

## Efecto del pH y la temperatura sobre la liberación de la bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* ITV 26 encapsulada en una matriz de alginato-almidón

JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, Magdalena†, DEL ÁNGEL-CORONEL, Oscar Andrés, ESPEJO-BAYONA, Diana Laura y LUGO-DAMIÁN, Hepziba Noemi

Instituto Tecnológico Superior de Huatusco Av. 25 Poniente no.100 Col. Reserva Territorial c.p. 94100 Huatusco, Veracruz, México

Recibido 6 de Octubre 2017; Aceptado 9 de Diciembre, 2017

### Resumen

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, son consideradas desde un punto de vista tecnológico como conservadores grado alimenticio. Su naturaleza peptídica permite la degradación por enzimas digestivas, resultando inocuas para el consumidor y la microbiota intestinal Su espectro de actividad incluye bacterias potencialmente patógenas y alterantes asociadas a los alimentos *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, etc. El objetivo del presente trabajo, fue evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre la liberación de la bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* ITV 26 encapsulada en una matriz de alginato: calcio-almidón. La encapsulación de la bacteriocina se realizó por medio de gelificación iónica y extrusión. La matriz alginato-almidón se preparó con una solución de alginato de calcio al 2% y almidón al 8%. La liberación de la bacteriocina encapsulada se llevó a cabo por el método de (Narshaia 2013) con modificaciones y se realizó la cinética de la actividad antimicrobiana durante 72 horas. La actividad del péptido, se midió por el método de difusión en agar utilizando como sepa sensible *Listeria innocua* AST-062. La bacteriocina encapsulada, inhibió el crecimiento de la cepa sensible, observándose halos de inhibición lo cual demostró la estabilidad del péptido en función del tiempo y la temperatura en medio de cultivo sólido.

***Pediococcus acidilactici*, bacteriocinas, encapsulación, microencapsulación**

### Abstract

Bacteriocins produced by lactic bacteria, are considered from a technological point of view as food grade preservatives. Its peptidic nature allows the degradation by digestive enzymes, thus being harmless to the consumer and the intestinal microbiota and in some cases. Its spectrum of activity includes potentially pathogenic and altering bacteria associated with food *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, etc. The objective of the present work was to evaluate the effect of pH and temperature on the release of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* ITV 26 encapsulated in an alginate: calcium-starch matrix. The bacteriocin encapsulation was performed by means of ionic gelling and extrusion. The alginate-starch matrix was prepared with a solution of calcium alginate at a concentration of 2% and 8% starch. The release of the encapsulated bacteriocin was carried out by the method of (Narshaia 2013) with modifications and kinetics of antimicrobial activity was performed for 72 hours. The activity of the peptide was measured by the agar diffusion method using *Listeria innocua* AST-062 as sensitive. The bacteriocin encapsulated in an alginate-starch matrix inhibited growth of the sensitive strain, with inhibition halos being observed which demonstrated the stability of the peptide as a function of time and temperature in solid culture medium

***Pediococcus acidilactici*, bacteriocins, encapsulation, microencapsulation**

**Citación:** JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, Magdalena, DEL ÁNGEL-CORONEL, Oscar Andrés, ESPEJO-BAYONA, Diana Laura y LUGO-DAMIÁN, Hepziba Noemi. Efecto del pH y la temperatura sobre la liberación de la bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* ITV 26 encapsulada en una matriz de alginato-almidón. Revista de la Invención Técnica 2017. 1-4:22-30

† Investigador contribuyendo como primer autor.

