



XXI CONGRESO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE
DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

XVII CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



CyTAL[®]-ALACCTA 2019



20 al 22 de Noviembre de 2019
Universidad Católica Argentina
Sede Puerto Madero
Buenos Aires - Argentina





CYTAL-ALACCTA 2019
Buenos Aires, 20 – 22 noviembre 2019

APLICACIÓN DE BACTERIOCINAS SECADAS POR *SPRAY* COMO BIOPRESERVANTES DE QUESOS

R. M. Lenz¹, M. C. Soria^{1,2}, M. C. Audisio^{1,2,3}, C. Iburguren^{1,4}

1 Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI-CONICET).

2 Facultad de Ingeniería, 3 Facultad de Ciencias Exactas, 4 Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta, Argentina.

E-mail: rominalenz22@gmail.com

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un patógeno que puede ser causal de contaminación en alimentos refrigerados listos para consumo, como, por ejemplo, quesos. Las bacteriocinas sintetizadas por el género *Enterococcus* (enterocinas) poseen un fuerte efecto listericida, y constituyen una alternativa natural para el control de este patógeno en alimentos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la efectividad antimicrobiana de bacteriocinas sintetizadas por la cepa *Enterococcus avium* DSMZ17511 secadas por *spray*, incorporadas en recubrimientos activos a base de agar aplicados en quesos de cabra contaminados artificialmente con *L. monocytogenes* 99/287. El sobrenadante libre de células (SLC) se recuperó de un cultivo de *E. avium* DSMZ17511 en el medio económico HS3-LC5 (Harina de soja 3 %p/v y Levadura de cerveza deshidratada 5 %p/v), diseñado en el laboratorio. Fracciones de este SLC se secaron en el equipo Mini Spray Dryer Buchi B-290 (T_{entrada} : 150°C y T_{salida} : 83-87°C, flujo_{alimentación}: 6,7 mL/min, flujo_{aspiración}: 37 m³/h). Como recubrimiento de los quesos se utilizó una solución de agar de grado alimenticio (0,8% p/v), con agregado de glicerol 20% p/p respecto al polímero. Para los recubrimientos activos se añadió 2 %p/v de SLC en polvo. Se dispuso asépticamente de grupos de 20 quesos (*ca.* 2 cm diámetro), que fueron sumergidos durante 10 segundos en la suspensión tibia de agar con y sin agregado de SLC, y secados en estufa a 25°C durante 24 h. Así, se obtuvo por duplicado 3 sistemas de 20 quesos: (A) control sin recubrimiento, (B) con recubrimiento de agar y (C) con

recubrimiento de agar y SLC. Por otra parte, otros grupos de quesos (Sistemas A', B' y C') fueron contaminados por inmersión en una suspensión de *L. monocytogenes* 99/287 en agua peptona (ca. 10^7 ufc/mL). Además, se utilizó una fracción de esta suspensión del patógeno como control de su crecimiento. Los quesos de cada sistema (A, B, C, A', B', C') se colocaron individualmente en pocillos de microplacas estériles (BD Falcon™ 12 pocillos), y se almacenaron refrigerados (4°C), siguiendo la sobrevida del patógeno durante 2 semanas (0, 3, 7, 10, 13 días) mediante recuentos en agar Oxford (Biokar, Francia). Todos los ensayos se hicieron por duplicado. No se observó crecimiento del patógeno en los sistemas A, B y C (no contaminados). Por otra parte, el crecimiento de *L. monocytogenes* aumentó de manera similar en los sistemas A' y B'; mientras que, en los quesos recubiertos con la película activa (C'), se observó una pequeña disminución de la viabilidad del patógeno (ca. 0,5 log ufc/mL) respecto a los controles. La textura blanda y húmeda de los quesos empleados, pudo haber favorecido la rápida difusión del antimicrobiano, impidiendo que se mantuviera disponible en la superficie del queso. Las bacteriocinas ensayadas, agregadas como SLC en polvo en una concentración del 2 %p/v en películas de agar, mostraron efecto inhibitorio al ser aplicados como recubrimientos en quesos contaminados con *L. monocytogenes*. Este efecto podría mejorarse al aplicar los recubrimientos sobre matrices más secas, o aumentando la concentración de SLC en polvo en las películas activas.

