

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



**Lic. Carmen Mariana Rossi**

Tesis para la obtención del título

Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**“Caracterización de películas de harina de triticale con  
actividad antimicrobiana por la incorporación de  
*bacteriocina/s*”**

**2019**

# **TRABAJO DE INVESTIGACIÓN REALIZADO EN:**

Universidad Nacional de Córdoba

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (ICYTAC)

Directora: Dra. Alicia Aguirre

Co Director: Dr. Emiliano Salvucci

Comisión de Tesis:

Dra Ibareguren

Dra Riveros

Dr Dambolena

## **DEDICATORIA**

*Este trabajo se lo dedico a mis padres Olga y Roque, por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue. A mi hermana Marisa por su incondicionalidad y estar siempre a mi lado, a mis hermanos Marcelo, Mauricio y Martín por apoyarme en todos mis emprendimientos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Mi principal agradecimiento es a mi Directora de tesis la Dra. Alicia Aguirre y a mi Co Director Emiliano Salvucci por brindarme su valiosa colaboración y orientación en el desarrollo de este trabajo.*

*También al Dr. Rafael Borneo por su contribución.*

*A todos los profesores que dictaron clases en esta Maestría, quienes aportaron para mi formación académica y profesional. Y a las autoridades del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (ICYTAC), quienes permitieron realizar mi trabajo de tesis en sus laboratorios.*



## TABLA DE CONTENIDO

Trabajo de investigación realizado en:.....	i
Dedicatoria .....	ii
Agradecimientos .....	iii
Tabla de Contenido .....	v
Resumen.....	vii
Listado de Figuras .....	ix
Listado de Tablas .....	xi
1. Introducción.....	1
1.1. Conservantes.....	3
1.1.1. Conservantes sintéticos .....	4
1.1.2. Conservantes Naturales: Bacteriocinas.....	6
1.2. Películas Biodegradables .....	16
1.2.1. Hidrocoloides.....	18
1.2.2. Plastificantes .....	28
1.2.3. Películas Activas.....	29
1.3. Generalidades y Usos de Triticale .....	32
1.3.1. Harina de Triticale .....	33
1.4. Enterococcus faecium ES216 productora de bacteriocinas .....	35
Objetivos.....	36
Objetivo General .....	36
Objetivos Específicos .....	36
2. Materiales y métodos.....	37
2.1. Materiales .....	37
2.2. Métodos .....	37
2.2.1. Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento .....	37
2.2.2. Purificación de la Bacteriocina.....	38
2.2.3. Concentración inhibitoria mínima (CIM) .....	39
2.2.4. Preparación de películas.....	40

2.2.5. Propiedades generales de las películas (espesor y Densidad).....	41
2.2.6. Contenido de humedad (%H) .....	42
2.2.7. Solubilidad en agua (S) .....	42
2.2.8. Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA) .....	43
2.2.9. Propiedad mecánica: Resistencia a la punción (rp) .....	44
2.2.10. Evaluación del Color.....	46
2.2.11. Mediciones espectrométricas y opacidad (O) .....	49
2.2.12. Actividad antimicrobiana de las películas activas .....	49
2.2.13. Ensayos en alimentos .....	49
2.3. Análisis estadístico.....	51
3. Resultados y discusión.....	53
3.1. Generalidades de las películas (Espesor y Densidad) .....	53
3.2. Contenido de Humedad .....	54
3.3. Solubilidad (%S) .....	56
3.4. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) .....	58
3.5. Propiedades mecánicas. Resistencia a la punción (RP) .....	59
3.6. Color .....	62
3.7. Opacidad y propiedades espectométricas.....	63
3.8. Actividad antimicrobiana de las películas .....	65
3.9. Ensayos sobre alimentos .....	68
4. Conclusión.....	71
5. Bibliografía .....	73
6. Anexos .....	88

## RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue el estudio y desarrollo de películas activas a partir del uso de harina de triticale con la incorporación de bacteriocina/s producida/s por *Enterococcus faecium* ES216, cepa aislada de avena. La película activa permite ser utilizada como recubrimiento de alimentos para mejorar sus procesos de conservación, asegurar su calidad y salubridad, prolongando su vida útil.

Para preparar las películas activas se utilizó harina de triticale obtenida de la variedad Buck TK 205 y la/s bacteriocina/s producida por *Enterococcus faecium* ES216 con actividad antimicrobiana contra *Listeria*, utilizando SLC (sobrenadante libre de células), E1 y E2 (fracciones de bacteriocinas purificadas con contenido de proteínas y otros compuestos disminuidos, en distintas concentraciones). La actividad antimicrobiana se analizó utilizando *L. innocua* ATCC33090 como cepa sensible. Se prepararon películas activas con la/s bacteriocina/s y de control (sin bacteriocina/s) con la técnica de evaporación de solvente. Las películas de triticale se caracterizaron por su densidad, contenido de humedad, permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua, color, opacidad, propiedades mecánicas y actividad antimicrobiana durante 45 días, y ensayos sobre alimento (queso blanco Holanda) por 15 días. La incorporación de la fracción activa no afectó significativamente la densidad, el contenido de humedad, la permeabilidad al vapor de agua y la resistencia a la perforación de las películas, incluso durante su almacenamiento. La solubilidad aumentó, cuando se añadieron bacteriocina/s a las películas de harina de triticale en comparación a la película control. Pero durante el almacenamiento, se observó una disminución significativa de la solubilidad en agua en las películas de harina de triticale con el agregado de BLIS, no así en las películas control.

El agregado de SLC y fracciones concentradas/purificadas E1/E2 a las películas produjo cambios significativos en la opacidad y diferencia de color ( $\Delta E$ ). Durante el tiempo de almacenamiento (45 días) se observó una disminución significativa en la opacidad de las películas SLC y E2, y un aumento en las películas E1, mientras que no hubo cambios significativos en las películas de control observadas.

Se analizó la actividad antimicrobiana de las diferentes películas (control y activadas) frente a *L. innocua*, a través del método de difusión en agar. *L. innocua* ATCC33090 fue claramente inhibida por las películas preparadas con SLC y E. La adición de SLC a las películas de triticale ejerció un efecto inhibidor más bajo, mientras que el agregado

E1 y E2 permite una mejor acción sobre *L. innocua*. Durante los 45 días de almacenamiento las películas de harina de triticale inmovilizaron los compuestos activos en la matriz polimérica y los liberaron gradualmente manteniendo una actividad antimicrobiana sin un cambio significativo en el efecto inhibidor. En el ensayo con alimento se utilizó bolsas termoselladas de películas de harina de triticale, tanto control como activas, con queso blanco Holanda inoculadas con *L. innocua*. Estas bolsas fueron almacenadas a 4°C por 15 días. Las películas activas redujeron a  $1 \log 10^3$  de *Listeria* comparando con el control después de 15 días de almacenamiento. Las películas de harina de triticale activadas con bacteriocina/s podrían proporcionar una estrategia alternativa para el envasado y la conservación de alimentos.

**Palabras clave:** películas de harina de triticale, bacteriocina/s, envases activos, conservación de alimentos.

## LISTADO DE FIGURAS

Listado por orden de aparición y número:

1. Mecanismo de acción de bacteriocinas de clase I, II y III. PMF, fuerza protón-motriz.
2. Sobrenadante de cultivo de bacterias lácticas.
3. Secuencia para la detección de actividad inhibitoria de SLC y E. Las fotos muestran las diluciones, siembra en placas de agar semisólidas, incubación y la selección de la mejor actividad inhibitoria.
4. Micrómetro Schwyz SC1.
5. Celdas con sílica gel para la medición de la permeabilidad de las películas.
6. Texturómetro Instron.
7. Colorímetro Konica Minolta.
8. Sistema de color CIELAB.
9. Queso contaminado con *L. innocua* envasado con película de triticale.
10. Cabina de Flujo Laminar Casiba HL2A. Preparación de la muestra para recuento en placa.
11. Siembra de las muestras homogenizadas de queso sobre placas de agar selectivo Oxford para *L. innocua*.
12. Película de harina de triticale. Se puede observar su transparencia.
13. Contenido de humedad de las películas de triticale Control y activas con SLC, E1 y E2.
14. Solubilidad de las películas de triticale Control y activas con CFS, E1 y E2.
15. Permeabilidad al Vapor Agua de las películas de triticale Control, con CFS, E1 y E2 durante el almacenamiento.

16. Valores de resistencia a la punción de las películas control y activadas en función de tiempo de almacenamiento.
17. Delta de E en películas control y activas con SLC, E1 y E2 durante su almacenamiento.
18. Opacidad de las películas de triticale Control y las activas con SLC, E1 y E2 durante el almacenamiento.
19. Actividad antimicrobiana de las películas de harina de triticale: Control (C), SLC (sobrenadante libre de células), E1 y E2 (extractos).
20. Cinética de crecimiento de *L. innocua* en muestras de queso durante el almacenamiento a 4 °C. empaquetados con películas control, SLC y E2.