## Introducción

La encapsulación y la microencapsulación es una técnica útil para la protección de aditivos utilizados en la industria de los alimentos. Se ha empleado con el fin de prolongar la vida útil de diferentes productos, fortificación y liberación controlada de nutrientes en el sitio de acción, contribuyendo a la estabilización de los mismos durante el almacenamiento y transporte a condiciones extremas de temperatura y humedad. Por otra parte, el uso de la encapsulación de microorganismos como una forma de inmovilización celular, provee de una protección frente a condiciones adversas del ambiente, permite una alta concentración de células, lo cual puede favorecer a una mayor producción de bacteriocina por parte de las bacterias lácticas. Las diferentes técnicas de encapsulación pueden ser aplicadas a las bacteriocinas, péptidos antimicrobianos producidos por bacterias lácticas pudiendo liberarse en forma gradual en función del tiempo al medio que se desee (Champagne y col. 2007). Estudios previos sobre la estabilidad de la bacteriocina de *P. acidilactici* ITV 26 han demostrando que la encapsulación por extrusión en alginato de calcio, es un método viable para estabilizar la actividad antimicrobiana, protegiéndola del efecto de los ingredientes de un alimento (Jiménez y col. 2014).

## Justificación

El interés de ofrecer alimentos mínimamente procesados al mercado y la creciente demanda del consumidor actual hacia alimentos procesados sin aditivos químicos, ha llevado a la industria alimentaria a reconsiderar el potencial antimicrobiano de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, como una nueva estrategia de conservación.

## Problema

Las bacteriocinas debido a su naturaleza proteica son susceptibles de ser degradadas por el efecto de enzimas proteolíticas, cambios de pH, concentración de lípidos, etc. presentes en la matriz de un alimento. Razón por la cual es necesario plantear alternativas viables que permitan proteger la estabilidad de estos péptidos frente a dichos factores. Una estrategia tecnológica que actualmente se ha implementado en la industria alimentaria para proteger diversas moléculas biológicas, es la técnica de encapsulación y microencapsulación.

## Hipótesis

La bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* ITV 26 encapsulada en una matriz de alginato-almidón presenta estabilidad y actividad antimicrobiana, en función de la interacción de factores como pH y temperatura

## Objetivos

### Objetivo General

Evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre la liberación de la bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* ITV 26 en una matriz de alginato de calcio-almidón.

### Objetivos específicos

Evaluar la encapsulación de bacteriocina en una matriz alginato de calcio-almidón por el método de gelificación iónica.

Evaluar el efecto del pH y temperatura sobre la liberación de la bacteriocina encapsulada

Realizar cinéticas de liberación de la bacteriocina encapsulada y microencapsulada, por medio del método de difusión en agar utilizando como cepa sensible a *Listeria innocua* AST-062

### Marco Teórico

Las bacteriocinas se han definido como un grupo heterogéneo de compuestos antibacterianos de naturaleza proteica (péptidos), sintetizadas a nivel ribosomal variando en su modo de acción, espectro de actividad, peso molecular, propiedades bioquímicas y origen genético (Klaenhammer 1993; Carolissen-Mackay y col.1994; Vadyvaloo y col. 2002).

Sin embargo, los tratamientos térmicos o cambios de pH, pueden llegar a reducir su actividad antibacteriana, a pesar de ser termoestables y activas a amplios valores de pH. Pueden verse también afectadas por la presencia de enzimas proteolíticas, sales, ácidos, proteínas o lípidos presentes en los alimentos (Degnan y Luchansky 1992; Degnan y col. 1993).

Se conoce que en la matriz de un alimento la actividad de una bacteriocina disminuye por cambios en la solubilidad y carga molecular, pudiendo ocurrir también la unión a los componentes del mismo alimento. (Benech y col. 2002; Gálvez y col. 2008). Pueden presentarse cambios en la membrana de las células blanco como respuesta a los factores ambientales, esto a su vez influye en la actividad antagónica de la bacteriocina (Abee y col. 1994).

Se ha demostrado que la actividad de la bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ITV 26 disminuyó de 33 a 50 %, cuando se combinó con glucosa al 2, 5 y 10 %, la albumina a las mismas concentraciones, causó disminución de la actividad de 66.7 a 41.7 % en comparación con la lecitina al 2 y 5 % la cual inactivó a la bacteriocina causando una reducción de 99 % de la actividad antilisterial.

