mezcla F. Las mezclas D y E no fueron capaces de inhibir el desarrollo de esta bacteria.

Tahlan (2014) informó un comportamiento sinérgico entre el AE de canela y el de orégano sobre *L. innocua* y *E. coli.* Las mezclas sinérgicas entre AE son comunes debido a la amplia gama de compuestos activos que están presentes en su composición y a los distintos mecanismos mediante los cuales actúan. Estos efectos incluyen, pero no se limitan a: pérdida y coagulación del contenido citoplasmático, permeabilización de la membrana y disrupción del gradiente de potasio (Cristiani *et al.,* 2007; Hemaiswarya *et al.,* 2011; Sikkema *et al.,* 1994).

Debido al fuerte efecto que poseen los AE sobre el aroma y el sabor de los alimentos, se seleccionó la mezcla F (tanto para *L. innocua* como para *S. putrefaciens*) para continuar con los ensayos, ya que fueron las mezclas más diluidas que preservaron la actividad antagonista. La mezcla FS representa la combinación de 1/2 de la CMI de lemongrass y 1/3

de la CMI de orégano sobre *S. putrefaciens* (0,073 µl/ ml de espacio de cabeza y 0,195 µl/ml, respectivamente); y la mezcla FL representa la combinación de las mismas fracciones de la CMI de los AE, pero sobre *L. innocua* (0,147 µl/ ml y 0,195 µl/ml respectivamente).

III.4.1.iii Acción de los aceites esenciales sobre la hidrofobicidad superficial de *L. innocua* y *S. putrefaciens*

Las dos concentraciones de AE estudiadas (dos veces la concentración de las mezclas sinérgicas FL y FS), generaron un aumento en la hidrofobicidad de la pared celular de las bacterias analizadas. Los resultados se muestran en la Tabla III.6. El aumento en la hidrofobicidad se relaciona directamente con cambios en la composición de la membrana celular e indica una mejor capacidad para generar biofilms, lo cual evidencia la activación de un mecanismo de adaptación como respuesta a las condiciones adversas del medio (Lee et al., 2019; Van Loosdrecht, 1987). En relación con la modificación en la composición de la membrana celular, por ejemplo, Cristani *et al.* (2007) hallaron que al exponer *Bacillus cereus* a una combinación de p-Cimeno y carvacrol (ambos componentes principales del AE de orégano), la composición de los lípidos de membrana resultó alterada.

Tabla III.6: Hidrofobicidad superficial de L. innocua y S. putrefaciens

	% hidrofobicidad	
	L. innocua	*S. putrefaciens*
Control	24,56 ± 4,50[a]	16,57 ± 2,74[a]
AE	38,22 ± 3,57[b]	29,41 ± 3,08[b]

González *et al.* (2021), evaluaron la hidrofobicidad de *Zygosaccharomyces bailii* al ser expuesta a nano-emulsiones de AE de lemongrass y de canela, obteniendo también un aumento en el parámetro estudiado. Adicionalmente, Schelegueda *et al.* (2016a), obtuvieron un aumento en la hidrofobicidad de *L. innocua* al ser tratada con quitosano y nisina, ambos agentes con actividad antagonista contra la cepa. Por otro lado, al exponer *S. putrefaciens* a los mismos antimicrobianos, que también poseían actividad inhibitoria contra ésta, no se observó un cambio en la hidrofobicidad de su membrana. Considerando los resultados mencionados previamente, si bien la hidrofobicidad de la pared celular se relaciona al daño celular, no siempre que exista daño en la célula se verá reflejado en una modificación de la hidrofobicidad superficial.

III.4.1.iv Evaluación de *E. mundtii* STw38 para aplicar como cultivo protector en presencia de aceites esenciales en fase vapor

Se decidió evaluar la supervivencia de *E. mundtii* STw38 frente a la mezcla FL debido a que resultaba más concentrada que la FS. Al aplicar la mezcla sinérgica FL, el crecimiento de la cepa STw38 no se vio afectado por su presencia, dado que la biomasa de las placas se desarrolló de igual manera en presencia o en ausencia de los AE. Adicionalmente, cuando se sembró el cultivo de *E. mundtii* STw38 sobre el césped de *L. innocua* en presencia de la mezcla FL, la cepa se desarrolló de manera adecuada y se formó un halo de inhibición alrededor de las estrías más allá de la zona de inhibición generada por la mezcla de AE (Figura III.10).

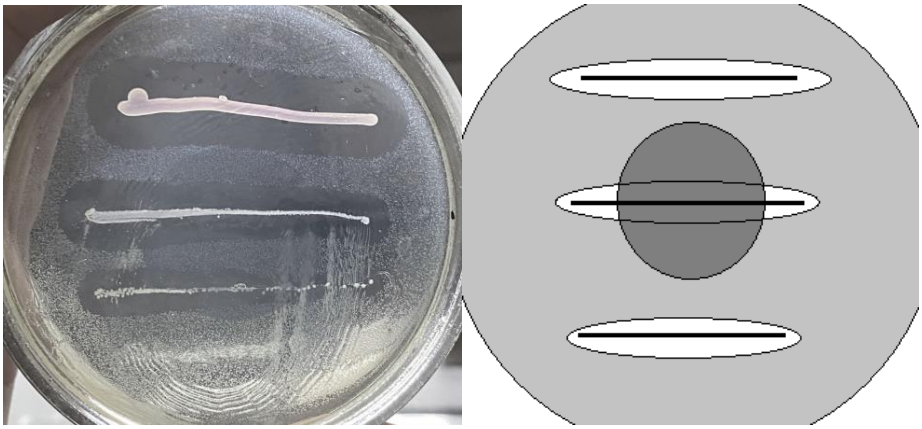


Figure III.10: Actividad antagonista de E. mundtii STw38 en presencia de la mezcla sinérgica de AE FL. ■ Césped de L. innocua; ■ Halo de inhibición debido a los AE en fase vapor; □ Halo de inhibición debido al crecimiento de E. mundtii STw38.

En investigaciones anteriores, cepas de *E. faecalis* resistentes a la vancomicina fueron inhibidas debido a AE de orégano y de tomillo, al igual que *E. aquimarinus, E. faecium* y *E. moravensis* -aisladas de pescado fresco- que fueron sensibles a 15 AE, incluyendo *Citrus aurantium* y *Citrus limon* (Benbelaïd *et al.,* 2014; Klūga *et al.,* 2021). Todos los ensayos anteriormente mencionados se realizaron por medio del método de difusión en disco tradicional y no en fase gaseosa (Klancnik *et., al*, 2010). Según lo investigado, no existen estudios hasta este momento que hayan evaluado el efecto de AE en fase vapor sobre *E. mundtii,* debido a que no es una especie comúnmente relacionada a enfermedades en humanos por no poseer los factores de virulencia generalmente asociados a este género (Fisher y Phillips, 2009). Dada la supervivencia de *E. mundtii* STw38 en presencia de los

AE, se decidió aplicar la cepa para mejorar la preservación de filetes de merluza refrigerados.

En esta sección fue posible caracterizar la actividad antagonista de los AE en fase vapor, siendo los AE de orégano y de lemongrass los que presentaron una menor CMI frente a las bacterias estudiadas. También se comprobó una actividad sinérgica entre ambos aceites, y las mezclas seleccionadas fueron capaces de aumentar la hidrofobicidad superficial tanto de L. innocua como de S. putrefaciens. Finalmente, fue posible comprobar que la bacteria E. mundtii STw38 pudo crecer en presencia de los AE y producir inhibición frente a L. innocua.

III.4.2 Análisis químico de la composición de los aceites esenciales seleccionados

Los principales compuestos presentes en el AE de lemongrass resultaron ser geranial, neral, geraniol, geranil acetato y β-cariofileno. En cuanto al AE de orégano, los principales fueron carvacrol, p-cimeno, γ-terpineno β-cariofileno y α-pineno (Tabla III.7). Respecto a los dos componentes principales del AE de orégano (carvacrol y p-cimeno), los resultados hallados coinciden con los de Reyes-Jurado *et al.* (2019), mientras que el resto de los componentes principales están presentes, pero en menores concentraciones. Lo opuesto sucede con el AE de lemongrass, dado que su composición varía ampliamente con lo analizado por Do *et al.* (2021), siendo los principales compuestos α-citral y β-Micereno.

El componente principal de la mezcla sinérgica FL fue p-cimeno, el cual constituye un 40 % de su composición. Esta molécula se encuentra presente en el AE de orégano y es altamente volátil, lo cual explicaría por qué ésta representa una alta concentración de la fase vapor. Lo mismo sucede con el α-pineno, mirceno y γ terpineno, todos presentes, también, en el AE de orégano. Por otro lado, el carvacrol, es uno de los componentes menos volátiles presentes en el AE de orégano, pero al ser el mayoritario, igualmente la fracción evaporada es suficiente para que éste sea uno de los componentes principales. El neral y el geranial son los componentes mayoritarios del AE de lemongrass, consecuentemente también son de los principales compuestos presentes en la mezcla volátil. Finalmente, el limoneno, linalool y β-cariofileno están presentes en la fase vapor, y ambos compuestos están presentes en los dos AE estudiados. Entonces, es posible concluir que la mayoría de los compuestos presentes en la fase vapor pertenecen al AE de

orégano, o bien son los componentes principales de este AE; o son compuestos altamente volátiles.

Tabla III.7: Concentraciones de los compuestos del aceite esencial de orégano, lemongrass, y de la fracción volátil de la mezcla FL.

Compuesto	AE de orégano	AE de lemongrass	Mezcla FL
α pineno	1,3	0,4	**4,2**
Canfeno	0,1		1,5
Mirceno	**1,9**		**7,3**
β pineno	0,5		0,8
α felandreno	0,1		0,7
α terpineno	0,7		2,5
Para cimeno	**12,5**		**40,8**
Limoneno	1,2	0,2	**3,9**
β felandreno			0,8
1,8- cineol	0,4		1,2
γ terpineno	**3,5**		**15,3**
Linalol	2	1,3	2,5
Borneol	0,4		0,2
Terpinen-4-ol	0,3		0,2
Neral		**31,2**	2,8
Geranial		**44,8**	2,7
Carvacrol	**67,1**		3,7
β cariofileno	**4,3**	**1,8**	2,8
Metilheptenona		0,7	
Cis-isocitral		0,4	
Trans-isocitral		1	
Geraniol		**5,1**	
Geranil acetato		**4,5**	
α-Ylangeno		0,2	
β-Elemeno		0,5	
α-Humuleno		0,2	
γ-Cadinin		1	
D-Cadinin		0,5	
α-Thujeno		0,3	
β-bisaboleno	0,2	0,2	
Óxido de cariofileno	0,6	0,6	

* Los valores **destacados** marcan los 5 componentes principales de cada AE

En cuanto al p-cimeno, que es el componente principal de la mezcla en fase gaseosa, se conoce que posee actividad antagonista frente a una amplia gama de microorganismos

tales como *L. innocua*, *S. aureus*, y *E. coli* (Marchese *et al.,* 2017). Adicionalmente, el AE de comino que contiene β-pineno, p-cimeno y γ-terpineno, resultó efectivo contra *P. aeruginosa, E. coli, L. innocua, y S. aureus*, bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas (Alizadeh Behbahani *et al.,* 2019), al igual que la mezcla sinérgica ensayada. Finalmente, es importante destacar que, debido a la complejidad en la composición de los AE, no es únicamente importante la actividad de uno de los compuestos, sino también la interacción entre ellos. Por ejemplo, Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn (2010) descubrieron que el p-cimeno, por sí mismo no poseía actividad antagonista contra *Vibrio cholerae*, pero, al ser aplicado junto con carvacrol mejoraba la actividad del último.