## LISTADO DE TABLAS

1. Clases y propiedades de bacteriocinas de bacterias de ácido láctico.
2. Materiales formadores de películas.
3. Composición nutricional de harina integral de triticale (1 variedad).
4. Características del queso blanco Holanda.
5. Densidad de las películas control y activadas
6. Contenido de humedad de películas de harina de triticale control y activas con SLC, E1 y E2 a tiempo cero, con su correspondiente desviación estándar.
7. Porcentaje de solubilidad de las películas de harina de triticale control y con el agregado de bacteriocina SLC, E1 y E2 a tiempo cero.
8. Permeabilidad al vapor de agua de las películas de harina de triticale control y activas con SLC, E1 y E2 a tiempo 0.
9. Resistencia a la punción de películas de harina de triticale control y activas con SLC, E1 y E2 a tiempo 0.
10. Coeficientes de determinación para las películas de harina de triticale control y activas con SLC, E1 y E2.
11. Resultados de  $\Delta E$  de las películas de harina de triticale control y activas con SLC, E1 y E2.
12. Valores de Opacidad de las películas de harina de triticale control y activas a tiempo cero.
13. Actividad antimicrobiana de películas de triticale con SLC y E.
14. Actividad antimicrobiana de las películas de harina de triticale sin bacteriocina (control) y que contiene sobrenadante libre de células (SLC) y extracto de bacteriocina semipurificado (E1 y E2), expresada como zona de inhibición (mm).

# **Caracterización de películas de harina de triticale con actividad antimicrobiana por la incorporación de *bacteriocina/s***

## **1. INTRODUCCIÓN**

La inocuidad, la integridad, la alta calidad y la seguridad en los alimentos son requisitos importantes para los consumidores. En lo que respecta al aspecto microbiológico, se conoce que son muchas las bacterias, virus y parásitos que pueden causar reacciones indeseables como el deterioro de las propiedades sensoriales tales como el sabor, el olor, el color o la textura de los alimentos, e incluso, algunos de ellos, pueden causar enfermedades y ser transmitidas por los alimentos.

Se consideran Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) a todas aquellas causadas por la ingestión de alimentos contaminados que provocan un efecto nocivo en la salud del consumidor, o de un grupo de consumidores, en forma aguda o crónica. Pueden ser causadas por patógenos, sustancias químicas o parásitos que contaminan los alimentos en distintos puntos de la cadena de producción. Afectan, principalmente a poblaciones en situación de pobreza, niños, mujeres embarazadas y ancianos, generando de este modo pérdidas humanas como también, económicas produciendo grandes costos a los servicios de salud (Alerte et al., 2012).

Los alimentos no sólo son la fuente elemental de nutrientes, sino que también pueden contener sustancias químicas naturales con propiedades tóxicas, por ejemplo, glicósidos cianogénicos (muchas plantas), solanina (partes verdes de papa, papas germinadas), contaminantes industriales (metal pesado), aminas biógenas (peces), o micotoxinas

(alimentos mohosos). Las enfermedades transmitidas por los alimentos, los productos químicos en los alimentos y la sostenibilidad son los principales problemas de seguridad alimentaria de los consumidores (Sloan, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que las enfermedades diarreicas transmitidas por los alimentos y por el agua provocan en su conjunto la muerte de 2,2 millones de personas al año, de las cuales 1,9 millones son niños (Organización Mundial de la Salud, 2017, «Inocuidad de los alimentos», s. f.). Las bacterias generalmente implicadas en las ETA corresponden a las especies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter* y *Shigella*, entre otras (Ruiz, Colello, Padola, & Etcheverría, 2017).

Entre los factores que contribuyen a los posibles riesgos en los alimentos se incluyen: las prácticas agrícolas inadecuadas, la falta de higiene en todas las fases de la cadena alimentaria, la ausencia de controles preventivos en las operaciones de elaboración y preparación de los alimentos, la utilización inadecuada de productos químicos, la contaminación de las materias primas, los ingredientes y el agua, el almacenamiento insuficiente o inadecuado, etc., por lo que se necesita un control microbiológico estricto para impedir que estos lleguen al consumidor (Garzón & Allister, 2009). El incremento de la ingesta de alimentos frescos, con deficiente cocción, o que son consumidos sin recalentamiento, así como de alimentos listos para consumir o de alimentos étnicos, pueden incrementar también los riesgos de las ETA (Beutin & Martin, 2012).

En general, los alimentos son perecederos, por lo que necesitan ciertas condiciones de tratamiento, conservación y manipulación. La contaminación microbiológica constituye un problema sanitario y económico de relevancia mundial. Se calcula que más del 20% del total de los alimentos producidos en el mundo se pierde por acción de

los microorganismos (Sauceda, 2011). Como es el caso de la *L. monocytogenes* que es uno de los patógenos más agresivos causantes de infecciones alimentarias. *L. monocytogenes* es una bacteria anaerobia facultativa, capaz de proliferar en un amplio rango de temperaturas (1 °C a 45 °C) y una elevada concentración de sal. Puede causar una grave enfermedad invasiva (listeriosis) en humanos y en animales. La listeriosis humana invasiva puede afectar principalmente a individuos jóvenes, ancianos o inmunocomprometidos. Se manifiesta como septicemia, meningitis u otras infecciones del sistema nervioso central. En mujeres embarazadas, puede provocar aborto espontáneo, parto sin vida o muerte fetal (Ferreira, Wiedmann, Teixeira, & Stasiewicz, 2014).

En el envasado y los conservantes se ha encontrado una solución para producir alimentos más seguros para el consumidor, previniendo la acción de agentes biológicos.

Desde las novedades y tendencias recientes en las técnicas de envasado de alimentos, lo que se busca es que los productos alimentarios posean mayor vida útil, que sean económicamente convenientes (Dobrucka & Cierpiszewski, 2014) y que el envase del alimento, opere no sólo como contenedor del mismo si no como protección. Cuando se habla de protección se hace referencia al aspecto físico, químico y microbiológico, avanzando hacia la producción de envases activos de naturaleza biodegradable. El empaquetamiento activo nació con el objetivo de satisfacer la demanda de los consumidores de materiales de embalaje naturales, reciclables y biodegradables (López-Rubio et al., 2004)

## **1.1.    CONSERVANTES**

El empleo de conservantes químicos en los alimentos es una práctica muy antigua. La conservación se define, generalmente, como el método empleado para preservar un estado existente o para prevenir posibles daños debidos a la acción de agentes químicos (oxidación), físicos (temperatura y luz) o biológicos (microorganismos) (M. M. Silva & Lidon, 2016). Por lo tanto, la función principal de la conservación es retrasar el deterioro de los alimentos y prevenir alteraciones en sus propiedades sensoriales como así también en su aspecto y composición biológica.

### **1.1.1. CONSERVANTES SINTÉTICOS**

En la industria alimenticia, se utilizan aditivos sintéticos para mejorar las características y propiedades de los alimentos procesados, e incluyen conservantes (antimicrobianos, antioxidantes, etc), aditivos nutricionales y colorantes, aromatizantes, texturizantes y agentes diversos (Carocho, Barreiro, Morales, & Ferreira, 2014). Los alimentos conservados con ellos no son imperecederos, tan sólo se mantienen inalterados por un período de tiempo limitado, pues el crecimiento de los microorganismos se ve retardado, pero no inhibido de forma total. El grado de inhibición final va a depender del tipo de sustancia y de su concentración. Muchos estudios han confirmado que el consumo excesivo de aditivos alimentarios sintéticos está relacionado con las reacciones adversas gastrointestinales, respiratorias, dermatológicas y neurológicas (Carocho et al., 2014).

Unos de los motivos para la desaprobación de aditivos se fundamenta en el hecho de que pueden ser empleados para disimular un deterioro o alteración del producto. Es decir, podría facilitarse el empleo de materia prima de mala o incluso de pésima calidad. Al adicionar conservantes los microorganismos se inhiben, por lo tanto, esto mejora la

aparición del producto, asemejándose a los productos de mejor calidad. Por este motivo, el uso de conservantes debe ser cuidadosamente examinado para generar productos inocuos, fisiológicos y toxicológicamente aceptables (Mahapatra & Parija, 2018).

Básicamente, los aditivos poseen poder bactericida y bacteriostático. Y se pueden clasificar de acuerdo a su toxicidad (Ibáñez, 2003):

- Compuestos químicos inocuos (en dosis permitidas):

Etanol, ácido láctico, acético, tartárico, cítrico, glicerina, especias (canela, orégano, tomillo, mostaza y otros), etc.

- Compuestos cuya inocuidad no es admitida universalmente:

Nitrocompuestos como los nitritos, nitratos, nitrosamina (en salames, jamones, embutidos en general, harina de pescado como alimento balanceado). Anhídrido sulfuroso (en bebidas sin alcohol, jarabes), ácido benzoico y sus sales (en margarina, jugo de frutas, mermeladas), ácido sórbico (en jarabes, bebidas sin alcohol, confituras con frutas y otras.), etc.

- Compuestos de toxicidad reconocida (uso prohibido):

Amonios cuaternarios, ácido bórico, ácido monocloroacético, derivados mercurícos y argénticos, etc.

- Compuestos de toxicidad dudosa:

- Antibióticos (tetraciclinas, nistatina, etc.) en pescados, aves de corral, carnes, quesos, etc. Antioxidantes naturales: inocuos (tocoferoles, ácido cítrico, etc.)

- Sintéticos: BHA (butil-3-hidroxi-4 anisol), BHT (hidroxi-butil-tolueno), etc.