Respecto a la actividad antimicrobiana de la bacteriocina producida por *P. acidilactici* ITV 26 se ha observado que inhibió el crecimiento de *Enterococcus faecalis* NRRL B-537, *E. faecium* ITV45, *Lactobacillus acidophilus* M128-1, *L. acidophilus* NCK 1088,1785 y 8082. También se ha observado que inhibe el crecimiento de *Listeria monocytogenes* AST-0.67, *L. innocua* AST-062 y *L. innocua* BL. (Jiménez y col. 2000).

En cuanto a la estabilidad térmica de esta bacteriocina se ha demostrado que en extracto crudo, es estable a 72°C por 15 minutos, pero a 100°C su actividad se ve disminuida en función del tiempo, reteniendo solo un 26 % de la actividad original a los 10 minutos después de someterse al tratamiento térmico. Respecto a la estabilidad al pH, se ha observado que es estable, conservando su actividad antimicrobiana a valores de pH de 1.0 a 9.0. Perdiendo actividad a pH 11.0 ó superior (Lopez del Castillo, 1998).

Considerando los resultados de las investigaciones antes mencionadas, en las cuales se ha demostrado que la actividad de la bacteriocina se ve disminuida por factores ambientales, es necesario protegerla y estudiar la liberación en forma dosificada. Por lo cual se propuesto encapsular a la bacteriocina en alginato de calcio, estudiar la cinética de liberación y estabilidad de la actividad antimicrobiana que ha mostrado en forma libre frente a *L. innocua* AST-062 utilizada como cepa sensible.

## Metodología

### Reactivación de las cepas bacterianas

Se utilizó Caldo MRS (deMAN, Rogosa y Sharpe 1960), para la propagación y resuspensión en medio fresco de la cepa productora *Pediococcus acidilactici* ITV y Caldo LB (Luria Bertani), para reactivar la cepa sensible *Listeria innocua* AST-062 Agar LB y realizar las pruebas de actividad por el método de difusión en agar. La cepa productora se reactivó en medio MRS por 18 h a 37°C, posteriormente se realizó una resiembra del cultivo en las mismas condiciones. *L. innocua* AST-062 se incubó a 37°C por 18 h y posteriormente se resembró por 2 horas. La cepa productora se resembró al 1 % (v/v) en 500 mL de caldo MRS y se incubó a 37°C por 18 horas, para obtener la bacteriocina en extracto crudo.

### Producción de la bacteriocina

El cultivo se centrifugó a 12,000g a 4°C x 15 minutos y se obtuvo un sobrenadante libre de células (SLC). Al extracto crudo de bacteriocina obtenido, se le ajustó el pH a 6.8 utilizando NaOH al 5 %N. Posteriormente, se esterilizó a través de membranas millipore de 0.22 µm y se almacenó a -18 °C hasta su posterior evaluación.

La actividad de la pediocina se determinó por medio de la técnica de difusión en agar (spot onlawn), descrita por Schillinger y Lucke (1989).

Las placas de agar LB, se inocularon con 105 µl de cultivo de *Listeria innocua* AST 062 incubado durante 18 horas, a partir de este cultivo, se preparó una dilución 10<sup>-2</sup> utilizando una solución de cloruro de sodio al 0.8 % (p/v).

El cultivo, se sembró por vaciado en placa, posteriormente se perforaron pozos en el agar LB 6 mm de diámetro se colocaron 5 capsulas de la bacteriocina encapsulada en el pozo y se incubaron a 37°C

### Ensayos de actividad de la bacteriocina encapsulada

La actividad de la bacteriocina se determinó por medio de la técnica de difusión en agar (spot onlawn), descrita por Schillinger y Lucke (1989).