En esta sección fue posible determinar la composición de los AE de orégano, de lemongrass y de la fase gaseosa de la mezcla sinérgica FL, constituida por ambos AE. Los principales componentes de dicha la mezcla pertenecen al AE de orégano o son compuestos altamente volátiles.

III.4.3 Aplicación de los antimicrobianos estudiados en filetes de merluza

III.4.3.i Análisis microbiológico

El recuento inicial de los filetes de merluza frescos fue de $5x10^3$ UFC/g indicando un buen estado higiénico. Adicionalmente, el de los enterococos en los filetes inoculados con *E. mundtii* STw38 fue de $3,1x10^6$ UFC/g, mostrando una correcta inoculación de la cepa bacteriocinogénica. Ésta sobrevivió durante todo el almacenamiento, aunque no incrementó su población total.

En cuanto al recuento de bacterias totales, al segundo día todos los sistemas tuvieron un incremento de aproximadamente 1,7 ciclos logarítmicos, con excepción del sistema S-STw, cuyo recuento permaneció constante (Tabla III.8). Luego de 5 días de almacenamiento, los recuentos de bacterias totales en los sistemas S-C, S-A y S-FS tuvieron un aumento mayor a 5 ciclos logarítmicos, excediendo así el recuento total máximo permitido para pescado fresco por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 1986). Debido a esto, los recuentos de estos sistemas no se continuaron. El

recuento del sistema S-FL mostró un incremento de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos mientras que el recuento total del sistema S-STw se mantuvo constante.

Tabla III.8: Recuento total de microorganismos en filetes de merluza a lo largo del almacenamiento, expresado como Log(N/No)

	Día 2	Día 5	Día 7
S-C	1,87 ± 0,13 ^{Aa}*	>7,00^{Ab}	
S-A	1,63 ± 0,20 ^{Aa}	5,41 ± 0,20 ^{Bb}	
S-FS	1,70 ± 0,28 ^{Aa}	6,15 ± 0,79 ^{Bb}	
S-FL	1,73 ± 0,15 ^{Aa}	3,41 ± 0,12 ^{Cb}	5,86 ± 0,12 ^{Ac}
S-STw	0,04 ± 0,17 ^{Ba}	0,58 ± 0,17 ^{Ca}	3,00 ± 0,10 ^{Bb}

Las letras en mayúsculas representan las diferencias significativas entre sistemas en un mismo tiempo, mientras que las letras en minúscula representan las diferencias entre los diferentes días para un mismo sistema.

Finalmente, luego de 7 días de almacenamiento, el recuento en el sistema S-FL tuvo un aumento de más de 5 ciclos logarítmicos, excediendo el límite máximo permitido, pero el sistema S-STw, sólo aumentó 3 ciclos logarítmicos. Aunque el recuento final del sistema S-STw fue mayor a 10^9 CFU/g, no existe una población bacteriana máxima para pescado adicionado con cultivos protectores, probióticos o fermentados, según las autoridades regulatorias como se mencionó en el Capítulo I (Sección I.4.8). Adicionalmente, en pruebas preliminares, las muestras no presentaron el característico olor a pescado en descomposición luego de los 7 días de almacenamiento. Daramola *et al.* (2020), informaron recuentos totales de 10^8 UFC/g en filetes de bacalao salados y fermentados y concluyeron que independientemente del alto recuento, la biopreservación era adecuada ya que fue posible inhibir el crecimiento de bacterias deteriorativas y extender la vida útil del pescado.

Los resultados comentados permiten concluir que la mezcla de AE FL fue la más efectiva para controlar el recuento total de bacterias nativas del pescado y, también, que la adición del cultivo protector mejoró significativamente el efecto de la mezcla sinérgica de AE.

Previamente, Boulares *et al.,* (2018) evaluaron la efectividad de AE de citrus (*Citrus limon)* en contacto directo con filetes de corvina (*Dicentrarchus labrax*) envasados al vacío junto con diferentes combinaciones de BAL como cultivos protectores. Sus resultados muestran que al aplicar únicamente los AE, sólo se obtiene una pequeña disminución del recuento total de microorganismos en comparación al control. Al aplicar una de las mezclas de

cultivos protectores (*Lactococcus lactis* y *Carnobacterium piscicola)*, junto con los AE, se logró una disminución del recuento total de bacterias de 1 ciclo logarítmico por 21 días, mientras que otras mezclas de bacterias (tales como *L. lactis* y *L. plantarum)* no fueron capaces de controlar la flora nativa en estas condiciones. Estos resultados confirman que la biopreservación de productos de la pesca depende de las cepas utilizadas, de los factores de conservación adicionales utilizados y de la clase de pescado.

En cuanto a la eficiencia de la cepa bacteriocinogénica *E. mundtii* STw38 sobre los recuentos de la microflora nativa de pescado, en el capítulo anterior se mencionó que, utilizando solo el cultivo protector en filetes de merluza almacenados bajo refrigeración, se obtuvo un incremento de 3 ciclos logarítmicos al cabo de 6 días, en lugar de 7 días, lo cual sugiere una mejora al adicionar la mezcla sinérgica de AE FL.

III.4.3.ii Análisis sensorial

En la evaluación del aroma y el sabor de los filetes expuestos a los AE por 24 horas se observaron algunas diferencias significativas entre los sistemas (Tabla III.9). En cuanto al aroma, todos los sistemas tuvieron el mismo nivel de aceptación con excepción del sistema conteniendo AE de lemongrass (LG) el cual obtuvo un nivel de aceptación ligeramente menor.

En cuanto al sabor, el sistema de menor nivel de aceptabilidad fue, nuevamente, el que contenía el AE de lemongrass. El control y las mezclas FL y FS presentaron un nivel de aceptabilidad similar. Tanto en sabor como en aroma, el control presentó valores por encima del nivel de aceptabilidad (5), y las medias de los sistemas adicionados con las mezclas sinérgicas fueron algo mayores. Estos resultados demuestran que ambas mezclas sinérgicas de AE fueron aceptada por los panelistas.

Tabla III.9: Evaluación sensorial de filetes de merluza, tratadas con AE en una escala hedónica entre 1 y 9.

	Control	LG	FS	FL
Aroma	$5,8 \pm 0,8^{a}$	$5 \pm 0,9^{a}$	$7 \pm 1,6^{b}$	$6,8 \pm 1,1^{b}$
Sabor	$6,7 \pm 1,1^{a}$	$5,1 \pm 1,3^{b}$	$7 \pm 1,6^{a}$	$6,9 \pm 1,2^{a}$

Resulta de interés agregar que los AE poseen un aroma y un sabor intenso, como se demuestra en estudios anteriores, y que las cantidades requeridas para obtener un efecto antimicrobiano adecuado no son siempre aceptadas por los consumidores cuando el AE se

agrega directamente al alimento (De olivera *et al.,* 2013; Hassoun y Emir Çoban, 2017; Reyes *et al.,* 2019). Por ejemplo, Frangos *et al.* (2010) al aplicar AE de orégano (0,2 %) en filetes de trucha junto con envasado al vacío y refrigeración, no lograron una mejora en los recuentos totales de bacterias a lo largo de 20 días de almacenamiento. Al utilizar una concentración de 0,4 % del AE lograron disminuir el recuento bacteriano total en medio ciclo logarítmico, pero esta concentración no fue aceptada por los consumidores. En la presente investigación, no sólo se logró una mejora del recuento total al aplicar la mezcla FL en fase vapor, sino que también fue aceptada por el panel sensorial.

En esta sección fue posible mejorar la calidad microbiológica de filetes de merluza almacenados con AE en fase vapor, con o sin el agregado del cultivo protector STw38. Al aplicar la mezcla de AE FL, los recuentos de bacterias totales se mantuvieron a niveles aceptables durante 5 días, mientras que, al adicionar también la cepa STw38, se logró controlar el desarrollo de la flora nativa por 7 días

III.5 Conclusiones

Todos los AE presentaron actividad antagonista contra *L. innocua, L. plantarum, S. putrefaciens,* y la flora nativa del pescado *in vitro.* Los más efectivos fueron los de orégano y lemongrass ya que presentaron una CMI menor. Al ser utilizados en forma combinada se obtuvo un efecto sinérgico. Al aplicar la mezcla sinérgica FL, constituida por 0,147 µl/ ml de AE de lemongrass y 0,195 µl/ml de AE de orégano, en filetes de merluza ésta tuvo la capacidad de disminuir el recuento total de bacterias por 5 días y, al adicionar la cepa bacteriocinogénica *E. mundtii* STw38, se obtuvo una disminución de los recuentos totales de bacterias por 7 días. Adicionalmente, las mezclas de AE aplicadas al pescado fueron aceptadas por los consumidores, y en algunos casos, incluso fueron preferidas frente al control.

En conclusión, la investigación en AE en fase vapor junto con cultivos protectores parece ser una técnica natural prometedora para utilizar en filetes de pescado, en combinación con el almacenamiento refrigerado.

Conclusiones

En el **primer capítulo**, fue posible seleccionar 22 cepas bacteriocinogénicas a partir de 121 BAL aisladas de distintos especímenes marinos provenientes de la costa patagónica. Todas las cepas que presentaron actividad antagonista frente a *L. innocua* se identificaron como *Enterococcus mundtii.* Se verificó la ausencia de los genes que codifican para factores de virulencia y la expresión fenotípica de éstos en todos los casos, indicando la viabilidad de su aplicación en alimentos.

Por otra parte, se comprobó que la actividad antagonista de los SLC producidos por las BAL en estudio sobre *L. innocua* se debía a un compuesto de naturaleza proteica y se descartó la contribución del pH ácido y del peróxido de hidrógeno en la inhibición. También se detectaron los genes que codifican para dos bacteriocinas (mundticina KS y enterocina L50A) en 17 de las cepas, y en las restantes 5 únicamente los genes que codifican para la producción de la mundticina KS. Debido a la ausencia de factores de virulencia, y su capacidad para producir bacteriocinas, las cepas seleccionadas resultaron de interés para su aplicación en alimentos.

Los SLC de las 22 cepas preseleccionadas presentaron actividad antagonista contra *L. plantarum* y *L. innocua.* Al evaluar su título frente a estos microorganismos indicadores, se logró seleccionar las 6 cepas cuyos SLC mostraron mayor actividad (*E. mundtii* STw 26, 38, 46, 60, 66 y 79). Se evaluó el tipo de interacción existente entre mezclas binarias de dichos SLC, utilizando el modelo de Berembaum, en todos los casos, ésta resultó aditiva. Luego, se seleccionó una cepa con capacidad para desarrollarse y producir bacteriocinas en condiciones de refrigeración (4 °C). La cepa seleccionada fue *E. mundtii* STw38 ya que su SLC presentó un mayor título frente a *L. innocua* y el segundo título más elevado frente a *L. plantarum.*

Al aplicar la cepa *E. mundtii* STw38 como cultivo protector en pasta de merluza refrigerada, se observó un control en el desarrollo de las bacterias aerobias mesófilas por 6 días, al almacenar la pasta en aire; y por 10 días al almacenarla al vacío.