Según el tipo de sustancia, el tiempo de exposición y la cantidad utilizada de los conservantes artificiales se presentan diversos inconvenientes como la posibilidad de ser carcinogénicos (nitrocompuestos, furanos) (Kim, Her, & Lee, 2015), teratogénicos: malformaciones en fetos (nitrocompuestos), mutagénicos (nitrosamidas), producir disturbios metabólicos (anhídrido sulfuroso, ácido benzoico y otros.), etc.

Dentro de los métodos de conservación en alimentos, existen alternativas que no conllevan la incorporación de aditivos artificiales (Cebrián, Mañas, & Condón, 2016). Por ejemplo: la ultrapasteurización, el envasado al vacío, el uso de bioconservación y antimicrobianos naturales, etc.

La mayoría de los consumidores consideran que es muy importante que los productos que ponen en su mesa sean naturales, libres de aditivos y conservantes sintéticos; y que sean saludables y ecológicos. Estas expectativas de los consumidores representan para la industria alimentaria, el enorme desafío de ofrecer alimentos con menor cantidad de conservantes químicos.

### **1.1.2. CONSERVANTES NATURALES: BACTERIOCINAS**

Dada la creciente búsqueda de sustitutos de conservantes tradicionales por parte de la industria alimentaria, es que se vuelve necesario generar alternativas que cubran las mismas propiedades antimicrobianas y de compatibilidad con el alimento (Nereyda, 2011).

La biopreservación es importante a la hora de pensar en el uso de microorganismos no patógenos y/o sus metabolitos para mejorar la seguridad microbiológica y extender la vida útil de los alimentos (Martinis, Públio, Santarosa, & Freitas, 2001).

Actualmente, se tiene especial interés en las bacterias lácticas (BAL), debido a la producción de antimicrobianos (Deraz, Karlsson, Hedström, Andersson, & Mattiasson, 2005).

Los BAL se encuentran en la descomposición de material vegetal y frutas, en productos lácteos, carne y pescado fermentados, cereales, remolachas, verduras en escabeche, patatas, masa madre, bebidas fermentadas, jugos, aguas residuales y en cavidades de humanos o animales (Ramírez, Ulloa, & Velázquez, 2011). En los humanos, habitan particularmente en la cavidad oral, el íleon, el colon y son los organismos dominantes en la vagina.

Las BAL se han utilizado en la producción de alimentos y bebidas fermentadas durante siglos. Contribuyen al sabor, la seguridad microbiana, la mejora de la vida útil, textura y perfil sensorial de los productos finales. Son consideradas seguras para la salud y han recibido el carácter de seguras o GRAS (Generally Recognized As Safe). Estas bacterias y los metabolitos que producen como ácido acético, compuestos aromáticos, las bacteriocinas, los exopolisacáridos y varias enzimas son tecnológicamente interesantes en la industria de alimentos (Özogul & Hamed, 2018).

Las BAL se clasifican en función de aspectos como: la morfología celular, el modo de fermentación de la glucosa, el rango de temperatura de crecimiento y los patrones de utilización del azúcar (Quinto et al., 2014). Los géneros de BAL incluyen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, siendo *Lactobacillus* el género más grande, con más de 100 especies.

Las bacteriocinas producidas por BAL son sustancias de estructura proteica (péptidos) que poseen actividad antimicrobiana.

Aunque las bacteriocinas podrían considerarse como antibióticos por su actividad antimicrobiana, difieren principalmente en su mecanismo de síntesis y estructura.

La principal diferencia es que las bacteriocinas se sintetizan ribosómicamente (Svetoslav D. Todorov, 2019) y se producen durante la fase primaria de crecimiento, mientras que los antibióticos suelen ser metabolitos secundarios. Además, las bacteriocinas en general presentan actividad inhibitoria sobre cepas de especies relacionadas con las especies productora (Zacharof & Lovitt, 2012). Mientras que los antibióticos, por otro lado, tienen un espectro de actividad más amplio e incluso si su actividad es restringida (Zacharof & Lovitt, 2012).

Las bacteriocinas son péptidos, generalmente catiónicos, anfipáticos, que contienen un exceso de residuos de lisina y arginina. Son habitualmente de bajo peso molecular (raramente más de 10 kDa), modificados postraduccionalmente y pueden degradarse fácilmente por enzimas proteolíticas (Cotter, Hill, & Ross, 2005), especialmente por las proteasas del tracto gastrointestinal de los mamíferos, lo que las hace seguras para el consumo humano. Las bacteriocinas de BAL tienen una mayor actividad antibacteriana a valores de pH inferiores (por debajo de 5).

Reúnen una serie de características que favorecen su empleo como bioconservantes:

- ✓ Son degradadas por enzimas proteolíticas del tracto digestivo incluyendo las de origen pancreático (tripsina y quimiotripsina) y gástrico (pepsina) (Beristain-Bauza, 2012).

✓ Resisten condiciones extremas de pH (son activas a pH ácido y neutro), temperatura y salinidad, y a tratamientos tecnológicos de conservación de los alimentos, como la pasteurización, la liofilización o la acidificación (Heredia-Castro, Hernández-Mendoza, González-Córdova, & Vallejo-Cordoba, 2017).

✓ En general no originan disbiosis ni alergias.

✓ Son, en general, inactivas frente a las células eucariotas y son producidas por una amplia variedad de bacterias (Sobrino-López & Martín-Belloso, 2008).

✓ Muchas de ellas poseen un amplio espectro y elevada actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos como *Listeria*, *Clostridium* y otras Gram positivas, y actúan sinérgicamente con otros sistemas de conservación de los alimentos (Naghmouchi et al., 2006).

✓ Presentan modo de acción bactericida (Souza, Silva, & Sousa, 2005).

✓ Generalmente sus determinantes génicos se encuentran en plásmidos por lo que se facilita su manipulación (Gálvez, Abriouel, López, & Omar, 2007).

Las bacteriocinas se clasifican en función de sus estructuras primarias, pesos moleculares, modificaciones postraduccionales y características genéticas. Sin embargo, no existe un esquema de clasificación universalmente adoptado. Originalmente, se reconocieron cuatro clases, pero recientemente los autores las han revisado en tres (Olvera-García, 2015), aunque hay pequeñas diferencias en la descripción de las subclases entre los diferentes autores. Su clasificación es revisada constantemente.

La clasificación de las bacteriocinas producidas por las BAL depende de sus estructuras, propiedades fisicoquímicas y moleculares (Alvarez-Sieiro, Montalbán-López, Mu, & Kuipers, 2016):

- Clase 1- Lantibióticos: Son una clase de sustancias pépticas que se caracterizan por contener aminoácidos policíclicos tioéter como los lantionina o metilantionina, también los aminoácidos insaturados dehidroalanina y ácido 2-aminoisobutírico. Son producidos por numerosas bacterias Gram positivas y poseen un espectro de acción amplio. Son termoestables, pequeños (<5 kDa) que se modifican ampliamente después de la traducción. Los lantibióticos se pueden subdividir en tres grupos principales de tipo A y B de acuerdo a la similitud de sus estructuras (Kaškonienė et al., 2017):

- Los Lantibióticos de tipo A se componen de moléculas flexibles alargadas, en forma de tornillo, con carga positiva, anfipáticas y tienen hasta 34 residuos de aminoácidos. Estos actúan principalmente formando poros, a través de la despolarización de la membrana citoplasmática de organismos sensibles como muestra la Figura 1. El prototipo de este grupo es la nisina y la lactina 3147, producido por cepas de *Lactococcus lactis*. La nisina es la única bacteriocina autorizada en la industria alimentaria, empleándose como agente antibotulínico en el queso y huevos líquidos, salsas y alimentos enlatados. Exhibe una acción antimicrobiana de amplio espectro contra *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y otros patógenos. Estudios toxicológicos mostraron que la ingesta de nisina no causa efecto tóxico en los seres humanos, tiene una dosis letal estimada de 6,950 mg/Kg.

- Lantibióticos del tipo B: son de estructuras globulares, hidrofóbicas, que interfieren con las reacciones enzimáticas celulares. Su masa molecular, se encuentra entre 2 a 3 kDa tienen carga neta o la misma es negativa. La mersacidina y duramicina son representativas de este grupo.