Palabras claves: bacteriocinas, biopreservantes, quesos, secado *Spray*, *Listeria monocytogenes*

1. Introducción

Las bacteriocinas son péptidos catiónicos, hidrofóbicos y extracelulares excretados por una amplia variedad de bacterias que inhiben o detienen el crecimiento de bacterias de especies relacionadas (Jack y col., 1995). Las bacteriocinas sintetizadas por cepas del género *Enterococcus* se denominan enterocinas (Eijsink y col., 1998), y debido a su fuerte efecto listericida, resultan de particular interés como biopreservantes naturales y seguros en la industria de alimentos (Gálvez y col., 2007).

La adición de bacteriocinas como sobrenadantes obtenidos de cultivos bacterianos o concentrados parcial o totalmente purificados en sustratos de grado alimenticio, se presenta como una de las alternativas para la biopreservación de alimentos (Balciunas y col., 2013); sin embargo, es necesario que estas preparaciones

sean estables y libres de células productoras. El secado por *spray* es un proceso útil para la producción a gran escala de microcápsulas de moléculas bioactivas, permitiendo que puedan ser transportadas a bajo costo y conservadas en forma estable durante largos periodos de tiempo (Gardiner y col. 2000). Además, este proceso puede ser aplicado en materiales sensibles al calor, principalmente compuestos biológicamente activos o células (Doherty y col., 2011).

Por otra parte, el queso es un producto listo para consumo que generalmente no se somete a ningún tratamiento térmico antes del consumo y se mantiene a temperaturas de refrigeración, condiciones que permiten la supervivencia y el crecimiento de bacterias psicrófilas, como *Listeria monocytogenes* (Melo y col., 2015). Este microorganismo es capaz de sobrevivir durante la elaboración, maduración, fermentación y almacenamiento de diversos productos lácteos (Bhatti, 2009). Por esta razón, *L. monocytogenes* representa un patógeno de riesgo para la industria del queso (Cao-Hoang, 2010; O'Bryan y col., 2018).

Estudios previos mostraron resultados promisorios respecto a la aplicación de las bacteriocinas sintetizadas por la cepa *Enterococcus avium* DSMZ17511 como aditivos antimicrobianos en recubrimientos a base de agar en quesos comerciales y artesanales (Guitián, 2015; Guitián y col., 2015). Asimismo, se desarrolló un medio de cultivo alternativo y de bajo costo para la obtención de bacteriocinas de la cepa DSMZ17511 en un sustrato de grado alimenticio (Guitián y col., 2018).

En base a lo expuesto, se propuso como *objetivo* del presente trabajo la aplicación de la tecnología de secado *spray* para la obtención de fracciones deshidratadas de las bacteriocinas sintetizadas por *E. avium* DSMZ17511 en un medio de cultivo rentable y de grado alimenticio. A su vez, se planteó evaluar la efectividad antimicrobiana de estas microcápsulas de bacteriocinas, mediante su incorporación como recubrimientos activos a base de agar en quesos de cabra artificialmente contaminados con *L. monocytogenes*.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Como productora de bacteriocinas se usó la cepa *Enterococcus avium* DSMZ17511 (Audisio y col., 2005; Ibarguren, 2010) y como cepa indicadora se utilizó *Listeria monocytogenes* 99/287, ambas disponibles en la colección de cultivos del Laboratorio de Bacteriología Aplicada (INIQUI-CONICET-UNSa). Los cultivos se activaron por

repiques sucesivos en caldo infusión-cerebro corazón (BHI) e incubación a 37 °C durante 16-20 h. Para cuando se necesitó de medios agarizados, se adicionó agar 1,5 %p/v. En los ensayos que requirieron crecimiento selectivo de *L. monocytogenes*, se siguió el desarrollo del patógeno en Agar Oxford modificado (Biokar, Francia).