En el **segundo capítulo**, con miras de emplear bacteriocinas semipurificadas en la preservación de pescado, se seleccionó la cepa bacteriocinogénica STw66 por su mayor actividad antagonista sobre la flora nativa aislada de pescado refrigerado, para luego purificar parcialmente su SLC aplicando dos técnicas diferentes. La primera técnica de purificación se realizó por medio de una columna de interacción hidrofóbica y un cartucho de extracción de fase sólida obteniéndose una actividad antagonista contra *L. innocua* remanente de 0,45 % con respecto al SLC. La segunda técnica consistió en la adsorción selectiva de las bacteriocinas a las células productoras. Para ello, previamente, se seleccionó el pH de adsorción y de desorción (7,0 y 3,0 respectivamente) y la proporción

SLC: bacterias, obteniéndose una mejora al utilizar la mitad del SLC con la totalidad de las bacterias productoras, y repetir el proceso de purificación dos veces sobre las mismas células. En este caso, la actividad remanente fue del 5 % y se optó por esta semipurificación para continuar con ensayos aplicados a alimentos.

Las bacteriocinas semipurificadas se incorporaron por pulverización sobre trozos de salmón refrigerado, previa optimización de las condiciones de aplicación, para estudiar su efecto sobre la calidad microbiológica del alimento. Se utilizaron 0,013 g de bacteriocinas semipurificadas por gramo de salmón, lo cual equivaldría a 1,8 ml del SLC. De esta forma, fue posible controlar la población de *L. innocua* durante 3 días.

En el **tercer capítulo**, se evaluó la capacidad de los AE de lemongrass, orégano, tomillo y romero aplicados en fase vapor para inhibir el desarrollo de bacterias de colección y de la flora nativa del pescado. Los AE presentaron actividad antagonista contra *L. innocua*, *S. putrefaciens*, *L. plantarum* y la flora nativa del pescado. Para medir los títulos se seleccionó *L. innocua* como patógeno subrogante y *S. putrefaciens* como microorganismo representante de la flora deteriorativa. Los AE de tomillo y romero sólo presentaron actividad a concentraciones de 1,172 µl de AE/ml de espacio de cabeza; mientras que el de orégano frente a *S. putrefaciens* y *L. innocua,* demostró actividad antagonista hasta una concentración de 0,586 µl /ml. Finalmente el AE con mayor actividad fue el de lemongrass, inhibiendo el desarrollo de *L. innocua* a una concentración de 0,293 µl /ml y el de *S. putrefaciens* a una concentración de 0,146 µl /ml.

Pudo comprobarse la actividad sinérgica de los AE de lemongrass y orégano contra *L. innocua* y *S. putrefaciens.* Las mezclas sinérgicas con menor concentración de AE fueron de 0,073 µl/ml de lemongrass y de 0,195 µl/ml de orégano contra *S. putrefaciens* (mezcla FS) y de 0,147 µl/ ml de lemongrass y 0,195 µl/ml de orégano contra *L. innocua* (mezcla FL) siendo esta mezcla la seleccionada para utilizar en la preservación de pescado.

Fue posible determinar los componentes volátiles de la mezcla de AE FL y observar que la mayoría correspondían al AE de orégano, y el resto, a los componentes principales del AE de lemongrass. Los componentes mayoritarios de la mezcla resultaron ser p-cimeno y *γ* terpineno; los del AE de lemongrass, neral y geranial; y los del AE de orégano p-cimeno y carvacrol.

La utilización de la mezcla FL en fase vapor para la preservación de filetes de merluza permitió controlar la calidad microbiológica por 5 días. Al adicionar la mezcla FL junto con *E. mundtii* STw38 como cultivo protector, fue posible mantener la calidad microbiológica de los filetes por 7 días. Por otra parte, al analizar la aceptabilidad sensorial de filetes de merluza

tratados con los AE, se comprobó que ambas mezclas sinérgicas resultaron adecuadas, obteniéndose puntuaciones iguales al control tanto para sabor como para aroma.

En base a lo comentado previamente, es posible concluir que la cepa *E. mundtii* STw38 resultó segura para aplicar en alimentos y puede mejorar la calidad microbiológica de pasta y filetes de merluza, aplicada como cultivo protector. La semipurificación del SLC de la cepa STw66 logró controlar el crecimiento de *L. innocua* en piezas de salmón. Resulta de interés destacar que los AE lograron una mejora en la conservación de filetes de merluza y son compatibles con el agregado de *E. mundtii* STw38 como cultivo protector, lográndose una mejora en su capacidad de biopreservación.

Dada la información presentada, ha sido posible determinar que, con la aplicación de las técnicas citadas, se logró obtener pescado fresco con una mejor calidad microbiológica en refrigeración, sin la necesidad de utilizar conservantes químicos. Asimismo, la tesis en cuestión presenta evidencia sólida para permitir la realización de más investigaciones sobre biopreservación de productos de la pesca a través del uso de BAL y AE en fase vapor.

Dentro de las perspectivas futuras, resultaría promisorio aplicar las bacteriocinas semipurificadas en combinación con AE en fase vapor, o con *E. mundtii* STw38 como cultivo protector. Adicionalmente, dados los buenos resultados obtenidos al combinar la cepa STw38 con el envasado al vacío, sería interesante aplicar dicho factor o el envasado en atmósfera modificada, junto con las técnicas estudiadas en la presente tesis, en búsqueda de mejorar el desempeño de dichos biopreservadores.

Bibliografía

Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H. 2014. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control Listeria monocytogenes inoculated in minced fish meat. Food Control, 35, 177-183.

Ács, K., Balázs, V.L., Kocsis, B., Bencsik, T., Böszörményi, A., Horváth, G., 2018. Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. BMC Complement. Altern. Med. 18, 1–9.

Adams, M.R., 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. J. Biotechnol. 68, 171–178.

Adelakun, O. E., Oyelade, O. J., Olanipekun, B. F., 2016. Use of essential oils in food preservation. In Essential oils in food preservation, flavor and safety (pp. 71-84). Academic Press.

Aguilar-Galvez, A., Guillermo, S., Dubois-Dauphin, R., Campos, D., Thonart, P., 2011. The influence of growth conditions on enterocin-like production by Enterococcus faecium CWBI-B1430 and Enterococcus mundtii CWBI-B1431 isolates from artisanal Peruvian cheeses. Annals of microbiology, 61(4), 955-964.

Al Bulushi, I.M., Poole, S.E., Barlow, R., Deeth, H.C., Dykes, G.A., 2010. Speciation of Gram-positive bacteria in fresh and ambient-stored sub-tropical marine fish. Int. J. Food Microbiol. 138, 32–38.

Alexandraki, V., Effie, T., Konstantinos, P., Wilhelm, H., 2013. Status And Trends Of The Conservation And Sustainable Use Of Micro-Organisms In Food Processes. Food Agric. Organ. 1–7.

Al-Hashimi A., Ammar, A. B., Cacciola, F., Lakhssassi, N., 2020. Development of a millet starch edible film containing clove essential oil. *Foods*, *9*(2), 184.

Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., Falah, F., 2019. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. Microb. Pathog. 136, 103716.

Almeida, T., Brandao, A., Muñoz-Atienza, E., Gonc, A., Torres, C., Igrejas, G., 2014. Identification of bacteriocin genes in enterococci isolated from game animals and saltwater fish. Journal of Food Protection, 74(8), 1252–1260.

Alparslan Y., Hasanhocaoğlu Yapıcı H., Metin C., Baygar T., Günlü A., Baygar T., 2016. Quality assessment of shrimps preserved with orange leaf essential oil incorporated gelatin. LWT - Food Science and Technology, Volume 72, Pages 457-466, ISSN 0023-6438.

Alresly, Z., Lindequist, U., Lalk, M., Porzel, A., Arnold, N., Wessjohann, L.A., 2015. Bioactive triterpenes from the fungus Piptoporus betulinus. Rec. Nat. Prod. 10, 103–108.

Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O.P., 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. Appl. Microbiol. Biotechnol. 100, 2939–2951.

Alzamora, S. M., Guerrero, S. N., Raffellini, S., Ferrario, M., Schenk, M. 2016. Hurdle technology in fruit processing. In *Fresh-Cut Fruits and Vegetables* (pp. 131-168). CRC Press.

Amit, S.K., Uddin, M.M., Rahman, R., Islam, S.M.R., Khan, M.S., 2017. A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. Agric. Food Secur. 6, 1–22.

Amorati, R., Baschieri, A., Morroni, G., Gambino, R., Valgimigli, L., 2016. Peroxyl radical reactions in water solution: A gym for proton-coupled electron-transfer theories. Chemistry – A European Journal, 22(23), 7924–7934.

Anacarso, I., Messi, P., Condò, C., Iseppi, R., Bondi, M., Sabia, C., de Niederhäusern, S., 2014. A bacteriocin-like substance produced from Lactobacillus pentosus 39 is a natural antagonist for the control of Aeromonas hydrophila and Listeria monocytogenes in fresh salmon fillets. LWT - Food Sci. Technol. 55, 604–611.

Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia, E., 2007. Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol. 475–486.

Ananou, S., Zentar, H., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E., 2014. The impact of enterocin AS-48 on the shelf-life and safety of sardines (Sardina pilchardus) under different storage conditions. Food Microbiol. 44, 185–195.

Anastasiou, T.I., Mandalakis, M., Krigas, N., Vézignol, T., Lazari, D., Katharios, P., Dailianis, T., Antonopoulou, E., 2020. Comparative evaluation of essential oils from medicinal-aromatic plants of Greece: Chemical composition, antioxidant capacity and antimicrobial activity against bacterial fish pathogens. Molecules 25.

Arbulu, S., Jiménez, J.J., Gútiez, L., Campanero, C., Del Campo, R., Cintas, L.M., Herranz, C., Hernández, P.E., 2016. Evaluation of bacteriocinogenic activity, safety traits and biotechnological potential of fecal lactic acid bacteria (LAB), isolated from Griffon Vultures (Gyps fulvus subsp. fulvus). BMC Microbiol. 16, 1–15.

Arias, C. A., Panesso, D., Singh, K. V., Rice, L. B., Murray, B. E., 2009. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylEfm-containing virulence plasmid in Enterococcus faecium. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*(10), 4240-4246.

Arias-Moliz, M. T., Ferrer-Luque, C. M., Espigares-García, M., Baca, P., 2009. Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. Journal of Endodontics, 35(5), 711-714.

Aspri, M., Field, D., Cotter, P.D., Ross, P., Hill, C., Papademas, P., 2017. Application of bacteriocin-producing Enterococcus faecium isolated from donkey milk, in the biocontrol of Listeria monocytogenes in fresh whey cheese. Int. Dairy J. 73, 1–9.

Aymerich, T., Rodríguez, M., Garriga, M., Bover-Cid, S., 2019. Assessment of the bioprotective potential of lactic acid bacteria against Listeria monocytogenes on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 8 °C. Food Microbiol. 83, 64–70.

Bahurmiz, O.M., Ahmad, R., Ismail, N., Adzitey, F., Sulaiman, S.F., 2020. Antimicrobial Activity of Selected Essential Oils on Pseudomonas Species Associated with Spoilage of Fish with Emphasis on Cinnamon Essential Oil. J. Aquat. Food Prod. Technol. 29, 789–800.

Balciunas, E.M., Castillo Martinez, F.A., Todorov, S.D., Franco, B.D.G. de M., Converti, A., Oliveira, R.P. de S., 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. Food Control 32, 134–142.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J. Pharm. Anal. 6, 71–79.

Baños, A., García-López, J. D., Núñez, C., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., Valdivia, E., 2016. Biocontrol of Listeria monocytogenes in fish by enterocin AS-48 and Listeria lytic bacteriophage P100. LWT – Food Science and Technology, 66, 672-677.

Barakat, R. K., Griffiths, M. W., Harris, L. J., 2000. Isolation and characterization of Carnobacterium, Lactococcus, and Enterococcus spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. International journal of food microbiology, 62(1-2), 83-94.