Las placas de agar LB, se inocularon con 105 µl de cultivo de *Listeria innocua* AST 062 incubado durante 18 horas, a partir de este cultivo, se preparó una dilución 10<sup>-2</sup> utilizando una solución de cloruro de sodio al 0.8 % (p/v). El cultivo, se sembró por vaciado en placa, posteriormente se perforaron pozos en el agar LB (6 mm de diámetro) y se colocaron 30 µl de muestras y en el caso de la bacteriocina encapsulada se colocaron 4 cápsulas en cada pozo y se incubaron a 37°C

### Encapsulación

La encapsulación de la bacteriocina se realizó por medio de gelificación iónica y extrusión. En un matraz se vertieron 50 mL bacteriocina en extracto crudo con un pH 6.8, y 50 mL de la solución de alginato de calcio-almidón a una concentración 1%(p/v), con ayuda de una jeringa de insulina (30G X 13 mm) se extruyó la matriz en una solución de (CaCl<sub>2</sub>) al 0.3 M, se tomó el tiempo que correspondió a 6 min. Las capsulas obtenidas se filtraron a través de papel Whatman, para su posterior uso.

### Matriz alginato de calcio almidón

Se preparó una solución de alginato de calcio a una concentración 2% a la cual se le agregó almidón al 8% y se llevó a un volumen de 50 mL con agua destilada.. Posteriormente se esterilizó a 115°C durante 5 min.

## Ensayo de liberación de bacteriocina encapsulada

La liberación de la bacteriocina encapsulada se realizó siguiendo el método de Narshaia 2013 con modificaciones. La actividad antimicrobiana de bacteriocina encapsulada se evaluó mediante unidades formadoras de colonia por ml UFC/mL. Utilizando como cepa sensible a *Listeria innocua* AST-062. Para la liberación de la bacteriocina se utilizaron tres conjuntos de matraces que contenían 200 mL de Caldo LB a pH 7.0 (Narsaian, 2013). Para el segundo experimento el caldo LB se ajustó el pH 6.0.

A los matraces se añadieron 400 µl de *Listeria innocua* AST-062

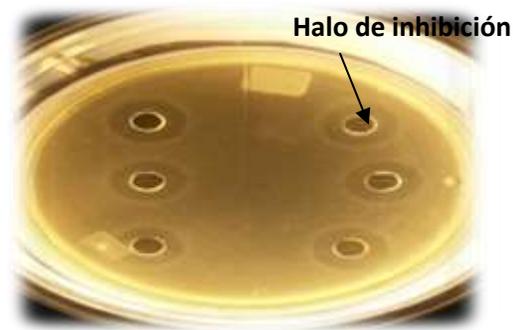
Al segundo se le adicionaron 24 mL de bacteriocina en extracto crudo y al último matraz se le agregaron 24 g de cápsulas.

Un matraz se utilizó como tratamiento testigo. Los matraces se incubaron a 37°C durante 72 horas. Para realizar la cinética se tomaron muestras cada 4 horas, considerando como primer punto la hora cero, correspondiente al inicio de la cinética, posteriormente las muestras cinco, seis y siete fueron cada 12 horas después del último punto, terminando en 72 horas, correspondientes a un lapso de 24 horas. De cada muestra se tomaron alícuotas de 1000 µl, las cuales se diluyeron en tubos que contenían 4.5 ml de agua peptonada. Una vez preparadas las diluciones se virtieron 1000 µL de cada muestra en cajas petri y 15ml de agar LB. Posteriormente las placas se incubaron a 37°C durante 30 horas.

## Resultados

### Pruebas de actividad antimicrobiana

La bacteriocina encapsulada en una matriz alginato-almidón, logró inhibir el crecimiento de la cepa sensible, observándose halos de inhibición como se muestra en la figura 1. Lo cual indica que la actividad de la bacteriocina encapsulada disminuye a través del tiempo (Tabla 1). Sin embargo se observó que después de la hora cinco, las cápsulas aún contenían bacteriocina. La resistencia que mostró la cepa sensible al efecto de la bacteriocina (ELC) así como a la bacteriocina encapsulada, posiblemente se debió a que el cultivo se encontraba en condiciones óptimas de crecimiento, observando diferencias significativas en los resultados de ambos tratamientos.