2.2 Solución de bacteriocinas

El sobrenadante libre de células (SLC) de la cepa productora se recuperó por centrifugación (6.000g, 20 min, 20 °C) de cultivos crecidos 20 h (37°C) en un medio alternativo económico de harina de soja 3% p/v y de levadura de cerveza deshidratada 5% p/v, diseñado en el laboratorio (Gutián y col., 2018); y posterior filtración (membranas de acetato de celulosa de 0,45 µm de diámetro de poro, Millipore).

El título de actividad antimicrobiana, expresado en UA/mL, se determinó por el método de las diluciones seriadas frente a la *L. monocytogenes* 99/287 como cepa indicadora (Daba y col., 1991). Para ello, alícuotas de 20 µL de cada dilución fueron sembradas en pocitos de 5 mm de diámetro realizados en una placa de Petri con BHI agarizado e inoculada con 100 µL de un cultivo activo de la cepa sensible. Se dejó difundir por una hora a temperatura ambiente y luego la placa se incubó a la misma temperatura durante 24 h. Así, el título de la solución queda definido por el recíproco de la mayor dilución que aún inhibe el desarrollo de la cepa sensible $UA/mL=1000/(V_s \cdot D)$ donde V_s : volumen solución de bacteriocinas sembrado (20 µL) y D: mayor dilución que aún inhibe el crecimiento de la cepa indicadora. El título final del SLC utilizado para los ensayos de secado fue de 6.400 UA/mL.

2.3. Obtención de bacteriocinas deshidratadas por secado *spray*

Para el secado *spray* se utilizó suero de queso (Verónica, lote SL0511), considerado un subproducto de la industria quesera, como material de pared económico. Esta matriz fue adicionada en una concentración final de 10 %p/v (60 g) a 600 mL de SLC obtenidos en medio optimizado. Una vez agregada la matriz protectora, las fracciones fueron colocadas en un agitador magnético a temperatura controlada (50°C) y agitación constante. Se obtuvo el SLC deshidratado mediante la tecnología de secado por *spray* (T_{entrada} : 150°C, T_{salida} : 83-87°C, flujo de alimentación: 6,7 mL/min, flujo de aspiración: 35 m³/h) (Ben Amara y col., 2017), utilizando un equipo Mini Spray Dryer Buchi B-290. Este proceso se realizó por duplicado.

2.4. Aplicación de las bacteriocinas obtenidas como polvos deshidratados en una matriz alimentaria

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de *E. avium* DSMZ17511 obtenidas en el medio de cultivo económico y secadas por *spray*, mediante su incorporación en recubrimientos activos en quesos de cabra contaminados artificialmente con *L. monocytogenes*. Se seleccionó la aplicación en quesos de cabra, por tratarse de un producto de elaboración artesanal y gran demanda regional, susceptible a la contaminación con *L. monocytogenes*.

Quesos: Se utilizaron dos tipos de quesos de cabra. Por un lado, quesos frescos elaborados en el laboratorio a partir de leche de cabra fresca pasteurizada, según la técnica de Gonçalves de Oliveira y col. (2014). Además, se utilizó como control un queso de cabra comercial adquirido en el Mercado Municipal de la Ciudad de Salta.

Recubrimiento de los quesos: Los ensayos se hicieron sobre el queso fraccionado asépticamente en porciones de 2cm diámetro y 5g *ca.*, con un sacabocados.