Baschieri, A., Ajvazi, M.D., Tonfack, J.L.F., Valgimigli, L., Amorati, R., 2017. Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. Food Chem. 232, 656–663.

Belgacem, Z. B., Abriouel, H., Omar, N. B., Lucas, R., Martínez-Canamero, M., Gálvez, A., 2010. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological proper- ties of bacteriocinogenic Enterococcus faecium from artisanal Tunisian fermented meat. Food Control, 21, 462–470.

Benbelaïd, F., Khadir, A., Abdoune, M.A., Bendahou, M., Muselli, A., Costa, J., 2014. Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant Enterococcus faecalis in both planktonic and biofilm state. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 4, 463–472.

Berenbaum, M. C., 1978. A method for testing for synergy with any number of agents. Journal of Infectious Diseases, 137(2), 122-130.

Bhavaniramya, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M.S., Vijayakumar, R., Baskaran, D., 2019. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. Grain Oil Sci. Technol. 2, 49–55.

Bisset, S. W., 2019. Understanding the mechanism of action of the glycosylated bacteriocin glycocin F: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Biochemistry at Massey University, Manawatu, New Zealand (Doctoral dissertation, Massey University).

Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins. Electrophoresis 8, 93–99.

Boulares, M., Ben Moussa, O., Mankai, M., Sadok, S., Hassouna, M., 2018. Effects of Lactic Acid Bacteria and Citrus Essential Oil on the Quality of Vacuum-Packed Sea Bass

(Dicentrarchus labrax) Fillets During Refrigerated Storage, Journal of Aquatic Food Product Technology. Taylor Francis.

Boulares, M., Mankai, M., Sadok, S., Hassouna, M., 2017. Anti-Listerial inhibitory lactic acid bacteria in fresh farmed sea bass (Dicentrarchus labrax) fillets during storage at 4 °C under vacuum-packed conditions. J. Food Saf. 37.

Boziaris, I. S., Chorianopoulos, N. G., Haroutounian, S. A., Nychas, G. J., 2011. Effect of Satureja thymbra essential oil on growth–no growth interfaces of Listeria monocytogenes Scott A and Salmonella Enteritidis PT4, at various temperatures, pH, and water activities. Journal of food protection, 74(1), 45-54.

Cahill, M.M., 1990. Bacterial flora of fishes: A review. Microb. Ecol. 19, 21–41.

Cai, L., Cao, A., Li, Y., Song, Z., Leng, L., Li, J., 2015. The effects of essential oil treatment on the biogenic amines inhibition and quality preservation of red drum (Sciaenops ocellatus) fillets. Food Control 56, 1–8.

Campos, C. A., Aubourg, S. P., Schelegueda, L. I., 2022. Use of biopreservation to improve the quality of fresh aquatic products. In Postharvest and Postmortem Processing of Raw Food Materials (pp. 343-378). Woodhead Publishing.

Campos, C. A., Castro, M. P., Aubourg, S. P., Velázquez, J. B., 2012. Use of natural preservatives in seafood. In Novel Technologies in Food Science (pp. 325-360). Springer, New York, NY.

Campos, C. A., Miranda, J. M., Trigo, M., Barros-Velázquez, J., Aubourg, S. P., 2019. Effect of alga Undaria pinnatifida ("wakame") extract on the quality evolution of chilled megrim (Lepidorhombus whiffiagonis). Bulg. Chem. Commun, 51, 137-143.

Campos, C. A., Rodríguez, Ó., Losada, V., Aubourg, S. P., Barros-Velázquez, J., 2005. Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (Sardina pilchardus). International journal of food microbiology, 103(2), 121-130.

Campos, C.A., Rodríguez, Ó., Calo-Mata, P., Prado, M., Barros-Velázquez, J., 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from Lactococcus lactis, Enterococcus faecium and Enterococcus mundtii strains isolated from turbot (Psetta maxima). Food Res. Int. 39, 356–364.

Castro, M.P., Palavecino, N.Z., Herman, C., Garro, O.A., Campos, C.A., 2011. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. Meat Sci. 87, 321–329.

Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Łaniewska-Trokenheim, Ł., 2017. Virulence factors of Enterococcus spp. presented in food. LWT - Food Sci. Technol. 75, 670–676.

Chanthaphon A., Chanthachum, S. and Hongpattarakere T. 2008. Antimicrobial Activities of Essential Oils and Crude Extracts from Tropical Citrus spp. against Food-Related Microorganisms. Songklanakarin J. Sci. Technol. 30(1): 125-131.

Char, C., Guerrero, S., Alzamora, S.M., 2009. Survival of Listeria innocua in thermally processed orange juice as affected by vanillin addition. Food Control 20, 67–74.

Choi H. J., Cheigh C. I., Kim S. B., Pyun Y. R., 2000. Production ofa nisin-like bacteriocin by Lactococcus lactis subsp. lactis A164 isolated from Kimchi. J Appl Microbiol 88:563–571

Christenson D. P. y Hutkins R.W., 1992. Collapse of the proton motive force in L. monocytogenes caused by a bac- teriocin produced by Pediococcus acidilactici. Appl Environ Microbiology 58:3312–3315

Chumchalova J., Stiles J., Josephsen J., Plockova M., 2004. Characterization and purification of acidocin CH5, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus CH5. J Appl Microbiol 96: 1082–1089

Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F., 2000. Biochemical and genetic evidence that Enterococcus faecium L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin p, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. J. Bacteriol. 182, 6806–6814.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 30th ed. CLSI supplement M100. Table 2D. Zone Diameter and MIC Breakpints for Enterococcus spp. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Codigo Alimentario Argentino, 2011. Capítulo XVI: Correctivos y coadyuvantes

Código Alimentario Argentino, 2021.

Coelho, M.C., Silva, C.C.G., Ribeiro, S.C., Dapkevicius, M.L.N.E., Rosa, H.J.D., 2014. Control of Listeria monocytogenes in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 191, 53–59.

Colombo, M., Nero, L.A., Todorov, S.D., 2020. Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems. Brazilian J. Microbiol. 51, 787–795.

Corrado, S., Sala, S., 2018. Food waste accounting along global and European food supply chains: State of the art and outlook. Waste Manag. 79, 120–131.

Cristani, M., D'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Micieli, Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A., Trombetta, D. 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. Journal of agricultural and food chemistry, 55(15), 6300-6308

Cui, Y., Luo, L., Wang, X., Lu, Y., Yi, Y., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., Xin, L., 2021. Mining, heterologous expression, purification, antibactericidal mechanism, and application of bacteriocins: A review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 20, 863–899.

Daramola, J.A., Oladosu, T.O., Ismail, K.S., 2020. Fermentation and Effect on the Microbial Loads of Atlantic Cod, *Gadus morhua*. J. Appl. Sci. Environ. Manag. 24, 459–465.

de Arauz, L.J., Jozala, A.F., Mazzola, P.G. and Penna, T.C.V., 2009. Nisin biotechno-logical

production and application: a review. Trends Food Sci. Technol. 20: 146-154

De Kwaadsteniet, M., Todorov, S.D., Knoetze, H., Dicks, L.M.T., 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by Enterococcus mundtii ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Int. J. Food Microbiol. 105, 433–444.

de Oliveira Cruz, E. M., Costa-Junior, L. M., Pinto, J. A. O., de Alexandria Santos, D., de Araujo, S. A., de Fátima Arrigoni-Blank, M., ... Blank, A. F., 2013. Acaricidal activity of Lippia gracilis essential oil and its major constituents on the tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Veterinary Parasitology, 195(1-2), 198-202.

De Vuyst, L. D., Vandamme, E. J., 1994. Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. In Bacteriocins of lactic acid bacteria (pp. 1-11). Springer, Boston, MA.

De Vuyst, L., Foulquié Moreno, M.R., Revets, H., 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. Int. J. Food Microbiol. 84, 299–318.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16, 1058–1071.

Devillers, J., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., 1989. The usefulness of the agar-well diffusion method for assessing chemical toxicity to bacteria and fungi. Chemosphere, 19(10-11), 1693-1700.

Do, D. N., Nguyen, H. T. T., Huynh, T. H., Nguyen, N. P., Luu, X. C. 2021. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of lemongrass (Cymbopogon citratus) essential oil and its fractions obtained by vacuum distillation. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 1166, No. 1, p. 012051). IOP Publishing.

Domig, K. J., Mayer, H. K., Kneifel, W., 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of Enterococcus spp.: 2. Pheno-and genotypic criteria. International journal of food microbiology, 88(2-3), 165-188.

Dong, L., Wichers, H.J., Govers, C., 2019. Beneficial health effects of chitin and chitosan. Chitin Chitosan Prop. Appl. 145–167.

Dorman, H. D., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Deans, S. G., 2000. In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. Flavour and Fragrance Journal, 15(1), 12-16.

Dunajski, E., 1980. Texture of fish muscle. Journal of Texture Studies, 10(4), 301-318.

Dundar, H., Salih, B., Bozoğlu, F., 2016. Purification and characterization of a bacteriocin from an oenological strain of Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 46(4), 354-359.

Eaton, T. J., Gasson, M. J., 2001. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Applied and Environmental Microbiology, 67, 1628–1635.

EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (european centre for disease prevention and control), 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal 15 (12),5077.

Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., Cotter, P. D., 2016. Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? Frontiers in Microbiology, 7, 461.

Elegado, F. B., Kim, W. J., Kwon, D. Y., 1997. Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin AcM, from Pediococcus acidilactici M. International journal of food microbiology, 37(1), 1-11.

Emir Çoban, Ö., Tuna Keleştemur, G., 2017. Qualitative improvement of catfish burger using Zataria multiflora Boiss. essential oil. Journal of Food Measurement and Characterization, 11(2), 530-537.

Erkan, N., Tosun, Ş. Y., Ulusoy, Ş., Üretener, G., 2011. The use of thyme and laurel essential oil treatments to extend the shelf life of bluefish (Pomatomus saltatrix) during storage in ice. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 6(1), 39-48.

Es, I., Khaneghah, A.M., Akbariirad, H., 2017. Global Regulation of Essential Oils. Essent. Oils Food Process. Chem. Saf. Appl. 327–338.

Evans, W. C. 2009. Trease and evans' pharmacognosy E-book. Elsevier Health Sciences.

Falleh, H., Ben Jemaa, M., Saada, M., Ksouri, R., 2020. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. Food Chem. 330, 127268.

Fardet, A., Dupont, D., Rioux, L. E., Turgeon, S. L., 2019. Influence of food structure on dairy protein, lipid and calcium bioavailability: A narrative review of evidence. Critical reviews in food science and nutrition, 59(13), 1987-2010.

Fisher, K., Phillips, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology 155, 1749–1757.

Frangos, L., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A., Savvaidis, I.N., 2010. Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. Food Microbiol. 27, 115–121.

Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A., 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. International journal of food microbiology, 151(2), 125-140.

Franz, C. M., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzapfel, W.H., 2001. Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Enterococci Isolated from Food. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4385–4389.

Franz, C. M., Stiles, M. E., Schleifer, K. H., Holzapfel, W. H., 2003. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. International journal of food microbiology, 88(2-3), 105-122.

Fraser, O. P., Sumar, S., 1998. Compositional changes and spoilage in fish (part II)

-microbiological induced deterioration. Nutrition Food Science.

Friedly, E.C., Crandall, P.G., Ricke, S., O'Bryan, C.A., Martin, E.M., Boyd, L.M., 2008. Identification of Listeria innocua surrogates for Listeria monocytogenes in hamburger patties. J. Food Sci. 73, 174–178.