**Figura 1** halos de inhibición de *L. innocua* AST-062 por efecto de la bacteriocina encapsulada (Elaboración Propia)

| Halos de inhibición |                 |                 |
|---------------------|-----------------|-----------------|
| T (h)               | ELC             | CAPSULAS        |
| 0                   | 2.175 ± 0.007 a | 1.185 ± 0.011 a |
| 1                   | 2.075 ± 0.021 b | 1.170 ± 0.001 b |
| 2                   | 1.975 ± 0.021 c | 1.160 ± 0.001 c |
| 3                   | 1.835 ± 0.007 d | 1.165 ± 0.007 d |
| 4                   | 1.535 ± 0.007 e | 0.955 ± 0.001 e |
| 5                   | 1.270 ± 0.014 f | 0.678 ± 0.001 f |

**Tabla 1** Actividad antimicrobiana de la bacteriocina de *P. acidilactici* ITV 26

Promedio de dos repeticiones por triplicado de la muestra ± desviación estándar. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Teixera y col. (2007) señalan que la bacteriocina producida por *Bacillus licheniformis* p40, encapsulada en nanovesículas de fosfatidilcolina, inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Observando estabilidad de las nanovesículas durante 30 días almacenadas a 4 °C con una efectividad antilisterial del 10% al final del experimento. Por otra parte, Ibarguren y col, (2012) reportaron también la actividad de las bacteriocinas sintetizadas por *Enterococcus faecium* CRL 1385, encapsuladas por gelificación iónica, sobre las células de *Listeria monocytogenes* 99/287, encontrando que las cápsulas mantienen su actividad en el lapso de un año conservadas a 18°C después del proceso de encapsulación y de un doble proceso de liofilización, además describieron una mayor eficacia en las cápsulas en medio líquido respecto al medio sólido.

En comparación con los resultados obtenidos en este trabajo, en el cual se observaron halos de inhibición sobre el crecimiento de la cepa sensible, lo cual indica la estabilidad del péptido en función del tiempo y la temperatura en medio sólido y que difieren respecto a los resultados reportados por Ibarguren y col. (2012).

### Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de la bacteriocina encapsulada

En la tabla 2 se muestra el efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de la bacteriocina en la cual se observa la inhibición de la cepa sensible, no se presentan diferencias significativas en los tratamientos a pH 7.0 y 6.0, lo cual demuestra que la bacteriocina es estable en un intervalo de pH's de 1.0 a 9.0 (López del castillo 1998).

| pH | <i>L. innocua</i> AST-062 | Extracto libre de células (ELC) |                 | Bacteriocina Encapsulada |                 |
|----|---------------------------|---------------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
|    | UFC/ML                    | UFC/ML                          | % de Inhibición | UFC/ML                   | % de Inhibición |
| 7  | 9.27 ± 2.39 a             | 7.88 ± 2.33 a                   |                 | 8.08 ± 2.09 a            | 12.84           |
| 6  | 9.07 ± 2.25 a             | 8.59 ± 6.29 a                   |                 | 7.89 ± 2.04 a            | 13.01           |

<sup>ab</sup> Medidas seguidas con la misma letra entre filas no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

**Tabla 2** Efecto del pH sobre la estabilidad de la bacteriocina vs la cepa sensible *L. innocua* AST-062

### Efecto de la temperatura sobre la actividad antimicrobiana de la bacteriocina encapsulada

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la bacteriocina encapsulada, se observa en los resultados de la tabla 3

| T °C | <i>L. innocua</i> AST-062 | Extracto libre de células (ELC) |        |                 | Bacteriocina Encapsulada |                 |
|------|---------------------------|---------------------------------|--------|-----------------|--------------------------|-----------------|
|      |                           | UFC/ML                          | UFC/ML | % de Inhibición | UFC/ML                   | % de Inhibición |
| 37   | 10.64 ± 2.22 a            | 10.01 ± 6.18 a                  | 5.93   | 9.30 ± 2.05 a   | 12.6                     |                 |
| 15   | 07.70 ± 1.20 b            | 06.46 ± 0.74 b                  | 16.11  | 6.68 ± 0.90 b   | 13.25                    |                 |

Promedio de dos repeticiones por triplicado de la muestra ± desviación estándar.