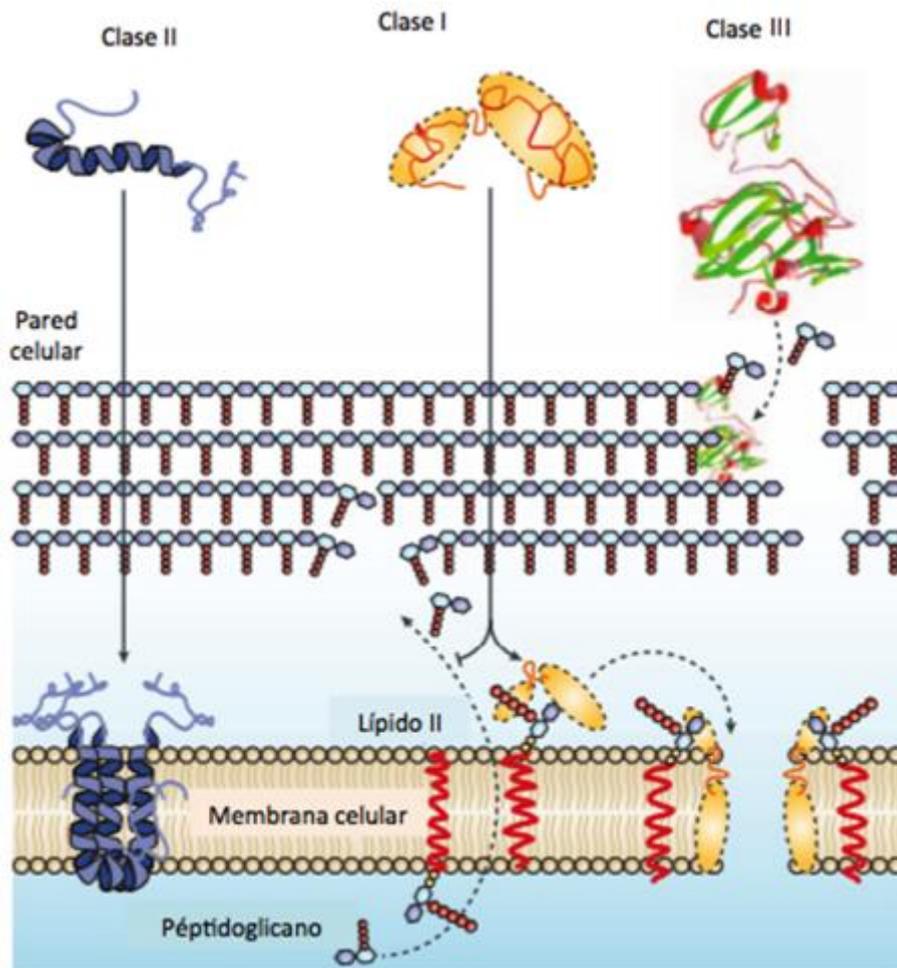


Figura. 1. Mecanismo de acción de bacteriocinas de clase I, II y III. PMF, fuerza protón-motriz (Cotter et al., 2005).

- Bacteriocinas Clase II: son péptidos pequeños, catiónicos, hidrofóbicos pequeños (<10 kDa), termoestables, y no presentan modificaciones postraduccionales a excepción de la eliminación del péptido líder. Son péptidos activos sobre la membrana citoplasmática (Figura 1). Se distinguen dos subclases (Kaškonienė et al., 2017):

- Subclase IIa: contienen péptidos activos frente a la *L. monocytogenes* de tipo pediocina, termoestables, menores a 10 kDa, con carga neta positiva. Ejemplos de este tipo de bacteriocinas son: pediocina PA-1, producida por *Pediococcus acidilactici* y *Leucocina A*. Es utilizada como conservante en productos vegetales y cárnicos (Settanni & Corsetti, 2008). Casi 50 tipos diferentes de bacteriocinas de clase IIa han sido identificadas de cepas aisladas de carnes fermentadas, vegetales fermentados, productos lácteos, salmón ahumado y el tracto gastrointestinal humano. Su mecanismo de acción es la permeabilización de la membrana plasmática de los organismos blancos a través de la formación de poros produciendo un desbalance iónico con pérdida de material citoplasmático.

- Subclase IIb: requieren la actividad sinérgica de dos péptidos complementarios para ejercer actividad antimicrobiana. Aunque algunos péptidos de esta clase pueden ejercer individualmente actividad antimicrobiana, la adición del péptido complementario aumenta en gran medida esta actividad. El par de péptidos complementarios está activo en el rango nanomolar a picomolar. Las bacteriocinas clase IIb individuales contienen regiones anfifílicas e hidrofóbicas y son en su mayoría catiónicos. Los genes que codifican los dos péptidos diferentes están genética y estrechamente asociados y codificados en el mismo operón. Ejemplos de este grupo lo constituyen plantaricinas E/F y J/K (Atrih, Rekhif, Moir, Lebrihi, & Lefebvre, 2001) y lactocina 705 (Castellano, 2003).

- Bacteriocinas Clase III: son péptidos de mayor peso molecular (>10kDa) y lábiles al calor a excepción de la propionicina SM1 (Miescher, Stierli, Teuber, & Meile, 2000). Este grupo no ha sido ampliamente investigado. Las

bacteriocinas que representan este grupo son *helveticina J*, sintetizada por *Lactobacillus helveticus* y enterolisina producidas por *Enterococcus faecium* (Tabla 1). Swe, Heng, Cook, Tagg, & Jack, (2010) han subdividido a esta clase en dos grupos: (1) las enzimas bacteriolíticas, que lisan la pared celular de células sensibles y (2) las proteínas antimicrobianas no líticas.

- Tipo IIIa: Bacteriolisinas. La lisostafina producida por *Staphylococcus simulans biovar staphylolyticus*, es prototipo de este grupo y la más estudiada, es una glicilglicina endopeptidasa (Zacharof & Lovitt, 2012).

- Tipo IIIb: Bacteriocinas no líticas: Bacteriocinas grandes Ejemplo de ellos disgalacticina (21 kDa) y estreptococcina A-M57 (SA-M57; 17 kDa) son producidas por *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* y por *S. pyogenes* M-tipo 57, respectivamente (Heng & Tagg, 2006).

Tabla 1. Clases y propiedades de bacteriocinas de BAL.

Clases	Especie típica productora	Propiedades	Ejemplos
I	<i>Lactobacillus lactis subsp. Lactis</i>	Contiene aminoácidos únicos, lantionina y metilantionina; <5 kDa	nisina, lactocina, mersacidina (Parada, Caron, Medeiros, & Soccol, 2007)
IIa	<i>Leuconostoc gelidum</i>	Péptidos hidrófobos, catiónicos, no modificados, estables al calor; contiene un péptido líder de doble glicina; péptidos similares a pedicina; <10 kDa	pediocina PA1, sakacina A, leucocina A (Svetoslav D. Todorov, 2009)
IIb	<i>Enterococcus faecium</i>	Requiere sinergia de dos péptidos complementarios; en su mayoría péptidos catiónicos	lactococcina G, plantaricina A, enterocina X (Perez, Zendo, &

			Sonomoto, 2014)
III	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Termolábil; péptidos de gran masa molecular; > 30 kDa	lisostafina, enterolisina A, helveticina J (Parada et al., 2007)

La Tabla 1 muestra la actual clasificación de 3 clases de bacteriocinas, ya que la clase IV, sugerida por Maqueda et al., (2004) fue reclasificada dentro de la subdivisión “a” de la Clase III, que involucra a todas las bacteriocinas cíclicas. Estas consisten en grandes complejos de proteínas con otras macromoléculas, bacteriolisinas, polipéptidos hidrolíticos (Güllüce, Karadayı, & Barış, 2013).

Como se mencionó antes, las bacteriocinas han sido ampliamente investigadas en la industria alimenticia en productos tales como lácteos, huevos, vegetales y carnes (Zacharof & Lovitt, 2012), por lo que ha demostrado ser una buena barrera natural, segura y eficiente como bioconservantes en dichos alimentos.

Las bacteriocinas pueden utilizarse en los alimentos de diferentes maneras:

- ✓ En forma purificada, en bruto o mediante el uso de un producto previamente fermentado con una cepa productora de la bacteriocina como ingrediente en el procesamiento de alimentos o incorporado a través de una cepa productora de bacteriocina (cultivo iniciador) (C. C. Silva, Silva, & Ribeiro, 2018).

- ✓ A través de la inoculación de BAL bacteriocinogénica en el alimento, se puede producir la bacteriocina in situ (Patrovskỳ et al., 2016).

✓ Adicionando la bacteriocina purificada o parcialmente purificada como conservante alimentario (Yang, Lin, Sung, & Fang, 2014).

✓ En combinación con otras tecnologías se encuentra un modo efectivo de eliminación de las bacterias patógenas (Zacharof & Lovitt, 2012). Por ejemplo, el uso de tratamientos no térmicos como el campo eléctrico pulsado (PEF) es ventajoso ya que no tiene ningún efecto sobre la funcionalidad de los alimentos y las cualidades nutricionales. Esta técnica cuando se utiliza sola tiene un costo económico alto, pero el uso de PEF en niveles inferiores en combinación con otros tratamientos, como las bacteriocinas, es viable financieramente y a la vez, puede ser altamente efectiva.

✓ Con otros compuestos antimicrobianos, como el acetato de sodio (Gokoglu, 2019) y el lactato de sodio, lo que daría como resultado una inactivación mejorada de las bacterias.

✓ En la prevención de formación de gases en los quesos, como así también en el aumento de la tasa de proteólisis.

✓ Es de interés su uso como probióticos, estas cepas pueden utilizarse para el control de patógenos a nivel gastrointestinal, genitourinario, cavidad oral y para prevenir infecciones en animales (Khan & Naz, 2013).

✓ Otra aplicación es el empaque bioactivo, un proceso que puede proteger a los alimentos de contaminantes externos (Gokoglu, 2019).

Ésta última aplicación permite combinar la utilización de películas biodegradables como soporte de las bacteriocinas (González, Hernández, Cuellar, Martínez, & Hernández, 2017).

## 1.2. PELÍCULAS BIODEGRADABLES

Las películas biodegradables se definen como una capa fina de material que puede descomponerse en elementos químicos naturales por la acción de agentes biológicos y puede ser formada sobre un alimento como una cobertura (películas comestibles) o preformada como un empaque sobre el alimento (Iwata, 2015).