Gao Y., Li D., Liu S., Zhang L., 2015. Garviecin LG34, a novel bacteriocin produced by Lactococcus garvieae isolated from traditional Chinese fermented cucumber. Food Control 50:896–900

Gao, Y., Li, B., Li, D., Zhang, L., 2016. Purification and characteristics of a novel bacteriocin produced by Enterococcus faecalis L11 isolated from Chinese traditional fermented cucumber. *Biotechnology letters*, *38*(5), 871-876.

Gaudana, S. B., Dhanani, A. S., Bagchi, T., 2010. Probiotic attributes of Lactobacillus strains isolated from food and of human origin. *British Journal of Nutrition*, *103*(11), 1620-1628.

Gelboin, H., 2012. Polycyclic hydrocarbons and cancer. Elsevier.

Ghaly, A.E., Dave, D., Budge, S., Brooks, M.S., 2010. Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: Review. Am. J. Appl. Sci. 7, 846–864.

Giatrakou, V., Kykkidou, S., Papavergou, A., Kontominas, M. G., Savvaidis, I. N., 2008. Potential of oregano essential oil and MAP to extend the shelf life of fresh swordfish: a comparative study with ice storage. Journal of Food Science, 73(4), M167-M173.

Gil A, Van Baren CM, Di Leo Lira PM and Bandoni BL., 2007. Identification of the genotype from contents and composition of the essential oil of lemon verbena (Aloysia citriodora Palau). Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(21): 8664–8669.

Giwa, S. O., Muhammad, M., Giwa, A., 2018. Utilizing orange peels for essential oil production. J. Eng. App. Sci, 13, 17-27.

Global Food Safety Auditing, 2013. Nisin. FAO JECFA Monographs 14, superseding specifications for Nisin prepared at the 71st JECFA. FAO, Lazio, Rome.

Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Montero, P., 2010. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. Food Microbiol. 27, 889–896.

Gómez-Sala, B., Herranz, C., Díaz-Freitas, B., Hernández, P.E., Sala, A., Cintas, L.M., 2016. Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish: Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin. Int. J. Food Microbiol. 223, 41–49.

González, M. M., Zalazar, A. L., Pedreira, J. D., Campos, C. A., Gliemmo, M. F., 2021. Lemongrass and cinnamon oil nanoemulsions: Formulation and study of their physical stability and activity against Zygosaccharomyces bailii. Food Science and Technology International, 27(6), 485-498.

González, S. B., Ladio, A. H., Gastaldi, B., Silva, F. M., 2018. From Popular Uses to Commercialization. *Ethnobotany: Application of Medicinal Plants*, 89.

Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., Nerín, C., 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food chemistry*, *116*(4), 982-989.

Görgüç, A., Gençdağ, E., Yılmaz, F. M., 2020. Bioactive peptides derived from plant origin by-products: Biological activities and techno-functional utilizations in food developments–A review. *Food Research International*, 109504.

Gram, L. and H.H. Huss, 2000. Fresh and Processed Hultin, H.O., 1994. Oxidation of Lipids in Seafoods. In: Fish and Shellfish. In: The Microbiological Safety Seafoods Chemistry, Processing Technology and and Quality of Foods, Lund, B.M., A.C. Baird- Quality, Shahidi, F. and J.R. Botta (Eds.)., 1st Parker and.W. Gould (Eds.). Chapman and Hall, Edn., Blackie Academic and Professional, London, pp: 472-506.

Gram, L., Melchiorsen, J., 1996. Interaction between fish spoilage bacteria Pseudomonas sp. and Shewanella putrefaciens in fish extracts and on fish tissue. *Journal of applied bacteriology*, *80*(6), 589-595.

Gram, L., Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria - Problems and solutions. Curr. Opin. Biotechnol. 13, 262–266.

Gray E.J., Lee K.D., Souleimanov A.M., Di Falco M.R., Zhou X., Ly A., Charles T.C., Driscoll B.T., Smith D.L., 2006. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain Bacillus thuringiensis NEB17: isolation and classification. J Appl Microbiol 100:545–554

Guerrero Pacheco, V.J., Tomé, E., Guerra, M., Raybaudi, R., 2011. Efecto antioxidante y antimicrobiano de sales de ácidos orgánicos y extractos naturales en filetes de bagre dorado (Brachyplatystoma rousseauxii) refrigerados. Rev. Venez. Cienc. y Technol. Aliment. 2, 16–40.

Gupta, A., Tiwari, S.K., 2015. Probiotic potential of bacteriocin-producing Enterococcus hirae strain LD3 isolated from dosa batter. Ann. Microbiol. 65, 2333–2342.

Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., Hammami, R., 2018. The genus Enterococcus: Between probiotic potential and safety concerns-an update. Front. Microbiol. 9, 1–16.

Hao, R., Roy, K., Pan, J., Shah, B.R., Mraz, J., 2021. Critical review on the use of essential oils against spoilage in chilled stored fish: A quantitative meta-analyses: Essential oils and seafood. Trends Food Sci. Technol. 111, 175–190.

Hartmann, H.A., Wilke, T., Erdmann, R., 2011. Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control Listeria monocytogenes in food. Int. J. Food Microbiol. 146, 192–199.

Hassoun, A., Carpena, M., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., Özogul, F., Özogul, Regenstein, J. M., 2020. Use of spectroscopic techniques to monitor changes in food quality during application of natural preservatives: A review. Antioxidants, 9(9), 882.

Hassoun, A., Emir Çoban, Ö., 2017. Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. Trends Food Sci. Technol. 68, 26–36.

Hata T., Tanaka R., Ohmomo S., 2010. Isolation and characterization of plantaricin ASM1: a new bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum A-1. Int J Food Microbiol 137:94–99

Hemaiswarya, S., Soudaminikkutty, R., Narasumani, M. L., Doble, M., 2011. Phenylpropanoids inhibit protofilament formation of Escherichia coli cell division protein FtsZ. *Journal of medical microbiology*, *60*(9), 1317-1325.

Henning, C., Gautam, D., Muriana, P., 2015. Identification of Multiple Bacteriocins in Enterococcus spp. Using an Enterococcus-Specific Bacteriocin PCR Array. Microorganisms 3, 1–16.

Holzapfel, W. H., Geisen, R., Schillinger, U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International journal of food microbiology*, *24*(3), 343-362.

Hoover, D. G., Harlander, S. K., 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In Bacteriocins of lactic acid bacteria (pp. 23-39). Academic Press.

Hu, Z.Y., Balay, D., Hu, Y., McMullen, L.M., Gänzle, M.G., 2019. Effect of chitosan, and bacteriocin – Producing Carnobacterium maltaromaticum on survival of Escherichia coli and Salmonella Typhimurium on beef. Int. J. Food Microbiol. 290, 68–75.

Huq, T., Vu, K. D., Riedl, B., Bouchard, J., Lacroix, M., 2015. Synergistic effect of gamma (γ)-irradiation and microencapsulated antimicrobials against Listeria monocytogenes on ready-to-eat (RTE) meat. Food microbiology, 46, 507-514.

Huss, H. H. (Ed.)., 1995. Quality and quality changes in fresh fish (Vol. 348). Rome: FAO.

Huss, H.H., 1988. El pescado fresco: su calîdad y cambios de calidad. FAO, Journal of Chemical Information and Modeling.

Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L., 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Frontiers in microbiology, 3, 12.

ICMSF, 1986. Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: Principles and scientific applications (pp. 181–196). Toronto: University of Toronto Press.

Ikape, S.I., 2018. Fish Spoilage In The Tropics : A Review Fish Spoilage In The Tropics : A Review. Octa J. Biosci. 5, 34–37.

Izquierdo, E., Bednarczyk, A., Schaeffer, C., Cai, Y., Marchioni, E., Van Dorsselaer, A., Ennahar, S., 2008. Production of enterocins L50A, L50B, and IT, a new enterocin, by

Enterococcus faecium IT62, a strain isolated from Italian ryegrass in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 1917–1923.

Jack, R.W., Wan, J., Gordon, J., Harmark, K., Davidson, B.E., Hillier, A.J., Wettenhall, R.E.H., Hickey, M.W., Coventry, M.J., 1996. Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by Carnobacterium piscicola JG126. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2897–2903.

Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J., Barrett, J. B., 2004. Use of a genus-and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. Journal of clinical microbiology, 42(8), 3558-3565.

Jamaluddin, N., Stuckey, D.C., Ariff, A.B., Faizal Wong, F.W., 2018. Novel approaches to purifying bacteriocin: A review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 58, 2453–2465.

James, C., Purnell, G., James, S. J., 2015. A review of novel and inno- vative food freezing technologies. Food and Bioprocess Technology, 8, 1616–1634

Janes, M.E., Dai, Y., 2012. Edible films for meat, poultry and seafood, Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging. Woodhead Publishing Limited.

Jett, B. D., Huycke, M. M., Gilmore, M. S., 1994. Virulence of enterococci. Clinical microbiology reviews, 7(4), 462-478.

Johnston W.A., Nicholson F.J., Roger A. and Stroud G.D, 1994. Fisheries technical paper – 340. Food And Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 1994.

Jørgensen, B.R., Huss, H.H., 1989. Growth and activity of Shewanella putrefaciens isolated from spoiling fish. Int. J. Food Microbiol. 9, 51–62.

Jouda, J. B., Mbazoa, C. D., Sarkar, P., Bag, P. K., Wandji, J., 2016a. Anticancer and antibacterial secondary metabolites from the endophytic fungus Penicillium sp. CAM64 against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *African health sciences*, *16*(3), 734-743.

Jouda, J. B., Tamokou, J. D. D., Mbazoa, C. D., Douala-Meli, C., Sarkar, P., Bag, P. K., Wandji, J., 2016b. Antibacterial and cytotoxic cytochalasins from the endophytic fungus Phomopsis sp. harbored in Garcinia kola (Heckel) nut. BMC complementary and alternative medicine, 16(1), 1-9.

Jozala, A. F., Geraldes, D. C., Tundisi, L. L., Feitosa, V. D. A., Breyer, C. A., Cardoso, S. L., ... Pessoa Jr, A., 2016. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. brazilian journal of microbiology, 47, 51-63.

Kaktcham, P. M., Tchamani Piame, L., Sandjong Sileu, G. M., Foko Kouam, E. M., Temgoua, J.-B., Zambou Ngoufack, F., de Lourdes Pérez-Chabela, M., 2019. Bacteriocinogenic Lactococcus lactis subsp. lactis 3MT isolated from freshwater Nile Tilapia: isolation, safety traits, bacteriocin characterization, and application for biopreservation in fish pâté. Archives of Microbiology, 201, 1249-1258.

Kalschne, D. L., Geitenes, S., Veit, M. R., Sarmento, C. M., Colla, E., 2014. Growth inhibition

of lactic acid bacteria in ham by nisin: a model approach. Meat Science, 98(4), 744-752.

Kanekar, S., Fathima, F., Rekha, P. D., 2021. Carvone–a quorum sensing inhibitor blocks biofilm formation in Chromobacterium violaceum. Natural Product Research, 1-6.

Kanemitsu, K., Nishino, T., Kunishima, H., Okamura, N., Takemura, H., Yamamoto, H., Kaku, M., 2001. Quantitative determination of gelatinase activity among enterococci. Journal of microbiological methods, 47(1), 11-16.

Kariyama, R., Mitsuhata, R., Chow, J. W., Clewell, D. B., Kumon, H., 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. Journal of clinical microbiology, 38(8), 3092-3095.

Karoui, R., Hassoun, A., 017. Efficiency of rosemary and basil essential oils on the shelf-life extension of Atlantic mackerel (Scomber scombrus) fillets stored at 2 C. Journal of AOAC International, 100(2), 335-344.

Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Bimbiraitė-Survilienė, K., Naujokaitytė, G., Šernienė, L., Mulkytė, K., Malakauskas, M., Maruška, A., 2017. Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101, 1323–1335.

Kassaa, I. AL, Rafei, R., Moukhtar, M., Zaylaa, M., Gharsallaoui, A., Asehraou, A., Omari, K. El, Shahin, A., Hamze, M., Chihib, N.E., 2019. LABiocin database: A new database designed specifically for Lactic Acid Bacteria bacteriocins. Int. J. Antimicrob. Agents 54, 771–779.

Kawamoto, S., Shima, J., Sato, R., Eguchi, T., Ohmomo, S., Shibato, J., Horikoshi, N., Takeshita, K., Sameshima, T., 2002. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by Enterococcus mundtii NFRI 7393. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3830–3840.

Khalkhali, S., Mojgani, N., 2017. Bacteriocinogenic potential and virulence traits of Enterococcus faecium and E. faecalis isolated from human milk. Iranian Journal of Microbiology, 9(4), 224.

Khan, H., Flint, S., Yu, P.L., 2010. Enterocins in food preservation. Int. J. Food Microbiol. 141, 1–10.

Khochamit, N., Siripornadulsil, S., Sukon, P., Siripornadulsil, W., 2015. Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing Bacillus subtilis KKU213: potential as a probiotic strain. Microbiological Research, 170, 36-50.

Klaenhammer, T. R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS microbiology reviews, 12(1-3), 39-85.

Klancnik A, Piskernik S, Jersek B, Mozina SS, 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. J Microbiol Methods; 81(2): 121-126.

Klūga, A., Terentjeva, M., Vukovic, N.L., Kačániová, M., 2021. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils against pathogenic microorganisms of freshwater fish. Plants 10, 1–14.

Kumar M., Tiwari S. K., Srivastava S., 2010. Purification and characteriza- tion of enterocin LR/6, a bacteriocin from Enterococcus faecium LR/6. Appl Biochem Biotechnol 160:40–49

Kumar, P., Ganguly, S., 2014. Role of vacuum packaging in increasing shelf life in fish processing technology : A Review. Asian J. Bio Sci. 9, 109–112.

LaBiocin Database, https://labiocin.univ-lille.fr

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, *227*(5259), 680-685.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., Nychas, G. J., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of applied microbiology, 91(3), 453-462.

Landfald, B., Valeur, J., Berstad, A., Raa, J., 2017. Microbial trimethylamine- N -oxide as a disease marker: something fishy? . Microb. Ecol. Health Dis. 28, 1327309.

Lauková, A., Strompfová, V., Ščerbová, J., Simonová, M.P., 2019. Virulence factor genes incidence among enterococci from sewage sludge in eastern Slovakia following safety aspect. Biomed Res. Int. 2019.

Lee, B. H., Cole, S., Badel-Berchoux, S., Guillier, L., Felix, B., Krezdorn, N., ... Piveteau, P. 2019. Biofilm formation of Listeria monocytogenes strains under food processing environments and pan-genome-wide association study. *Frontiers in microbiology*, *10*, 2698.

Lee, G., Kim, Y., Kim, H., Beuchat, L.R., Ryu, J.H., 2018. Antimicrobial activities of gaseous essential oils against Listeria monocytogenes on a laboratory medium and radish sprouts. Int. J. Food Microbiol. 265, 49–54.

Leite, J.A., Tulini, F.L., Reis-Teixeira, F.B. dos, Rabinovitch, L., Chaves, J.Q., Rosa, N.G., Cabral, H., De Martinis, E.C.P., 2016. Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by Bacillus cereus: Preliminary characterization and application of partially purified extract containing BLIS for inhibiting Listeria monocytogenes in pineapple pulp. LWT - Food Sci. Technol. 72, 261–266.

Lešnik, S., Furlan, V., Bren, U., 2021. Rosemary (Rosmarinus officinalis L.): extraction techniques, analytical methods, and health-promoting biological effects. *Phytochemistry Reviews*, 1-56.

Li, C., Pei, J., Xiong, X., Xue, F., 2020. Encapsulation of grapefruit essential oil in emulsion-based edible film prepared by plum (pruni domesticae semen) seed protein isolate and gum acacia conjugates. *Coatings*, *10*(8), 784.

Lianou, A., Kakouri, A., Pappa, E.C., Samelis, J., 2017. Growth interactions and antilisterial effects of the bacteriocinogenic Lactococcus lactis subsp. cremoris M104 and Enterococcus

faecium KE82 strains in thermized milk in the presence or absence of a commercial starter culture. Food Microbiol. 64, 145–154.

Lingbeck, J.M.; Cordero, P.; O'Bryan, C.A.; Johnson, M.G.; Ricke, S.C.; Crandall, P.G., 2014. Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. Meat Sci., 97, 197–206.

Liu, G., Ren, L., Song, Z., Wang, C., Sun, B., 2015. Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by Bifidobacterium animals BB04 from centenarians' intestine. Food Control 50, 889–895.

Liu, S.C., Lin, J.T., Wang, C.K., Chen, H.Y., Yang, D.J., 2009. Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (Litchi chinenesis Sonn.) flowers. Food Chem. 114, 577–581.

Lopata, A. L., Lehrer, S. B., 2009. New insights into seafood allergy. Current opinion in allergy and clinical immunology, 9(3), 270-277.

Lopez, P., Sanchez, C., Batlle, R., Nerin, C., 2005. Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. Journal of agricultural and food chemistry, 53(17), 6939-6946.

López-Cuellar, M. del R., Rodríguez-Hernández, A.I., Chavarría-Hernández, N., 2016. LAB bacteriocin applications in the last decade. Biotechnol. Biotechnol. Equip.

Lorenzo-Leal, A. C., Palou, E., López-Malo, A., Bach, H., 2019. Antimicrobial, cytotoxic, and anti-inflammatory activities of Pimenta dioica and Rosmarinus officinalis essential oils. BioMed research international, 23,127

Luther, M. W., 2006. Inhibitory effect of selected spice and fruit seed extracts on lipid oxidation in fish oil and their radical scavenging and antimicrobial properties (Doctoral dissertation).

Lv, X., Du, J., Jie, Y., Zhang, B., Bai, F., Zhao, H., Li, J., 2017. Purification and antibacterial mechanism of fish-borne bacteriocin and its application in shrimp (Penaeus vannamei) for inhibiting Vibrio parahaemolyticus. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33,156.

Lv, X., Ma, H., Sun, M., Lin, Y., Bai, F., Li, J., Zhang, B., 2018. A novel bacteriocin DY4-2 produced by Lactobacillus plantarum from cutlassfish and its application as bio-preservative for the control of Pseudomonas fluorescens in fresh turbot (Scophthalmus maximus) fillets. Food Control, 89, 22-31.

Lyon, W. J., Olson, D. G., Murano, E. A., 1995. Isolation and purification of enterocin EL1, a bacteriocin produced by a strain of Enterococcus faecium. Journal of Food Protection, 58(8), 890-898.

Mahdi, L.H., Ghufran Nazem, A.-H., Auda, I.G., 2020. Evidence of anti- K. pneumoniae biofilm activity of novel Entrococcus faecalis enterocin GLHM. Microb. Pathog. 104366.

Mahmoud, B. S., Yamazaki, K., Miyashita, K., Shin, I. I., Suzuki, T., 2006. A new technology

for fish preservation by combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds. Food chemistry, 99(4), 656-662.

Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B., Riley, M. A., 2011. Competitive interactions in Escherichia coli populations: the role of bacteriocins. The ISME journal, 5(1), 71-81.

Maksimov, M. O., Pan, S. J., Link, A. J., 2012. Lasso peptides: structure, function, biosynthesis, and engineering. Natural product reports, 29(9), 996-1006.

Manero, A., Blanch, A. R., 1999. Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. Applied and environmental microbiology, 65(10), 4425-4430.

Marchese, A., Arciola, C.R., Barbieri, R., Silva, A.S., Nabavi, S.F., Sokeng, A.J.T., Izadi, M., Jafari, N.J., Suntar, I., Daglia, M., Nabavi, S.M., 2017. Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A particular focus on p-cymene. Materials (Basel). 10, 1–15.

Marguet, E.R., Vallejo, M., Chichisola, V.S., Quispe, J.L., 2011. Antagonistic activity of lactic bacteria isolated from marine environment against Listeria strains | Actividad antagonista de bacterias lácticas aisladas del medio marino contra cepas de Listeria. Acta Bioquim. Clin. Latinoam. 45.

Martín, M., Gutiérrez, J., Criado, R., Herranz, C., Cintas, L. M., Hernández, P. E., 2006. Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (Columba palumbus). Journal of Food Protection, 69, 520–531.

Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Elez-Martínez, P., Marsellés-Fontanet, A. R., Vega-Mercado, H., 2014. Non-thermal processing technologies. In Food Safety Management (pp. 443-465). Academic Press.

Martín-Sánchez AM, Chaves-López C, Sendra E, Sayas E, Fenández-López J, Pérez-Álvarez JÁ. 2011. Lipolysis, proteolysis and sensory characteristics of a Spanish fermented dry-curedmeat product (salchichón) with oregano essential oil used as surface mold inhibitor. Meat Sci.; 89:35–44

Mathur, H., Beresford, T.P., Cotter, P.D., 2020. Health benefits of lactic acid bacteria (Lab) fermentates. Nutrients 12, 1–16.

Mei, J., Ma, X., Xie, J., 2019. Review on natural preservatives for extending fish shelf life. Foods 8.

Mei, J., Shen, Y., Liu, W., Lan, W., Li, N., Xie, J., 2020. Effectiveness of sodium alginate active coatings containing Bacteriocin EFL4 for the quality improvement of ready-to-eat fresh salmon fillets during cold storage. Coatings, 10, 506.

Meilgaard M., Civille G.V. and Carr B.T., 1999. Sensory Evaluation Techniques. Florida: CRC Press, Inc.

Melchior, S., Marino, M., Innocente, N., Calligaris, S., Nicoli, M. C., 2020. Effect of different biopolymer-based structured systems on the survival of probiotic strains during storage and in vitro digestion. Journal of the Science of Food and Agriculture, 100(10), 3902-3909.

Merlich, A., Galkin, M., Choiset, Y., Limanska, N., Vasylieva, N., Ivanytsia, V., Haertlé, T., 2019. Characterization of the bacteriocin produced by Enterococcus italicus ONU547 isolated from Thai fermented cabbage. Folia Microbiol. (Praha). 64, 535–545.

Mexis, S. F., Chouliara, E., Kontominas, M. G., 2009. Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf-life extension of rainbow trout fillets stored at 4 C. Food microbiology, 26(6), 598-605.

Mikolo, B., Moyen, R., Baloki, N.T., Nguimbi, E., 2020. Optimization by mixture design of the antimicrobial activities of five selected essential oils. J. Med. Plants Res. 14, 570–579.

Ming, X., Weber, G. H., Ayres, J. W., Sandine, W. E., 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit Listeria monocytogenes on meats. Journal of Food Science, 62(2), 413-415.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de Argentina, 2021. INFORME DPP N°12-2021, Dirección de Planificación Pesquera Subsecretaría de Pesca y Acuicultura; Resolución 42/2019

Mokoena, M.P., 2017. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini review. Molecules, 22, 1255.

Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., Langa, S., El Aouad, N., Arqués, J. L., Reyes, F., Medina, M., 2014. Antimicrobial activity of reuterin produced by Lactobacillus reuteri on Listeria monocytogenes in cold-smoked salmon. Food Microbiology, 44, 1-5.