Se aplicó como recubrimiento una solución tibia de agar de grado alimenticio en una concentración del 0,8% p/v, con agregado de glicerol 20% p/p respecto al polímero, como plastificante. A los recubrimientos activos se les agregó una cantidad determinada de SLC en polvo secado con suero de queso como material termoprotector y almacenada a -18°C, en una proporción final de 2 o 3 %p/v en la suspensión de agar. El SLC en polvo fue resuspendido en agua destilada estéril previo a su adición a la suspensión formadora de película. Las películas control se hicieron agregando el mismo volumen de agua destilada estéril utilizada para la resuspensión del SLC en polvo.

Previo al recubrimiento de los quesos, se evaluó la actividad antimicrobiana de las películas de agar obtenidas, para comprobar la efectividad de las bacteriocinas deshidratadas adicionadas. Para ello, fracciones de cada película (control y adicionadas con bacteriocinas) de *ca.* 1cm² y esterilizados bajo luz UV, se cortaron y se dispusieron asépticamente sobre un césped de agar BHI inoculado con *L. monocytógenes* 99/287 (*ca.* 10⁷ ufc/mL). Se incubaron a 37°C durante 24 h y se observó la presencia de halos de inhibición. Asimismo, se realizó un ensayo similar, colocando una fracción de queso recubierto con cada película sobre un césped inoculado con *L. monocytogenes*, para verificar la difusión de las bacteriocinas incorporadas en la película de agar.

Posteriormente, grupos de 20 quesos se sumergieron durante 10 segundos en la suspensión tibia de agar con y sin agregado de SLC (Guitián, 2015).

De este modo, se dispuso, por duplicado, de tres sistemas de 20 quesos de la siguiente manera: (A) control sin recubrimiento, (B) con recubrimiento de agar, (C) con recubrimiento de agar y SLC.

Cada sistema de quesos se colocó en recipientes individuales sobre una rejilla de plástico para permitir la formación de una película uniforme en toda la superficie y facilitar el escurrido de la película aplicada (Figura 3B). Se los dejó secar a 25 °C durante 24 h.

Evaluación del efecto antimicrobiano de las bacteriocinas aplicados como recubrimientos en los quesos: Se dispuso de un grupo de quesos ya preparados, para contaminarlos por inmersión en una suspensión de *L. monocytogenes* 99/287 en agua peptona de ca. 10^5 ufc/mL (Sistemas: A', B' y C'). Además, se utilizó el otro grupo de los mismos sistemas (A, B y C) no contaminados con el patógeno; así como una fracción de la suspensión de *L. monocytogenes* 99/287 como control de crecimiento del microorganismo en tubos de vidrio (Figura 3C) (Gutián, 2015).

A continuación, los quesos de cada sistema se colocaron individualmente en pocillos de microplacas estériles (BD Falcon™, 12 pocillos).