Se han considerado varios componentes como materiales de embalaje biodegradables alternativos debido a su propiedad ecológica, biocompatible, disponibilidad abundante y naturaleza renovable (Rhim, Park, & Ha, 2013). Los mismos se definen como una variedad de macromoléculas producidas por sistemas biológicos, generalmente son materiales naturales, abundantes y renovables tales como (Figura 2):

- Proteínas
- Polisacáridos
- Lípidos
- Combinación de estos

A su vez existen cuatro grandes fuentes de origen de materiales poliméricos para la formación de películas biodegradables:

- Origen animal (colágeno/gelatina) (Mellinas et al., 2016),
- Origen marino (quitina/quitosano) (Masuelli, 2017),
- Origen agrícola (lípidos, grasas e hidrocoloides: proteínas y polisacáridos) (M. P. Arrieta et al., 2016),
- Origen microbiano (ácido poliláctico (PLA) y polihidroxialcanoatos (PHA) (Villada, Acosta, & Velasco, 2007).

Estos materiales deben ser completamente biodegradables en un período de tiempo corto, así se contribuye con la protección del medio ambiente (Alba Manuela Durango,

Soares, & Arteaga, 2011). Además, estas películas actúan prolongando la vida útil, mejorando o manteniendo la calidad del alimento (Jabeen, Majid, & Nayik, 2015).

Debido a que son considerados aditivos alimenticios y que es necesario que posean determinadas propiedades de barrera para la preservación de los productos, los recubrimientos y películas comestibles deben presentar las siguientes características:

- ✓ Poseer propiedades nutricionales y organolépticas que sean compatibles con el alimento a recubrir.
- ✓ Presentar propiedades mecánicas adecuadas para evitar pérdidas por roturas o quiebre del material.
- ✓ Ser estables frente a las distintas condiciones de almacenamiento.
- ✓ Capacidad para adherirse fácilmente a la superficie de los alimentos a tratar.
- ✓ Responder a la reglamentación vigente (aditivos alimentarios).
- ✓ Requerir de tecnologías sencillas y de bajo costo para su fabricación y posterior aplicación.

Las tecnologías de películas biodegradables contemplan la producción mediante la combinación de diversos polisacáridos, proteínas y lípidos, con la tarea de aprovechar las propiedades de cada compuesto y la sinergia entre los mismos, ya que las propiedades mecánicas y de barrera dependen de los compuestos que integran la matriz polimérica y de su compatibilidad (Ceron, 2010).

La eficiencia funcional de las películas biodegradables dependerá de la naturaleza de sus componentes, y su estructura. La selección de la sustancia formadora de la película estará en función del objetivo, de la naturaleza del producto donde se aplicará y del método de aplicación (Ribotta & Tadini, 2009).

A continuación, se describen los componentes utilizados en la preparación de las películas y/o recubrimientos comestibles.

### **1.2.1. HIDROCOLOIDES**

Se denominan hidrocoloides a aquellas sustancias solubles o dispersables en agua, este término se aplica generalmente a sustancias compuestas por polisacáridos, aunque también algunas proteínas reciben esta clasificación.

Son polímeros hidrofílicos (contienen grupos oxhidrilos) de origen vegetal, animal o microbiano. Durante los últimos años se expandió el desarrollo de películas biodegradables utilizando hidrocoloides como materia prima, porque presentan excelentes propiedades mecánicas, así como de barrera frente al O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y lípidos (Rodríguez-Marín, Bello-Perez, Yee-Madeira, & González-Soto, 2013). La desventaja de los hidrocoloides en general, es que por ser hidrofílicos permiten el transporte de humedad.

- **POLISACÁRIDOS**

Se han utilizado muchos polisacáridos por su capacidad de formar películas de diversas propiedades y comportamientos. Entre ellos:

- **ALMIDONES**

El almidón, de diversos orígenes (maíz, arroz, papa, yuca, tapioca), es una de las macromoléculas más utilizadas (Castillo et al., 2015). Está compuesto por amilosa (glucano lineal) y amilopectina (polímero ramificado), y la proporción entre ambos

polímeros depende de su fuente de obtención. Forma un gel espeso translúcido después de la gelatinización, condición necesaria para formar la película, y la concentración requerida es baja (alrededor del 3%).

Las películas formadas de almidón son descritas como isotrópicas, inodoras, insípidas, incoloras, no tóxicas y biodegradables, en general son películas frágiles, pero se puede corregir con el agregado de un agente plastificante tal como el glicerol, el sorbitol, ácidos grasos, lípidos y derivados, etc., lo que mejora su flexibilidad y extensibilidad. Tal es así que, los almidones son estudiados para producir películas biodegradables que permitan reemplazar, parcial o completamente, a los polímeros plásticos debido a su bajo costo y a su capacidad de renovación (Bourtoom, 2008), ya que sus fuentes son abundantes, y poseen buenas propiedades mecánicas como flexibilidad, resistencia y transparencia (Vieira, da Silva, dos Santos, & Beppu, 2011).

- ALGINATOS

Se obtienen de diferentes especies de algas, principalmente de *Macrocystis pyrifera*. Presentan la propiedad de formar geles cuando se le adicionan iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Rubio-Anaya, 2012).

Sus aplicaciones son variadas ya que poseen buenas propiedades de barrera frente al  $\text{O}_2$  y lípidos, una de las más destacadas es en productos cárnicos frescos o congelados para evitar su deshidratación superficial. Además, se lo utiliza en recubrimientos de partículas de café liofilizadas (Reyes-Avalos et al., 2017).

- CARRAGENANOS

Se extraen de algas rojas como las especies *Chondrus* y *Gigarina*. Al igual que los alginatos requieren de la adición de sales de calcio para la formación de geles. Son

ampliamente utilizados en la industria alimentaria y ambos, la carragenina y el alginato, poseen buenas características para formar películas y pueden mejorar las propiedades mecánicas de las películas de proteína, en presencia de glicerol como plastificante, reduciendo su rigidez y mejorando su elongación, aunque favorecen la permeabilidad al vapor de agua. Como resultado se obtienen películas transparentes, incoloras y de sabor ligeramente salado. Estas se aplican principalmente para retardar la pérdida de humedad de algunos frutos (Fernández Valdés et al., 2015).

- PECTINAS

La pectina es un polisacárido extraído de las cáscaras de cítricos y de manzana, también es un material con capacidad de formar películas, menos rígidas que las del almidón y de menor resistencia a la tensión (López-Díaz, 2015). Debido a que son altamente permeables al agua, su uso se limita a mejorar el aspecto de algunos productos como frutas secas.

- QUITINA y QUITOSANO

La quitina es el polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Las principales fuentes de este biopolímero son el exoesqueleto de muchos crustáceos, las alas de algunos insectos, paredes celulares de hongos, algas, y otros (Martínez-Camacho et al., 2010). Se trata principalmente de poli (beta-(1-4)-2-acetamida-D-glucosa), que es estructuralmente idéntica a la celulosa excepto que el hidroxilo secundario en el segundo átomo de carbono de la unidad de repetición de hexosa se sustituye por un grupo acetamida (Bourtoom, 2008).

En cuanto a su producción industrial, se basa mayormente en el tratamiento de caparzones de crustáceos como camarones, langostas y cangrejos los cuales son obtenidos fácilmente como desechos de las plantas procesadoras de estas especies.

Además, la quitina constituye la fuente industrial de quitosano ya que, mediante un proceso de desacetilación química o enzimática (eliminación del 50% aproximadamente de sus grupos acetilos) ésta se convierte en quitosano, pudiendo obtenerse a gran escala (Bourtoom, 2008).

En los últimos años el quitosano se convirtió en el aditivo de alimentos de origen biológico preferido, debido a sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas, a su abundancia en la naturaleza y a su capacidad para formar películas (Mármol et al., 2013). Éstas se distinguen de las obtenidas a partir de otros polisacáridos por ser transparentes, de buenas propiedades mecánicas y de barrera frente al O<sub>2</sub> (Aider, 2010).

Las películas comestibles a base de quitosano son aplicadas en muchos productos, ya que pueden modificar el ambiente interno, lo que retrasa la maduración y disminuye la tasa de transpiración en frutas y verduras como frutillas, pimientos, pepinos, manzanas, peras, duraznos y ciruelas con el objetivo de preservar su calidad y actuar como agente antimicrobiano (Bourtoom, 2008; Aider, 2010; Gallo, 2016).

#### ○ CELULOSA Y DERIVADOS

Celulosa es el biopolímero más abundante en la tierra. Consiste en la repetición de unidades de D-glucosa unidas a través de enlaces glicosídicos  $\beta$  1-4. En su estado nativo, los grupos hidroximetilo de la glucosa se encuentran alternativamente por debajo y por encima del plano de la cadena principal del polímero. Esto se traduce en el embalaje muy apretado de cadenas de polímero, microfibrillas empaquetadas muy densamente y una estructura altamente cristalina, combinada con algunas zonas amorfas (Bastidas Flores, 2016), que resiste la solvatación en medios acuosos. La solubilidad en agua se puede aumentar mediante el tratamiento de la celulosa con álcalis, seguida de la reacción con ácido cloroacético, cloruro de metilo u óxido de propileno para producir

carboximetilcelulosa (CMC), metilcelulosa (MC), hidroxipropilmetilcelulosa, (HPMC) o hidroxipropilcelulosa (HPC) (Bourtoom, 2008).