<sup>ab</sup> Medidas seguidas con la misma letra entre filas no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )

**Tabla 3** Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la bacteriocina encapsulada vs *L. innocua* AST-062

De acuerdo a los resultados obtenidos a 37°C la cepa crece 10.64 log UFC/mL mientras que a 15°C crece 7.70 log UFC/mL, obteniendo diferencias significativas. Tomando en cuenta que *Listeria innocua* AST-062 presenta un mayor crecimiento a 37°C y la bacteriocina es estable a 37°C (López del Castillo 1998). Mientras que para el tratamiento en el cual la cepa sensible estuvo en contacto con la bacteriocina encapsulada, se obtuvieron diferencias significativas observando que la bacteriocina encapsulada inhibe el crecimiento de *Listeria innocua* AST-062 en un ciclo log cuando se expuso a 37°C y 15°C

### Efecto del Tiempo sobre la Estabilidad de la Bacteriocina

En la tabla 4 se muestra el efecto del tiempo sobre la estabilidad de la bacteriocina y se observó que los diferentes tratamientos los resultados son altamente significativos (Tabla 4), demostrando que a partir de la hora ocho, la bacteriocina encapsulada comenzó a inhibir el crecimiento de la cepa sensible, presentando una reducción de más de un ciclo logarítmico. Narsaiah y col. (2013), al estudiar la microencapsulación de pediocina en diferentes matrices a base de alginato-lectina, alginato-fosfatidilcolina y alginato, observaron mayor efectividad en la matriz alginato-fosfatidilcolina, utilizada como encapsulante con la cual se obtuvo una reducción de 3.5 ciclos logarítmicos sobre el crecimiento de *L. innocua* en una cinética de 72 horas. Concluyendo que las cápsulas formuladas con alginato, goma guar y los liposomas de fosfatidilcolina fueron los tratamientos más efectivos para la liberación controlada de la pediocina. Los resultados de este trabajo muestran que la combinación de polímeros como alginato-almidón favoreció la liberación controlada de la bacteriocina demostrando que a partir de la hora ocho, la bacteriocina encapsulada comenzó a inhibir el crecimiento de la cepa sensible, presentando una reducción de más de un ciclo logarítmico respecto al tratamiento testigo.

| Tiempo (h) | <i>L. innocua</i> AST-062 | Etracto libre de células (ELC) |        | Bacteriocina Encapsulada |                 |
|------------|---------------------------|--------------------------------|--------|--------------------------|-----------------|
|            | UFC/ML                    | UFC/ML                         |        | UFC/ML                   | % de Inhibición |
| 0          | 6.16 ± 0.12 c             | 6.06 ± 0.14 a                  | 1.7    | 6.13±0.09 c              | 0.48            |
| 4          | 7.76±1.41bc               | 6.09 ± 0.33 a                  | 21.52  | 6.56±0.62 bc             | 15.46           |
| 8          | 8.39±1.83abc              | 7.15±1.42a                     | 14.78  | 7.0±0.86 abc             | 16.57           |
| 12         | 9.43±2.45ab               | 8.29±2.71a                     | 12.09  | 8.45±2.26abc             | 10.39           |
| 24         | 10.12±1.95ab              | 8.07±2.27a                     | 20.26  | 8.35±2.49abc             | 17.49           |
| 36         | 10.83±2.21a               | 8.88±2.37a                     | 18.01  | 8.50±2.25abc             | 21.54           |
| 48         | 10.47±1.77ab              | 8.62±1.54a                     | 17.67  | 9.32±2.37ab              | 10.98           |
| 72         | 10.20ab                   | 12.72±11.93 a                  | -24.71 | 9.57±1.39a               | 6.18            |

Promedio de dos repeticiones por triplicado de la muestra ± desviación estándar.