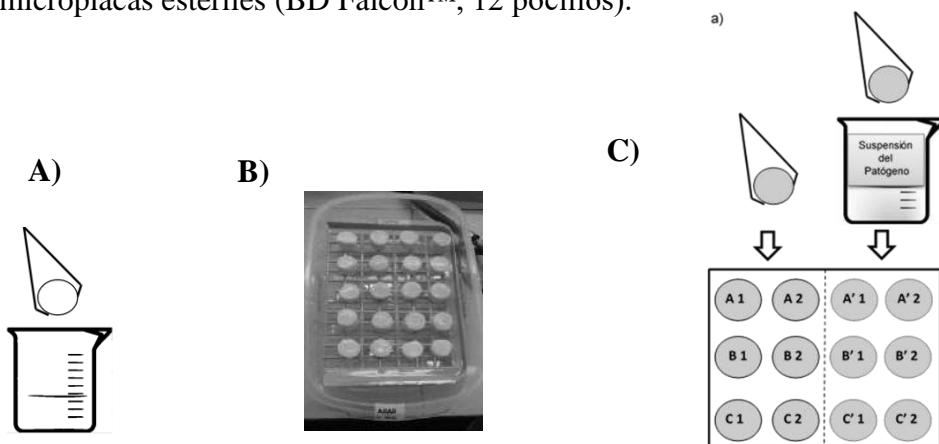


Figura 1. **A)** Suspensiones tibias de agar para el recubrimiento de quesos. **B)** Fotografías de los quesos (A: control sin recubrimiento, B: con recubrimiento de agar y C: con recubrimiento de agar y SLC). **C)** Esquema de la microplaca usada para el ensayo de sobrevivencia de *L. monocytogenes* 99/287 en quesos, (A) quesos sin recubrimiento; (B) quesos con recubrimiento de película de agar 0,8% p/v; (C) quesos con recubrimiento de película de agar 0,8% p/v y SLC. (A'), (B') y (C') corresponden a los respectivos sistemas contaminados con el patógeno. (1) y (2) réplicas para cada sistema (adaptado de Gutián, 2015).

Se prepararon cinco microplacas (cada una con tres sistemas no contaminados y otros tres sistemas contaminados con el patógeno, cada sistema por duplicado), así como 2 tubos con la suspensión control de *L. monocytogenes* 99/287, se ubicaron en envases herméticos y se mantuvieron refrigeradas (4 °C, en heladera) y con humedad controlada, colocando algodón embebido en agua para mantener la humedad de los

quesos en la heladera durante el ensayo (Chávez, 2014). Se siguió la sobrevida del patógeno en los distintos sistemas de quesos durante 2 semanas (0, 3, 7, 10, 13 días).

Para la determinación de viabilidad de *L. monocytogenes* se preparó un homogenato de cada queso (ca. 5 g) en 45 mL de agua peptona estéril (dilución 10^{-1}), usando bolsa tipo Ziploc® estériles. Con este homogenato se prepararon las diluciones necesarias y se hizo el recuento del patógeno en agar Oxford modificado para *Listeria*.

Una vez concluida cada experiencia, los quesos contaminados y todo el material utilizado se descartó cuidadosamente previa esterilización en autoclave.

Análisis estadístico: Todos los ensayos se hicieron por duplicado. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el programa Microsoft® Excel 2010.

3. Resultados y discusión

El objetivo del trabajo fue analizar el comportamiento de recubrimientos de agar funcionalizados con el agregado de bacteriocinas en polvo frente a *L. monocytogenes*, en un alimento susceptible a contaminación con este patógeno. Durante 13 días, se determinó la sobrevida de *L. monocytogenes* en quesos de cabra elaborados en el laboratorio (Figura 1A) y quesos de cabra adquiridos en el Mercado Municipal de la Ciudad de Salta (Figura 1B), recubiertos con las películas activas y contaminados artificialmente con el patógeno.