Los derivados de celulosa son buenos formadores de películas flexibles, resistentes y transparentes y a pesar de ser materiales hidrofílicos, el tipo de sustituyente tiene efecto en la permeabilidad al vapor de agua; así, la metilcelulosa presenta la menor permeabilidad en relación con otros derivados. La hidroxipropil celulosa es utilizada para retardar la absorción de humedad y el desarrollo de rancidez oxidativa. Estos derivados de celulosa generalmente se utilizan combinados con otros polisacáridos o con lípidos o bien con proteínas (Ribotta & Tadini, 2009).

La CMC es un polímero que forma película al solidificar, produce materiales transparentes, lo que es una cualidad importante. La CMC se ha usado como parte de coberturas comestibles para retrasar con éxito el proceso de maduración y senescencia en productos frescos (Valle-Guadarrama, López-Rivera, Reyes-Vigil, Castillo-Merino, & Santos-Moreno, 2008). La celulosa de éter aniónico y la CMC, se solubilizan en agua siendo compatibles con otro tipo de biomoléculas, mejorando las propiedades mecánicas y de barrera en las películas elaboradas. La CMC es una película capaz de reducir la absorción de aceite durante el freído y proporcionar pocos cambios en las propiedades sensoriales de los alimentos (Jahuel Hernández, 2014). Películas elaboradas con base en CMC combinada con emulsión de ceras han mostrado ser buenas como barrera al vapor de agua (Lopez et al., 2016).

- **PROTEÍNAS**

Diversos tipos de proteínas han sido estudiados para la formación de películas y recubrimientos comestibles. Entre ellos se encuentran las proteínas de soja (Echeverría, 2012), cuyas películas son flexibles, suaves y claras; películas de zeína (obtenida del

maíz) (X. Guo et al., 2012); proteínas lácteas (Granada-Restrepo, Medina-Pineda, Culebras-Rubio, & Gómez-Clari, 2014); proteínas de gluten de trigo (Kore, Tawade, & Kabir, 2016); de colágeno (Prodpran, Nagarajan, & Benjakul, 2016) y proteínas de triticale, ampliamente estudiadas para obtener películas biodegradables (Aguirre, Borneo, & León, 2013)

En general, las películas de origen proteico son una barrera pobre frente a la humedad (Fernández Valdés et al., 2015) pero son muy atractivas debido a sus propiedades de barrera contra aceites o grasas y compuestos volátiles, y su ventaja de permeabilidad a gases (Fernández Valdés et al., 2015). La incorporación y liberación de sustancias activas en estas películas es posible, pero esto depende tanto del tipo de proteína, así como de la estructura molecular del compuesto activo (Sivarooban, Hettiarachchy, & Johnson, 2008).

#### ○ PROTEÍNAS DE TRITICALE

Las proteínas de origen agrícola son una fuente prometedora y sustentable de material biodegradable. Entre éstas se puede mencionar a las proteínas obtenidas a partir de la harina de triticale, las cuales presentan una adecuada capacidad de formación de película, con propiedades comparables a otras películas comestibles elaboradas a partir de diferentes materiales (Aguirre, Borneo, & León, 2013). Las películas son flexibles, homogéneas y de pálido color amarillento. Los valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas de proteínas de triticale son de 2 a 3 veces órdenes de magnitud mayores que los polímeros sintéticos típicos de empaque, pero están en el mismo rango que los valores de permeabilidad de películas comestibles elaboradas en base a otras proteínas.

Las películas de proteínas de triticale han demostrado ser un buen soporte para el agregado de sustancias, tal como el aceite esencial de orégano, presentando buena actividad antimicrobiana (Aguirre et al., 2013). Las películas mostraron ser menos densa, lo que facilita el movimiento de las cadenas poliméricas de proteínas, mejorando la flexibilidad y produciendo películas menos rígidas, este comportamiento es típico de pequeñas moléculas que causan plastificación en un biopolímero (Aguirre et al., 2013).

#### ○ PROTEÍNAS DE SUERO LÁCTEO

El suero lácteo es un subproducto que se obtiene de la elaboración del queso. Sus principales proteínas, la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\alpha$ -lactoalbúmina al ser desnaturalizadas por el calor producen películas transparentes, insípidas y flexibles. Éstas son excelentes barreras al O<sub>2</sub>, aunque resultan ser muy frágiles. Como solución a este inconveniente se detectó que sus propiedades mecánicas mejoran considerablemente mediante la adición de un agente plastificante, como el glicerol (Ó. L. Ramos et al., 2013).

Dentro de sus aplicaciones se puede nombrar su uso como cobertura en productos sensibles al oxígeno, como nueces y maníes, para evitar su oxidación y prolongar su vida útil (Galus & Kadzińska, 2015); formación de recubrimientos comestibles antimoho para quesos; envases destinados a la leche en polvo; otros productos deshidratados, en coberturas empleadas en derivados cárnicos y en frutas frescas cortadas como manzana (Mohseni, Ghavidel, & Asl, 2014).

#### ○ CASEÍNA

Los caseinatos son buenos formadores de películas emulsionadas por su naturaleza anfifílica, su estructura desordenada y su capacidad para formar puentes de hidrógeno. Las películas de caseinato presentan características favorables para uso en alimentos

como transparencia, flexibilidad y con buenas propiedades de barrera a los gases (Mariana Pereda, Marcovich, & Mosiewicki, 2015).

- COLÁGENO

Las películas de colágeno también son usadas tradicionalmente en la preparación de envolturas comestibles. El colágeno es el mayor constituyente de la piel, tendones y tejidos conectivos, y se encuentra extensamente distribuido en las proteínas fibrosas de los animales. La gelatina resulta de una hidrólisis parcial del colágeno, produce una película flexible y gruesa y las propiedades mecánicas mejoran cuando se utiliza cloruro de sodio (NaCl) en concentraciones bajas (Morales, Laura, Canchola, & Guivini, 2017).

Las películas comestibles obtenidas a partir de esta proteína se aplican desde hace tiempo en productos y derivados cárnicos, principalmente como recubrimiento de salchichas y otros embutidos. Los beneficios que presentan este tipo de recubrimiento son evitar la pérdida de humedad y dar un aspecto uniforme al producto mejorando sus propiedades estructurales (Guzmán, Acevedo, Romero, & Estrada, 2015).

- ZEÍNA

Es una prolamina y la principal proteína de reserva del maíz. Se caracteriza por ser un material relativamente hidrofóbico y termoplástico por lo cual forman películas fuertes, con brillo, resistentes al ataque microbiano, insolubles en agua; con propiedades antioxidantes y capacidad de adhesión (Peña Serna, 2015).

- LÍPIDOS

Los lípidos se caracterizan por ser hidrofóbicos y no poliméricos, contrariamente a los hidrocoloides, presentando excelentes propiedades de barrera frente a la humedad. Dentro del grupo de lípidos aplicados a recubrimientos y películas comestibles se

pueden mencionar las ceras, resinas, ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos, siendo la cera de parafina y la cera de abeja la más eficiente (Rubio-Anaya, 2012).

La función principal de un recubrimiento de lípidos es bloquear el transporte de humedad debido a su baja polaridad. La característica negativa de estas sustancias es su escasa capacidad para formar films, es decir que no poseen suficiente integridad estructural ni durabilidad, forman películas gruesas y frágiles (Bourtoom, 2008). No obstante, se los utiliza principalmente como protección de frutas, aplicándose una capa lipídica externa como suplemento a la cera natural que poseen los frutos, la cual es generalmente removida durante el lavado. Así mismo se emplean como barrera entre los distintos compuestos de un alimento heterogéneo, como soporte de aditivos liposolubles y para dar brillo a los productos de confitería (Oregel-Zamudio, Aguilar, Oyoque-Salcedo, Angoa-Pérez, & Mena-Violante, 2016).

- COMPUESTAS

Como su nombre lo indica las películas compuestas son formuladas mediante la combinación de hidrocoloides y lípidos permitiendo aprovechar las ventajas funcionales (Tabla 2) que presenta cada uno, reduciendo las características desfavorables (Serralé, 2015). Según la ubicación en el espacio de los lípidos respecto a los hidrocoloides, los recubrimientos y películas compuestas pueden ser de dos tipos:

1. *Laminadas*: se configuran mediante la superposición de una capa lipídica sobre una de hidrocoloides, formando una bicapa. De esta manera se logra una distribución homogénea de los lípidos, controlando de manera satisfactoria la transferencia de agua (Tharanathan, 2003; Šuput, Lazić, Popović, Hromiš, & Bulut, 2017). La principal desventaja

es que requieren de varias operaciones para formar las diferentes capas con las diferentes soluciones.

2. *Emulsiones*: se trata de mezclas heterogéneas de lípidos dentro de una matriz de hidrocoloides, obtenidas por emulsión o microemulsión. Este tipo de películas son menos eficientes respecto a la transferencia de humedad ya que no se logra una distribución homogénea de los lípidos (M. Guo, Jin, Yadav, & Yang, 2015).

A continuación, se presenta a modo de resumen, algunas de las sustancias ya descritas y sus principales ventajas y desventajas en la utilización como películas biodegradables.

Tabla 2. Materiales formadores de películas.