<sup>ab</sup> Medidas seguidas con la misma letra entre filas no son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ )

**Tabla 4** Efecto del tiempo sobre la estabilidad de la bacteriocina e inhibición de *Listeria innocua* AST-062

## Conclusiones

La combinación de los polímeros alginato-almidón como matriz encapsulante, permitieron la liberación de la bacteriocina de manera controlada en función del tiempo.

La bacteriocina encapsulada inhibió el crecimiento de la cepa sensible *Listeria innocua* AST-062.

Los factores como las diferentes temperaturas y los diferentes valores de pH evaluados, no afectaron la estructura de las cápsulas y la actividad del péptido sobre el crecimiento de la cepa sensible.

El tiempo resultó ser un factor determinante en el proceso de liberación de la bacteriocina encapsulada.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo brindado para la realización del presente trabajo al Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz, México.

## Referencias

Abee, T., Klaenhammer, T. y Letellier, L. 1994. Kinetic studies of the action of Lactacin F a bacteriocin produced by *L. johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. Appl. Env. Microbiol. 60(3):1006-1013

Benech, R.O., Kheadr E, Lacroix, C. y Fliss, I. 2002 Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during cheddar cheese ripening.68: 5607-5619. Carolissen-Mackay, V., Arendse, G. y Hastings, J. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria and pointers. Int. J. Food Microbiol. 34 : 1-16

DeMan, J. C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23:130-135.

Champagne, C. P. & Fustier P. 2007 Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. Current Opinion in Biotechnology 18: 184-190.

Degnan, A.J., Buyong Nurliza y J.B. Luchansky. 1993 Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. International Journal of Food Microbiology. 18:127-138.

Degnan, A. J., Piva, A. y Luchansky, J.B. 1996. Preservation of Food Using Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins. Food Testing and Analysis. Pp. 17-19

- Ibarguren, C., Grosso, C. R., & Apella, M. (2012). Anti-*Listeria monocytogenes* activity of enterocins microencapsulated. *Food Hydrocolloids*, 21-26
- Gálvez, A., Lucas, R. y Abriouel, H. 2008. Application of Bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*. 28: 125-152
- Jiménez, H. M., Escudero A. B. y Mendoza G. P. 2000 Antibacterial Activity of the bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* ITV 26 in Model Food Systems IFT Annual Meeting and Food Expo 10 al 14 Junio Dallas, Texas USA
- Jiménez H., M., Mendoza G., P., Tejero A., J. & Oliart R.R.M. 2014. Inhibición de *Listeria innocua* AST-062 por la bacteriocina de *Pediococcus acidilactici* ITV 26 encapsulada en alginato de calcio. Congreso interdisciplinario de Cuerpos Académicos 11 al 12 de Septiembre Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato, México.
- Jyothi, V., Prasanna, M., Sakarkar, S., Prabha, S., Ramaiah, S. y Srawan, G. 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J. of Microencapsulation* 27(3): 187-197
- Klaenhammer, T. 1988 Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70:337-349.
- Krasaekoop, W., Bhandari, B. y Deeth H., 2003 Evaluation of Encapsulation techniques of probiotics for yogurt. *Int. Dairy Journal* 13: 3-13.
- López del Castillo, L. (1998). Aislamiento de *Pediococcus acidilactici* ITV 26 y caracterización parcial de la bacteriocina producida. Tesis de Maestría Instituto Tecnológico de Veracruz. México
- Narsaiah K., Jha S., Wilson R., Mandge H., Manikantan M., Malik R. & Vij S. 2013
- Pediocin-Loaded Nanoliposomes and Hybrid Alginate-Nanoliposomes Delivery Systems for Slow Release of Pediocin. *BioNanoScience*. 3:37-42
- Schillinger, U., Lücke, F.K. 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906
- Teixeira, L.M., dos Santos, J., Silveira, N., y Brandelli, A. 2007 Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 444: 1-5.