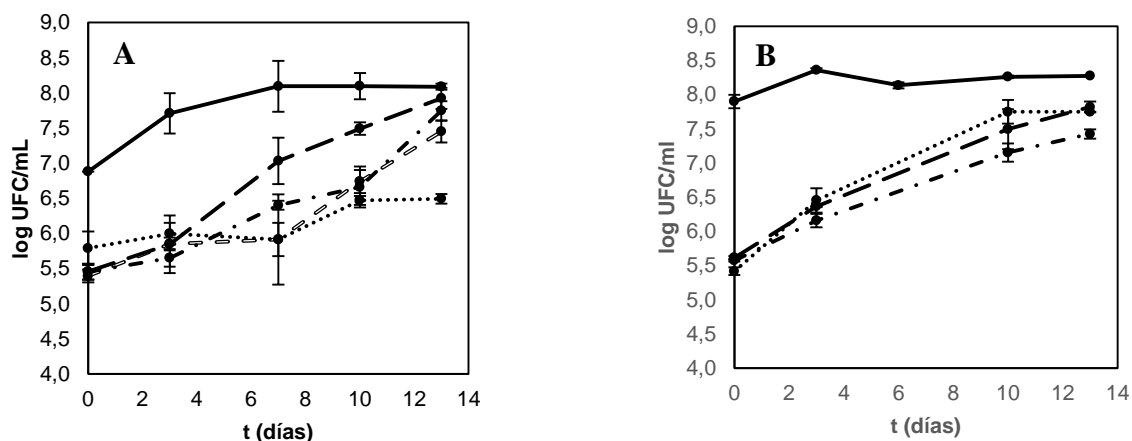


Figura 1. Viabilidad de *L. monocytogenes* 99/287 en quesos de **cabra** (A) frescos elaborados en el laboratorio, (B) comerciales, contaminados con el patógeno (línea de puntos), recubiertos con película de agar (0,8% p/v) (línea de guiones), recubiertos con películas de agar (0,8% p/v) + SLC (2% p/v) (línea guiones y puntos), recubiertos con película de agar (0,8% p/v) y SLC (3% p/v) (doble línea). Control de crecimiento del patógeno en agua peptona (línea continua).

En el caso de los quesos frescos elaborados en el laboratorio, el crecimiento del control de *L. monocytogenes* en agua peptona se mantuvo en ca. 8 log ufc/mL durante los 13 días de ensayo. Por otra parte, la viabilidad del patógeno en los quesos control sin película y en los quesos recubiertos con películas sin bacteriocinas, aumentó de manera

similar de 5,5 log ufc/mL a 7,5 log ufc/mL en los 13 días que duró el experimento. Mientras que, en los quesos recubiertos con la película activa, se observó una pequeña disminución de la viabilidad del patógeno respecto a los controles, con una diferencia de *ca.* 0,5 log ufc/mL a partir de los 10 días.

Para los quesos comerciales, el crecimiento del patógeno fue diferente al esperado. El control en agua peptona tuvo un crecimiento lógico variando de 7 log ufc/mL a 8 log ufc/mL durante los 13 días de ensayo. En los quesos control sin película, la viabilidad de *L. monocytogenes* aumentó de 5,7 log ufc/mL a 6,7 log ufc/mL. En cambio, en los quesos recubiertos con agar sin bacteriocina, la viabilidad del patógeno aumentó dos órdenes (5,5 log ufc/mL a 7,5 log ufc/mL). Finalmente, para los quesos recubiertos con películas activas se observó una diferencia de *ca.* 1,5 log ufc/mL respecto al control recubierto con agar entre el día 2 y día 10 de ensayo, alcanzando valores de viabilidad cercanos al control en el día 13.

Las experiencias de aplicación de las bacteriocinas en quesos se diseñaron en base a resultados previos obtenidos en el laboratorio, al aplicar SLC de la cepa DSMZ17511 obtenido en el medio comercial BHI como recubrimientos activos de agar en quesos contaminados con *L. monocytogenes* (Gutián, 2015). En este caso, se evaluó el efecto del agregado del SLC de la cepa productora obtenida en un medio económico y secado por *spray*, en películas activas de agar sobre quesos de cabra elaborados en el laboratorio.

La adición del SLC seco en películas a base de agar no afectó su actividad antimicrobiana, ya que se observaron halos de inhibición alrededor de las películas en contacto con un agar inoculado con *L. monocytogenes* 99/287 (resultados no mostrados).

Los ensayos con quesos, se hicieron inicialmente con quesos de cabra frescos preparados en el laboratorio, que resultaron con una textura blanda y muy húmeda, dificultando su recubrimiento con las películas de agar. Esta textura de alta humedad se mantuvo durante todo el periodo de ensayo de la sobrevivencia de *L. monocytogenes*. La excesiva humedad pudo haber favorecido el crecimiento del patógeno en los quesos control (sin recubrimiento y con recubrimiento sin agregado de bacteriocinas), alcanzando valores de viabilidad similares a los del crecimiento del patógeno en agua peptona (Figura 10A). A su vez, la humedad del queso pudo haber favorecido la rápida difusión de las bacteriocinas, motivo por el cual no se mantuvo disponible en la superficie del queso y los valores de viabilidad difirieron en apenas 0,5 log ufc/mL.