Componentes	Polisacáridos	Proteínas	Lípidos	Compuestas
Características	Polímeros hidrofílicos	Polímeros hidrofóbicos e hidrofílicos dependiendo la conformación que adopte	Hidrofóbicos y no poliméricos	Combinación de hidrocoloides y lípidos
Ventajas	Propiedades mecánicas así como de barrera frente al O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> y lípidos	Propiedades de barrera contra aceites o grasas y compuestos volátiles, y su ventaja de permeabilidad a gases. incorporación y liberación de sustancias activas	Excelentes propiedades de barrera frente a la humedad.	Combinación de hidrocoloides y lípidos, aprovechar las ventajas funcionales. Laminadas: Controla de manera satisfactoria la transferencia de agua.
Desventajas	Permiten el transporte de humedad	Son una barrera pobre frente a la humedad	Escasa capacidad para formar films, no poseen suficiente integridad estructural ni durabilidad,	Laminadas: Requiere varias operaciones para formar las distintas capas. Emulsión: Menos

			forman películas gruesas y frágiles	eficientes respecto a la transferencia de humedad
Ejemplos	Almidones, alginatos, carragenatos, pectinas, quitina, quitosano, celulosa y derivados	Proteínas de Triticale, caseína, del suero lácteo, colageno, zeinas, soja	Ceras, resinas, ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos	<u>Laminadas:</u> Superposición de una capa lipídica sobre una de hidrocoloides, formando una bicapa. <u>Emulsión:</u> Mezclas heterogéneas de lípidos dentro de una matriz de hidrocoloides

## 1.2.2. PLASTIFICANTES

Los componentes utilizados para la preparación de películas son agentes biopoliméricos capaces de formar una matriz estructural con cierta resistencia mecánica. No obstante, en algunos casos, especialmente cuando se usan las proteínas, se requiere del empleo de aditivos como plastificantes para mejorar la resistencia y la elasticidad (Aguirre et al., 2013); en otros, se requiere de agentes tensoactivos, para incrementar la distribución de glóbulos hidrófobos dentro de una película compuesta de tipo emulsionada (Ribotta & Tadini, 2009).

Estos plastificantes son generalmente pequeñas moléculas de bajo peso molecular y alto punto de ebullición (Aguirre et al., 2013). Tal es el caso del glicerol, xilitol y sorbitol. Estos polioles se citan a menudo como buenos plastificantes para materiales basados en proteínas debido a su capacidad para reducir la unión intermolecular de hidrógeno mientras aumentan el espaciamiento intermolecular.

Los polioles son los plastificantes más utilizados en la formación de películas, y al igual que otros agentes de plastificación tienen efecto en las propiedades mecánicas, en la desorción de agua, en la permeabilidad al vapor de agua y en la temperatura de transición vítrea, al debilitar la fuerza de las interacciones macromoleculares. La permeabilidad al vapor de agua y a los gases a través de una película, es mayor a temperatura más altas a la de transición vítrea (Sanyang, Sapuan, Jawaid, Ishak, & Sahari, 2016).

Los plastificantes, en general, permiten aumentar la flexibilidad, la extensibilidad y ductilidad del biopolímero mediante la disminución de su resistencia mecánica. Los plastificantes pueden interferir con la cadena de proteínas (cadena de hidrógeno) reduciendo las fuerzas intermoleculares y aumentando la movilidad de las cadenas proteicas y se utilizan generalmente para mejorar las propiedades mecánicas de las películas. Los plastificantes desarrollan puentes hidrógeno proteína-plastificante (Zubeldía, Ansorena, & Marcovich, 2015) que reemplaza las interacciones proteína-proteína en las películas. De acuerdo a la composición, tamaño y forma del plastificante influyen en su capacidad para interrumpir el enlace de hidrógeno de cadena proteica, incluyendo su capacidad para atraer agua al sistema de proteínas plastificado. También puede provocar una disminución en la formación de los puentes de hidrógeno entre el plastificante y los grupos hidroxilo del almidón mejorando las propiedades elásticas de la película (Sanyang et al., 2016).

### **1.2.3. PELÍCULAS ACTIVAS**

Un desafío actual para la industria alimentaria es lograr un alimento envasado que mantenga sus propiedades durante la cadena de distribución y venta, evitando o

minimizando el agregado de aditivos al alimento que luego será consumido. Los envases activos pueden ser una alternativa. Los mismos se han desarrollado para reducir, inhibir o detener el crecimiento de microorganismos sobre la superficie de los alimentos (Hosseini, Rezaei, Zandi, & Farahmandghavi, 2016), además de cumplir con las funciones básicas del envase como es la protección, presentación, etc.

El empaquetamiento activo nació con el objetivo de satisfacer la demanda de los consumidores de materiales de embalaje naturales, reciclables y biodegradables (Lopez-Rubio et al., 2004). Como se señaló anteriormente, la industria del envase está en constante búsqueda de nuevos materiales, tecnologías e innovaciones que permitan satisfacer las necesidades de los consumidores y de la industria alimentaria, además de crear nuevos mercados.

Estas matrices poliméricas tienen, también, el potencial de liberar agentes activos (antioxidantes y antimicrobianos), retener compuestos (etileno, oxígeno y agua) o componentes alimentarios indeseables (Majid, Nayik, Dar, & Nanda, 2016). De esta forma, materiales que no eran considerados por este sector de la industria, surgen como opciones o soluciones para problemas específicos, reemplazando en parte a los materiales “genéricos” (LDPE, PVC, etc.) gracias a propiedades únicas o sistemas con gran valor agregado.

Tradicionalmente, los agentes antimicrobianos son adicionados directamente a los alimentos, pero su actividad puede ser inhibida por diferentes sustancias que forman parte del alimento, de manera que se puede disminuir su eficiencia. En tales casos, la implementación de películas o recubrimientos antimicrobianos puede ser más eficiente que los aditivos que se utilizan en el producto alimenticio, ya que estos pueden migrar selectiva y gradualmente los compuestos desde el empaque a la superficie del alimento

(A. M. Durango et al., 2006). Diversos agentes antimicrobianos han sido utilizados en empaques activos, tales como: ácido sórbico, ácido benzóico, benzoato de sodio, ácido cítrico (Eswaranandam, Hettiarachchy, & Johnson, 2004) y sorbato de potasio (Zactiti & Kieckbusch, 2006). De igual manera, han sido utilizadas bacteriocinas como nisina (Santos et al., 2018), pediocina (Laursen, Bahl, Licht, Gram, & Knudsen, 2015). También se utiliza natamicina (Romero, Borneo, Passalacqua, & Aguirre, 2016), un antifúngico producido por *Streptomyces natalensis*. Bacteriocinas como lactocina 705 (cuya actividad depende de la complementación de dos péptidos, lac705a y lac705b) producida por *Lactobacillus curvatus* CRL705, con fuerte actividad anti-*Listeria*, también han sido aplicadas en películas multicapa (Massani, Vignolo, Eisenberg, & Morando, 2013). Como es el caso de las películas a base de gelatina y de quitosano, películas de dos capas con actividad antimicrobiana potencialmente probados sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* (Pereda, Ponce, Marcovich, Ruseckaite, & Martucci, 2011).

También se puede mencionar trabajos sobre contaminación microbiana que se produce en pescado, en el que se han utilizado un sistema de envasado a base de ácido poliláctico con bacteriocinas de *Weissella hellenica* BCC 7293. La bacteriocina fue liberándose en forma continua desde el envase hasta la superficie del alimento, permitiendo así mantener una actividad antimicrobiana efectivas (Woraprayote et al., 2018).

Se ha informado que el sistema de envasado protege a las bacteriocinas de la inactivación mediante la interacción con componentes alimenticios tales como lípidos y enzimas (Chams, 2013.). Además, la aplicación de bacteriocinas en los materiales en contacto con los alimentos requiere menores cantidades en comparación con la adición directa en el volumen total de la carne, reduciendo así el uso del conservante y evitando

la adición directa de bacteriocinas. Esta técnica puede satisfacer la demanda de los consumidores que buscan los alimentos que están libres de aditivos (Woraprayote et al., 2016).

En resumen, todos estos desarrollos tienen como fin la aplicación de materiales ecológicos, el uso de empaques de manera sustentables y la implementación de tecnología flexible y estandarizada en seguridad alimentaria.

### **1.3. GENERALIDADES Y USOS DE TRITICALE**

El triticale (*Triticosecale* Wittmack) es una planta autógama, herbácea, anual; se desarrolló cruzando el centeno (progenitor masculino) y el trigo (progenitor femenino) (McGovern et al., 2011). Ambos comparten los caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos típicos de la familia de las Poáceas, subfamilia Pooideas. Se buscaba, al unir ambas plantas, combinar los atributos positivos de calidad tanto del centeno (tolerancia a las duras condiciones de cultivo) como del trigo (aplicaciones de alimentos versátiles). Así el triticale posee el rendimiento potencial del trigo y la capacidad de adaptación del centeno a un ambiente seco (Aguirre et al., 2013). Entre las características que posee la planta de triticale: es más alta que el trigo y posee hojas más gruesas y grandes, y sus espigas son de gran longitud. Las plantas muestran un color verde azulado que se intensifica previa a la espigazón (Mellado, Matus, & Madariaga, 2008).