Moreno, M. F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. International journal of food microbiology, 106(1), 1-24.

Mota-Meira, M., Lacroix, C., LaPointe, G., Lavoie, M. C., 1997. Purification and structure of mutacin B-Ny266: a new lantibiotic produced by Streptococcus mutans. FEBS letters, 410(2-3), 275-279.

Múgica, B., Barros-Velázquez, J., Miranda, J. M., Aubourg, S. P. 2008. Evaluation of a slurry ice system for the commercialization of ray (Raja clavata): Effects on spoilage mechanisms directly affecting quality loss and shelf-life. *LWT-Food Science and Technology*, *41*(6), 974-981.

Mundy, L. M., Sahm, D. F., Gilmore, M. 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clinical microbiology reviews, 13(4), 513-522.

Muñoz A., Maqueda M., Gálvez A., Martínez-Bueno M., Rodríguez A., y Valdivia E., 2004. Biocontrol of Psychrotrophic Enterotoxigenic Bacillus cereus in a Nonfat Hard Cheese by an Enterococcal Strain–Producing Enterocin AS-48. Journal of Food Protection 67, 1517-1521.

Nagarajarao, R.C., 2016. Recent advances in processing and packaging of fishery products: A review. Aquat. Procedia, 7, 201–213.

Narayan, B., Miyashita, K., Hosakawa, M., 2006. Physiological effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA)—A review. Food Reviews International, 22(3), 291-307.

Naseri, H. R., Beigmohammadi, F., Mohammadi, R., Sadeghi, E., 2020. Production and characterization of edible film based on gelatin–chitosan containing Ferulago angulate essential oil and its application in the prolongation of the shelf life of turkey meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(8), e14558.

Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J., 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. Food control, 20(2), 157-160.

Neetoo, H., Mahomoodally, F., 2014. Use of antimicrobial films and edible coatings incorporating chemical and biological preservatives to control growth of Listeria monocytogenes on cold smoked salmon. BioMed Research International, article ID 534915.

Newman, M., 2001. Cryogenic impingement freezing utilizing atomized liquid nitrogen for the rapid freezing of food products. Rapid Cooling of Food. Meeting of IIR Commission C2, Bristol, UK, Section 2, pp. 145–151

Nielsen's global health and wellness, 2015. Nielsen's global health and wellness survey: We are what we eat. Healthy eating trends around the world.

Nissen-Meyer, J., Oppegård, C., Rogne, P., Haugen, H.S., Kristiansen, P.E., 2010. Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins. Probiotics Antimicrob. Proteins 2, 52–60.

Novotny, L., Dvorska, L., Lorencova, A., Beran, V., Pavlik, I., 2004. Fish: A potential source of bacterial pathogens for human beings. Vet. Med. (Praha). 49, 343–358.

Nwakanma, C., EN, N., T, P., 2016. Antimicrobial Activity of Secondary Metabolites of Fungi Isolated from Leaves of Bush Mango. J. Next Gener. Seq. Appl. 3.

O'Connor P. M., O'Shea E. F., Guinane C. M., O'Sullivan O., Cotter P. D., Ross R. P., Hill C., 2015a. Nisin H is a new nisin variant produced by the gut- derived strain Streptococcus hyointestinalis DPC6484. Appl Environ Microbiol 81:3953–3960

O'Connor, P.M., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D., 2015b. Antimicrobial antagonists against food pathogens: A bacteriocin perspective. Curr. Opin. Food Sci. 2, 51–57.

Ogaki, M.B., Rocha, K.R., Terra, M.R., Furlaneto, M.C., Furlaneto-Maia, L., 2016. Screening of the enterocin-encoding genes and antimicrobial activityin Enterococcus species. J. Microbiol. Biotechnol. 26, 1026–1034.

Ogier, J.C., Serror, P., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus. Int. J. Food Microbiol. 126, 291–301.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1999. Documento técnico de pesca. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. En H. H. Huss (Ed.). Dinamarca.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2005. Post-harvest changes in fish. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

Ortiz, J., Vivanco, J.P., Aubourg, S.P., 2014. Lipid and sensory quality of canned Atlantic salmon (Salmo salar): Effect of the use of different seaweed extracts as covering liquids. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 116, 596–605.

Özdemir, G. B., Oryaşın, E., Bıyık, H. H., Özteber, M., Bozdoğan, B., 2011. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. Indian Journal of Microbiology, 51, 182–187.

Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Ricardo, C., 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives 50, 521–542.

Pateiro, M., Barba, F.J., Domínguez, R., Sant'Ana, A.S., Mousavi Khaneghah, A., Gavahian, M., Gómez, B., Lorenzo, J.M., 2018. Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. Food Res. Int. 113, 156–166.

Patel, S., 2015. Plant essential oils and allied volatile fractions as multifunctional additives in meat and fish-based food products: a review. Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 32, 1049–1064.

Patil, A.R., Chogale, N.D., Pagarkar, A.U., Koli, J.M., Bhosale, B.P., Sharangdhar, S.T., Gaikwad, B. V, Kulkarni, G.N., 2020. Vacuum Packaging Is a Tool for Shelf Life Extension of Fish Product : a Review. Artic. J. Exp. Zool. 23, 807–810.

Pavelková, A., Kačániová, M., Horská, E., Rovná, K., Hleba, L., Petrová, J., 2014. The effect of vacuum packaging, EDTA, oregano and thyme oils on the microbiological quality of chicken's breast. Anaerobe, 29, 128-133.

Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. Anal. Biochem. 83, 346–3568.

Phumisantiphong, U., Siripanichgon, K., Reamtong, O., Diraphat, P., 2017. A novel bacteriocin from Enterococcus faecalis 478 exhibits a potent activity against vancomycin-resistant enterococci. *PloS one*, *12*(10), e0186415.

Pinto, A.L., Fernandes, M., Pinto, C., Albano, H., Castilho, F., Teixeira, P., Gibbs, P.A., 2009. Characterization of anti-Listeria bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non-fermented seafood. Int. J. Food Microbiol. 129, 50–58.

Qiao, X., Du, R., Wang, Y., Han, Y., Zhou, Z., 2020. Purification, characterization and mode of action of enterocin, a novel bacteriocin produced by Enterococcus faecium TJUQ1. Int. J. Biol. Macromol. 144, 151–159.

Rasooli, I., 2017. Food preservation – A biopreservative approach Food Preservation – A Biopreservative Approach.

Rathod, N.B., Ranveer, R.C., Benjakul, S., Kim, S.K., Pagarkar, A.U., Patange, S., Ozogul, F., 2021. Recent developments of natural antimicrobials and antioxidants on fish and fishery food products. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 20, 4182–4210.

Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P., 2010. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against Vibrio cholerae in food. J. Biosci. Bioeng. 110, 614–619.

Rawdkuen, S.; Suthiluk, P.; Kamhangwong, D.; Benjakul, S., 2012. Antimicrobial activity of some potential active compounds against food spoilage microorganisms. Afr. J. Biotechnol.11, 13914–13921

Rearte D. H., 2010 Documento programa nacional de carnes perfil de las cadenas: bovina, aves, cerdos, ovinos y caprinos. EEA Balcarce, INTA.

Rehaiem, A., Fhoula, I., Slim, A.F., Ben Boubaker, I.B., Chihi, A.B., Ouzari, H.I., 2016. Prevalence, acquired antibiotic resistance and bacteriocin production of Enterococcus spp. isolated from tunisian fermented food products. Food Control 63, 259–266.

Reyes-Jurado, F., Cervantes-Rincón, T., Bach, H., López-Malo, A., Palou, E., 2019. Antimicrobial activity of Mexican oregano (Lippia berlandieri), thyme (Thymus vulgaris), and mustard (Brassica nigra) essential oils in gaseous phase. Ind. Crops Prod. 131, 90–95.

Reyes-Jurado, F., Navarro-Cruz, A.R., Ochoa-Velasco, C.E., Palou, E., López-Malo, A., Ávila-Sosa, R., 2020. Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 60, 1641–1650.

Ribeiro- Santos, R., Andrade, M., Sanches-Silva, A., de Melo, N. R., 2018. Essential oils for food application: natural substances with established biological activities. Food and bioprocess technology, 11(1), 43-71.

Rice, L. B., Carias, L., Rudin, S., Vael, C., Goossens, H., Konstabel, C., 2003. A potential virulence gene, hylEfm, predominates in Enterococcus faecium of clinical origin. The Journal of Infectious Diseases, 187(3), 508–512.

Ríos, J., 2016. Essential Oils : What They Are and How the Terms Are Used and Defined, Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Elsevier Inc.

Rivas, F.P., Castro, M.P., Vallejo, M., Marguet, E., Campos, C.A., 2012. Antibacterial potential of Enterococcus faecium strains isolated from ewes' milk and cheese. LWT - Food Sci. Technol. 46, 428–436.

Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramirez, L. A., Leyva, J. M., Siddiqui, M. W., Cruz-Valenzuela, M. R., Ayala-Zavala, J. F., 2016. Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56(10), 1717-1727.

Román, S., Sánchez-Siles, L.M., Siegrist, M., 2017. The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. Trends Food Sci. Technol. 67, 44–57.

Rozdzinski, E., Marre, R., Susa, M., Wirth, R., Muscholl-Silberhorn, A., 2001. Aggregation substance-mediated adherence of Enterococcus faecalis to immobilized extracellular matrix proteins. Microbial pathogenesis, 30(4), 211-220.

Sahoo T. K., Jena P. K., Patel A. K., Seshadri S., 2015. Purification and molecular characterization of the novel highly potent bacteriocin TSU4 produced by Lactobacillus animalis TSU4. Appl Biochem Biotechnol 177:90–104

Samaneh, P.; Masoud, R.; Hedayat, H., 2011. Effects of turmeric, shallot extracts, and their combination on quality characteristics of vacuum-packaged rainbow trout stored at 4 ± 1 ◦C. J. Food Sci. 76, M387–M391.

Sampels, S., 2015. The Effects of Storage and Preservation Technologies on the Quality of Fish Products: A Review. J. Food Process. Preserv. 39, 1206–1215.

Saraiva M. A., Nes I. F., Baracat-Pereira M. C., de Queiroz M. V., Mantovani H. A., de Moraes C. E., 2014. Purification and characterization of a bacteriocin produced by Lactococcus lactis subsp. lactis PD6.9. J Microbiol Antimicrob 6:79–87

Saraoui, T., Leroi, F., Björkroth, J., Pilet, M. F., 2016. Lactococcus piscium: a psychrotrophic lactic acid bacterium with bioprotective or spoilage activity in food—a review. Journal of Applied Microbiology, 121(4), 907-918.

Sarika, A. R., Lipton, A. P., Aishwarya, M. S., Dhivya, R. S., 2012. Isolation of a bacteriocin-producing Lactococcus lactis and application of its bacteriocin to manage spoilage bacteria in high-value marine fish under different storage temperatures. Applied Biochemistry and Biotechnology, 167, 1280-1289.

Sawa N., Koga S., Okamura K., Ishibashi N., Zendo T., Sonomoto K., 2013. Identification and characterization of novel multiple bacteriocins produced by Lactobacillus sakei D98. J Appl Microbiol 115:61–69

Schelegueda, L. I., Gliemmo, M. F., Campos, C. A., 2012. Antimicrobial synergic effect of chitosan with sodium lactate, nisin or potassium sorbate against the bacterial flora of fish. Journal of Food Research, 1(3), 272.