Con estos resultados, se repitieron los ensayos, usando queso de cabra comercial con un mayor periodo de estacionamiento y una matriz más seca. Sorpresivamente, la viabilidad del patógeno, sólo se vio controlada en aquellos quesos sin recubrimiento de agar (Figura 10B); mientras que, en los quesos con recubrimiento, la viabilidad de *L. monocytogenes* 99/287 alcanzó niveles similares al del control en agua peptona. Para los recubrimientos activos, si bien se observó un efecto inhibitorio respecto al crecimiento en los quesos cubiertos con agar, los valores de viabilidad se mantuvieron similares o por encima de los registrados para los quesos control sin película, aun cuando se utilizaron dos concentraciones diferentes de bacteriocinas deshidratadas.

Se observó un menor efecto inhibitorio de las películas activas preparadas con bacteriocinas secas respecto al registrado en ensayos anteriores realizados en el laboratorio, con recubrimientos elaborados con SLC líquido obtenido en medio comercial, con una disminución de 1 log ufc/mL (Guitián, 2015). Por otra parte, Cao-Hoang y col. (2010) detectaron una reducción de 1,1 log ufc/mL en la viabilidad de *L. innocua* en quesos recubiertos con matrices de caseinato de sodio funcionalizadas con nisina, y contaminados artificialmente con este patógeno, luego de 7 días de almacenamiento a 4 °C. Dalzini y col. (2016) observaron una disminución promedio de 2,12 log ufc luego de 15 días de almacenamiento, en la viabilidad de *L. monocytogenes* ATCC 19115 en rodajas de queso tratadas en películas comerciales de polietileno de baja densidad adicionales con los antimicrobianos de *Lactococcus lactis* CRA26.

Por lo tanto, para aumentar el efecto inhibitorio de las películas ensayadas en este trabajo, sería conveniente agregar una concentración de bacteriocinas en polvo mayor al 3 %p/v en la solución de agar. Morgan y col (2001) requirieron la adición de 10% p/p de lacticin 3147 en polvo para reducir los recuentos de *Bacillus cereus* y *L. monocytogenes* en una matriz alimentaria. También, sería factible disminuir la concentración del patógeno en la suspensión donde se contaminan los quesos, teniendo en cuenta que la dosis infectiva de *L. monocytogenes* en alimentos es de ca.100 ufc/g (Mapelli y col., 2018), mientras que en este trabajo los quesos fueron contaminados con una suspensión de ca. 10^5 ufc/mL.

4. Conclusiones

Se obtuvieron bacteriocinas en polvo con actividad a partir de los SLC de la cepa *E. avium* DSMZ17511 crecida en un medio económico alternativo y, utilizando suero de queso deshidratado como matriz termoprotectora alternativa y más rentable. Estas

bacteriocinas secas mantuvieron su actividad al ser agregadas en una concentración del 2 o 3 %p/v en películas a base de agar. A su vez, estas películas activas mostraron efecto inhibitorio al ser aplicados como recubrimientos en quesos contaminados con *L. monocytogenes* 99/287, pero es necesario modificar algunos parámetros (concentración de bacteriocinas, dosis infectiva del patógeno) para obtener mejores resultados.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Salta (PI-B-2417; PI-A-2495) y a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Salta. MC Soria, MC Audisio y C Iburguren pertenecen a CIC-CONICET. RM Lenz agradece a la SPU por su Beca EVC-CIN 2017.