Schelegueda, L.I., Delcarlo, S.B., Gliemmo, M.F., Campos, C.A., 2016a. Effect of antimicrobial mixtures and modified atmosphere packaging on the quality of Argentine hake (Merluccius hubbsi) burgers. LWT - Food Sci. Technol. 68, 258–264.

Schelegueda, L.I., Vallejo, M., Gliemmo, M.F., Marguet, E.R., Campos, C.A., 2015. Synergistic antimicrobial action and potential application for fish preservation of a bacteriocin produced by Enterococcus mundtii isolated from Odontesthes platensis. LWT - Food Sci. Technol. 64, 794–801.

Schelegueda, L.I., Zalazar, A.L., Gliemmo, M.F., Campos, C.A., 2016b. Inhibitory effect and cell damage on bacterial flora of fish caused by chitosan, nisin and sodium lactate. Int. J.

Biol. Macromol. 83, 396–402.

Semedo, T., Almeida Santos, M., Silva Lopes, M.F., Figueiredo Marques, J.J., Barreto Crespo, M.T., Tenreiro, R., 2003. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: A common trait in the genus? Syst. Appl. Microbiol. 26, 13–22.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2016. Resolución-116-2016.

Settanni, L., Corsetti, A., 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. Int. J. Food Microbiol. 121, 123–138.

Settanni, L., Guarcello, R., Gaglio, R., Francesca, N., Aleo, A., Felis, G.E., Moschetti, G., 2014. Production, stability, gene sequencing and in situ anti-listeria activity of mundticin KS expressed by three enterococcus mundtii strains. Food Control 35, 311–322.

Sharifi-Rad, M., Shadanpour, S., van Belkum, A., Soltani, A., Sharifi-Rad, J., 2016. First case of vanA-positive Enterococcus mundtii in human urinary tract infection in Iran. New Microbes New Infect. 11, 68–70.

Sharma, P., Rashid, M., Kaur, S., 2020. Novel enterocin E20c purified from Enterococcus hirae 20c synergised with ß-lactams and ciprofloxacin against Salmonella enterica. Microb. Cell Fact. 19, 1–11.

Shen, H.S.; Shao, S.; Chen, J.C.; Zhou, T., 2017. Antimicrobials from mushrooms for assuring food safety. Compr. Rev. Food Sci. Food Safety, 16, 316–329.

Sikkema, J., de Bont, J. A., Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of biological chemistry*, *269*(11), 8022-8028.

Silva, C.C.G., Silva, S.P.M., Ribeiro, S.C., 2018. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. Front. Microbiol. 9.

Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K., Rosnes, J.T., 2002. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products - Significance of microbial growth, activities and safety. Int. J. Food Sci. Technol. 37, 107–127.

Skandamis, P. N., Nychas, G. J. E. 2000. Development and evaluation of a model predicting the survival of Escherichia coli O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. Applied and Environmental Microbiology, 66(4), 1646–1653.

Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, M. G., 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, *23*(2), 136-141.

Sonwa, M.M., 2000. Isolation and Structure Elucidation of Essential Oil Constituents. Comparative Study of the Oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperus papyrus*, and *Cyperus rotundus*. Ph.D. degree, University of Hamburg, Germany.

Sotelo, C.G., Gallardo, J.M., Piñeiro, C., Pérez-Martin, R., 1995. Trimethylamine oxide and derived compounds' changes during frozen storage of hake (Merluccius merluccius). Food

Chem. 53, 61–65.

Swenson, J. M., Clark, N. C., Ferraro, M. J., Sahm, D. F., Doern, G., Pfaller, M. A., ... Tenover, F. C., 1994. Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. Journal of Clinical Microbiology, 32(7), 1700-1704.

Szopa, A., Ekiert, R., Ekiert, H., 2017. Current knowledge of Schisandra chinensis (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a medicinal plant species: a review on the bioactive components, pharmacological properties, analytical and biotechnological studies. *Phytochemistry Reviews*, *16*(2), 195-218.

Tahlan, V., 2014. Antimicrobial Activity of Essential Oil Emulsions and Possible Synergistic Effect on Food Borne Pathogens. 316 Wayne State University Theses.

Thomaz-Soccol, V., Pandey, A., Resende, R.R., Santos, V.L., Nardi Drummond, R.M., Dias-Souza, M.V., 2017. Bacteriocins as Antimicrobial and Antibiofilm Agents, Current Developments in Biotechnology and Bioengineering.

Thurlow, L. R., Thomas, V. C., Narayanan, S., Olson, S., Fleming, S. D., Hancock, L. E., 2010. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by Enterococcus faecalis. *Infection and immunity*, *78*(11), 4936-4943.

Todorov, S. D., van Reenen, C. A., Dicks, L. M. T., 2004. Optimization of bacteriocin production by Lactobacillus plantarum ST13BR, a strain isolated from barley beer. The Journal of general and applied microbiology, 50(3), 149-157.

Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., 2007. Bacteriocin production by Lactobacillus pentosus ST712BZ isolated from boza. Brazilian J. Microbiol. 38, 166–172.

Tsironi, T., Houhoula, D., Taoukis, P., 2020. Hurdle technology for fish preservation. Aquac. Fish. 5, 65–71.

Tulini, F.L., Gomes, B.C., de Martinis, E.C.P., 2011. Purificação parcial e caracterização da bacteriocina produzida por Enterococcus faecium 130 isolado de mussarela. Cienc. e Tecnol. Aliment. 31, 155–159.

Turgis, M., Han, J., Borsa, J., Lacroix, M., 2008. Combined effect of natural essential oils, modified atmosphere packaging, and gamma radiation on the microbial growth on ground beef. Journal of food protection, 71(6), 1237-1243.

Tyagi, A. K., Malik, A., 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. Food Chemistry, 126(1), 228-235.

Undeland, I., Hall, G., Wendin, K., Gangby, I., Rutgersson, A., 2005. Preventing lipid oxidation during recovery of functional proteins from herring (Clupea harengus) fillets by an acid solubilization process. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(14), 5625-5634.

ur Rahman, U., Sahar, A., Ishaq, A., Aadil, R.M., Zahoor, T., Ahmad, M.H., 2018. Advanced meat preservation methods: A mini review. J. Food Saf. 38, 1–8.

Van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A., 1987. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and environmental microbiology*, *53*(8), 1893-1897.

Vasilchenko, A. S., Vasilchenko, A. V., Valyshev, A. V., Rogozhin, E. A., 2018. A novel high-molecular-mass bacteriocin produced by Enterococcus faecium: biochemical features and mode of action. *Probiotics and antimicrobial proteins*, *10*(3), 427-434.

Vatavali, K., Karakosta, L., Nathanailides, C., Georgantelis, D., Kontominas, M.G., 2013. Combined Effect of Chitosan and Oregano Essential Oil Dip on the Microbiological, Chemical, and Sensory Attributes of Red Porgy (Pagrus pagrus) Stored in Ice. Food Bioprocess Technol. 6, 3510–3521.

Vázquez, J.A.; González, M.P.; Murado, M.A., 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture, 245, 149–161

Venugopal, V., Shahidi, F., 1996. Structure and composition of fish muscle. Food Reviews International, 12(2), 175-197.

Vera Pingitore E., Salvucci E., Sesma F., 2007. Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol. 557–568.

Verheyen, D., Baka, M., Akkermans, S., Skåra, T., Van Impe, J.F., 2019. Effect of microstructure and initial cell conditions on thermal inactivation kinetics and sublethal injury of Listeria monocytogenes in fish-based food model systems. Food Microbiol. 84, 103267.

Verni, M., Verardo, V., Rizzello, C. G., 2019. How fermentation affects the antioxidant properties of cereals and legumes. Foods, 8(9), 362.

Vuyst, L. D., 1994. Bacteriocins of Enterococcus. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria (pp. 511-513). Springer, Boston, MA.

Wang, Z., Wu, H., Zhao, G., Liao, X., Chen, F., Wu, J., Hu, X., 2007. One-dimensional finite-difference modeling on temperature history and freezing time of individual food. Journal of Food Engineering, 79(2), 502–510.

Wayah, S. B., Philip, K., 2018. Pentocin MQ1: a novel, broad-spectrum, pore-forming bacteriocin from Lactobacillus pentosus CS2 with quorum sensing regulatory mechanism and biopreservative potential. Frontiers in Microbiology, 9, 564.

Wells, C. L., Moore, E. A., Hoag, J. A., Hirt, H., Dunny, G. M., Erlandsen, S. L., 2000. Inducible expression of Enterococcus faecalis aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. Infection and immunity, 68(12), 7190-7194.

Werner, G., Fleige, C., Geringer, U., van Schaik, W., Klare, I., Witte, W., 2011. IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of Enterococcus faecium. BMC Infectious Diseases, 11, 80.

Wiernasz, N., Cornet, J., Cardinal, M., Pilet, M.-F., Passerini, D., Leroi, F., 2017. Lactic Acid Bacteria Selection for Biopreservation as a Part of Hurdle Technology Approach Applied on Seafood. Front. Mar. Sci. 4, 1–15.

Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwiwathana, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., 2016. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. Meat Sci. 120, 118–132.

Woraprayote, W., Pumpuang, L., Tosukhowong, A., Zendo, T., Sonomoto, K., Benjakul, S., Visessanguan, W., 2018. Antimicrobial biodegradable food packaging impregnated with Bacteriocin 7293 for control of pathogenic bacteria in pangasius fish fillets. LWT, 89, 427-433.

Wright, M.H., Matthews, B., Arnold, M.S.J., Greene, A.C., Cock, I.E., 2016. The prevention of fish spoilage by high antioxidant Australian culinary plants: Shewanella putrefaciens growth inhibition. Int. J. Food Sci. Technol. 51, 801–813.

Yang, T., Wu, K., Wang, F., Liang, X., Liu, Q., Li, G., Li, Q., 2014. Effect of exopolysaccharides from lactic acid bacteria on the texture and microstructure of buffalo yoghurt. International Dairy Journal, 34(2), 252-256.

Yi, L., Dang, J., Zhang, L., Wu, Y., Liu, B., Lü, X., 2016. Purification, characterization and bactericidal mechanism of a broad spectrum bacteriocin with antimicrobial activity against multidrug-resistant strains produced by Lactobacillus coryniformis XN8. Food Control 67, 53–62.

Yıldırım, Z., Avs, Y. K., Yıldırım, M., 2002. Factors affecting the adsorption of buchnericin LB, a bacteriocin produced by Lactocobacillus buchneri. Microbiological Research, 157(2), 103-107.

Zendo T., Eungruttanagorn N., Fujioka S., Tashiro Y., Nomura K., Sera Y., Kobayashi G., Nakayama J., Ishizaki A., Sonomoto K., 2005. Identification and production of a bacteriocin from Enterococcus mundtii QU 2 isolated from soybean. J Appl Microbiol 99:1181– 1190

Zhang, H., Liu, L., Hao, Y., Zhong, S., Liu, H., Han, T., Xie, Y., 2013. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum BM-1 isolated from a traditionally fermented Chinese meat product. Microbiology and Immunology, 57(11), 746-755.

Zhang, J., Liu, G., Shang, N., Cheng, W., Chen, S., Li, P., 2009. Purification and partial amino acid sequence of pentocin 31-1, an anti-Listeria bacteriocin produced by Lactobacillus pentosus 31-1. Journal of Food Protection, 72(12), 2524-2529.

Zhuang, S., Hong, H., Zhang, L., Luo, Y., 2021. Spoilage-related microbiota in fish and crustaceans during storage: Research progress and future trends. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 20, 252–288.

Zou, J., Jiang, H., Cheng, H., Fang, J., Huang, G., 2018. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. Int. J. Biol. Macromol. 117, 781–789.