6. Referencias

- Audisio MC, Terzolo HR, Apella MC. (2005). Bacteriocin from honeybee beebread *Enterococcus avium*, active against *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 3373-3375.
- Balciunas EM, FA Castillo Martinez, SD Todorov, BD Gombossy de Melo Franco, A Converti & R Pinheiro de Souza Oliveira. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32: 134-142.
- Bhatti M, Veeramachani A, & Shelef LA (2004). Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 215-219.
- Ben Amara C, Kim L, Oulahal N, Degraeve P, & Gharsallaoui A. (2017). Using complexation for the microencapsulation of nisin in biopolymer matrices by spray-drying. *Food Chemistry* 236, 32-40.
- Cao-Hoang L, Chaine A, Grégoire L, & Waché Y (2010). Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food Microbiology*, 27, 940-944.
- Mapelli C, A Barbiroli, S De Benedetti, A. Musatti, M Rollini (2018) Antilisterial Bacteriocins for Food Security: The Case of Sakacin A. En *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*. Editores: P. Ferranti, E. Berry, A. Jock. Editorial Elsevier. Pp. 385-392.
- Daba H, S Pandian, JF Gosselin, RE Simard, J Huang, C Lacroix. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl Environ Microb*, 1991, 57: 3450-3455
- Dalzini Elena, Elisa Galuppini, Daniela Merigo, Paolo-Felice Buizza, Marina-Nadia Losio, Barbara Bertasi, Giorgio Varisco (2016) Anti-listeria activity of bioactive food packaging on artificially contaminated sliced cheese. *Journal of Food Processing and Preservation* 40: 249–256.
- Doherty SB, Auty MA, Stanton C, Ross R P, Fitzgerald GF & Brodtkorb A (2012) Application of whey protein micro-bead coatings for enhanced strength and probiotic protection during fruit juice storage and gastric incubation, *Journal of microencapsulation* 29, 713-728.
- Eijssink VGH, M Skeie, PH Middelhoven, M Bente Brurberg & IF Nes (1998), Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 64, pp. 3275-3281.
- Gálvez A, H Abriouel, RL López & NB Omar (2007), Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 120, pp. 51-70.
- Gardiner GE, O'Sullivan E, Kelly J, Auty MA, Fitzgerald GF, Collins JK, Ross RP, & Stanton, C. (2000) Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying, *Applied and environmental microbiology* 66, 2605-2612.
- Gonçalves de Oliveira E, N Paz, V Méndez, A Cravero, S de la Vega, R Vargas, M Salinas, M Millán, E Ferrer, J Collado, G Ocaña, S Quipildor, A Ramón. Proceso de elaboración y composición química de quesos artesanales de leche de cabra. Libro Resúmenes XIII Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 2011, 2: 1-4.
- Gutiérrez MV (2015), Evaluación del uso en quesos de películas activas biodegradables con efecto anti-*Listeria monocytogenes*. (Tesina de Licenciatura). Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán.

Guitián MV, Ibarguren C, Audisio, MC. (2015) Evaluación en queso de pasta dura del efecto anti-*Listeria monocytogenes* de recubrimientos funcionalizados con enterocinas. *XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, Argentina.*

Guitián MV, Soria MC, Lenz RM, Audisio MC, Ibarguren C (2018). Diseño de un medio de cultivo con sustratos de grado alimentario para la producción de bacteriocinas con actividad anti-*Listeria monocytogenes*. IAFP VI Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria III Simposio Argentino de Inocuidad Alimentaria. 25-27 de Septiembre de 2018. CABA, Bs As, Argentina (Resumen aceptado).

Ibarguren C. (2010) Bacteriocinas de bacterias lácticas como potenciales bioprotectores de alimentos. (Tesis Doctoral). Salta, Argentina: Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ingeniería.

Jack RW, JR Tagg & B Ray (1995) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews* 59: 171-200.

Melo J, Andrew PW, & Faleiro ML (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International*, 67: 75-90.

O'Bryan, C. A., Koo. O.K., Sostrin, M.L., Ricke, S.C., Crandall, P.G., & Johnson, M.G. (2018). Characteristics of Bacteriocins and Use as Food Antimicrobials in the United States Food and Feed Safety Systems and Analysis. In S. C. Ricke, G. G. Atungulu, Ch. E. Rainwater & S. H. Park (Eds.), *Food and Feed Safety Systems and Analysis* (pp. 273-286). *Massachussets: Academic Press.*