El grano de triticale posee una composición química que revela un menor contenido de proteínas, pero con un mayor porcentaje de materia grasa y una cantidad de hidratos de carbono intermedia respecto a los restantes cereales. Por su valor nutricional, el

triticale puede convertirse en un grano de suma importancia para la alimentación humana y/o animal; sus factores nutricionales más importantes son: el contenido de lisina que en algunos genotipos de triticale poseen una mayor presencia y es un aminoácido limitante de los cereales (McGoverin et al., 2011); la concentración de almidón, como los polisacáridos no amiláceos (por ejemplo: arabinosilanos); los polifenoles (por ejemplo: ácidos fenólicos); los alquilresorcinoles; las vitaminas (por ejemplo: Vitamina B1) (Rakha, Aman, & Andersson, 2013) y, por último, la calidad de sus proteínas, en comparación a otras proteínas estudiadas de otros cereales (Aguirre et al., 2013).

En la mayoría de los países del mundo el triticale se emplea como grano harinero. La producción mundial de triticale ha seguido creciendo durante las últimas dos décadas, llegando a ~17 millones de toneladas en el 2014 (Zhu, 2017). Los principales productores son Polonia, Alemania, Bielorrusia, Francia, Rusia y China (Zhu, 2017). En Argentina, este cereal se ha utilizado siempre con fines forrajeros, para pastoreo directo y fabricación de raciones. El triticale tiene características de producción estable, buena sanidad, tolerancia a bajas temperaturas y al estrés hídrico, y resistencia a plagas. También se ha utilizado como biocombustibles (McGoverin et al., 2011).

### **1.3.1. HARINA DE TRITICALE**

La harina de triticale, corresponde esencialmente al endospermo; representa entre el 70 y 75% del peso inicial del grano y comprende aproximadamente el 70% de las proteínas totales y el 80% del almidón. Es un poco más oscura que la harina del trigo y más clara que las del centeno. El rendimiento en molino del triticale es inferior al del trigo. Esto se debe fundamentalmente a la forma alargada y arrugada del grano, que

implica una mayor relación entre la superficie exterior y el volumen, sumado a las características excesivamente blandas del endosperma. Además la harina presenta un alto nivel de  $\alpha$ -amilasa (Dennett, Wilkes, & Trethowan, 2013), que se valora mediante la determinación de *Falling Number* de Hagberg-Perten.

Tabla 3. Composición nutricional de harina de triticale

Nutrientes	Por 100 gr
Energía	338 Kcal
Proteína	13,18 g
Total de lípidos (grasas)	1,81 g
Hidratos de carbono	73,14 g
Fibras	14,6 g
Agua	10,01 g

Los granos de triticale poseen bajo *Falling Number* comparado al de los granos de trigo y centeno (Rakha, Aman, & Andersson, 2011). Esto trae como consecuencia problemas en la calidad industrial durante la panificación. En el caso de usar harina pura de triticale se obtiene una masa débil debido al bajo contenido y poca fuerza del gluten, y alto nivel de actividad de la enzima alfa amilasa (Mellado et al., 2008). Pero en los últimos años, el rango de composición química del triticale se ha mejorado a través de la evaluación de recursos genéticos (Manley et al., 2013). Esto permitió, recientemente, reformular varios productos alimenticios a base de triticale, como el pan y la pasta en los laboratorios (Navarro-Contreras et al., 2014).

Además, cabe destacar su implementación en el desarrollo de películas comestibles y envases biodegradables para aplicaciones alimentarias, gracias a la calidad de su harina (Borneo, Alba, & Aguirre, 2016).

## **1.4. ENTEROCOCCUS FAECIUM ES216 PRODUCTORA DE BACTERIOCINAS**

La cepa de *Enterococcus faecium* ES216 fue aislada de avena y pertenece a la colección de cultivos de ICYTAC. Tiene la capacidad de producir una sustancia antimicrobiana tipo bacteriocina/s con actividad frente a cepas de *Listeria*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Salvucci, LeBlanc, & Pérez, 2016). Fue evaluado su carácter termorresistente y su inactivación con enzimas proteolíticas como tripsina y proteinasa K.

En base a lo expuesto se propone la siguiente hipótesis del trabajo:

- Las bacteriocinas utilizadas poseen una serie de características que favorecen su empleo como bioconservante.
- El uso de bacteriocinas es factible para producir películas activas a partir de películas de harina de triticale.
- Las películas activas de harina de triticale poseen propiedades funcionales comparables a otras películas elaboradas con harina de especies diferentes.
- Las películas activas pueden funcionar como barrera física y aumentar la vida útil de los alimentos por su capacidad antimicrobiana.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar y desarrollar películas activas a partir de harina de triticale por la incorporación de sustancia tipo bacteriocina (producida por cepas de bacterias lácticas aislada de cereales) como agente antimicrobiano, que puedan ser usadas como recubrimiento de alimentos para mejorar sus procesos de conservación, asegurar su calidad y salubridad, prolongando su vida útil.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desarrollar las formulaciones de las películas a base de harina de triticale y sustancia tipo bacteriocina, producida por cepas de bacterias lácticas aisladas de cereales, con el fin de seleccionar las más adecuadas para recubrimiento de alimentos.
- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas, de barrera y mecánicas de las películas obtenidas.
- Analizar la influencia del almacenamiento de estas películas activas estudiando el efecto del envejecimiento sobre sus propiedades.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de las películas activas de triticale.
- Aplicar estas películas a alimentos evaluando su efectividad como envase activo para extender su vida útil.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. MATERIALES**

Los ingredientes que se utilizaron para elaborar las películas activas objeto de estudio para el presente trabajo fueron:

- Harina de triticale obtenida de la variedad Buck TK 205 (Campeloni Semillas S.A., Córdoba, Argentina).
- *Enterococcus faecium* 216 (ES216) aislada de avena que ha demostrado tener efecto inhibitorio sobre *L. innocua* mediante la producción de una sustancia tipo bacteriocina (BLIS) (Salvucci et al., 2016).

### **2.2. MÉTODOS**

#### **2.2.1. CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO**

La cepa productora de bacteriocina *E. faecium* ES216 se cultivó en medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) a 37°C, medio óptimo para el crecimiento de bacterias lácticas debido a su contenido de peptona y glucosa que proporciona una importante fuente de nitrógeno, carbono y otros elementos necesarios para el crecimiento de la bacteria.

*L. innocua* ATCC 33090 se usó como cepa indicadora y como contaminante en ensayos de alimentos. Se cultivó en caldo Brain Heart Infusion (BHI) y *Listeria* Selective agar Oxford a 30 ° C, con un contenido de 0,7% de agar.

Las cepas bacterianas se conservaron con 20% de glicerol a -80 °C.

## **2.2.2. PURIFICACIÓN DE LA BACTERIOCINA**

La cepa productora *E. faecium* ES216 se cultivó en MRS a 37 °C hasta la fase estacionaria. El cultivo se centrifugó a 10.000 rpm, 10 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró mediante un filtro de poros de 0,2 µm obteniéndose el sobrenadante libre de células (SLC) que se utilizó para la producción de películas activas.

El SLC fue sometido a purificación mediante *salting out* con sulfato de amonio con un porcentaje de saturación de 70% durante 16 hs a 4°C. Se colectó con varilla de vidrio el precipitado y el resto se centrifugó a 10000 rpm, durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado total se re-suspendió en un volumen mínimo de agua destilada.

El extracto de bacteriocina semi purificado obtenido se pasó a través de un cartucho de extracción en fase sólida C-18 (Pingitore, Salvucci, Sesma, & Nader-Macias, 2007). Como fase móvil se utilizaron distintas concentraciones de isopropanol (10, 20, 40, 60 y 80%) y las eluciones obtenidas se concentraron por evaporación. La fracción que mantuvo actividad antimicrobiana (E) fue utilizada/reservada para la producción de películas activas.

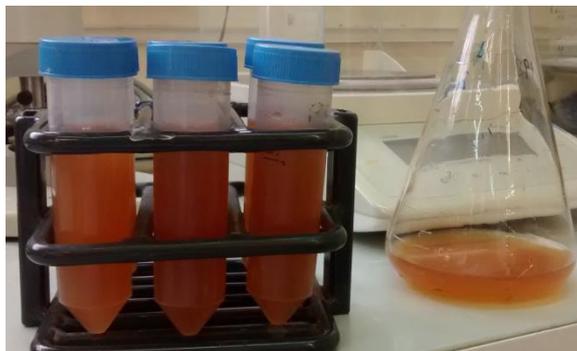


Figura 2. Sobrenadante de bacteriocinas libre de células

### 2.2.3. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

Para la determinación de actividad antimicrobiana se realizaron ensayos de (mota en el césped) *spot-on-lawn* en un agar de doble capa contra *L. innocua* ATCC33090 (sensible a bacteriocina) (Salvucci, Saavedra, Hebert, Haro, & Sesma, 2012).

Se sembró agar BHI semisólido (agar 0,7%) con un cultivo de fase estacionaria al 1% (v / v) de la cepa indicadora (agar superior) vertido sobre placas conteniendo agar BHI al 1,5% (agar inferior). Se realizaron diluciones seriadas (1:2) del SLC y el extracto de bacteriocina (E). 10  $\mu$ L de cada dilución se colocaron en la capa superior. Se determinó la actividad inhibidora después de la incubación a 37 ° C durante 16 h. La actividad antimicrobiana del sobrenadante se expresó como unidades arbitrarias por ml. (AU/ml). Este valor se obtuvo como el recíproco de la mayor dilución capaz de producir un halo de inhibición mayor o igual a 5 mm.

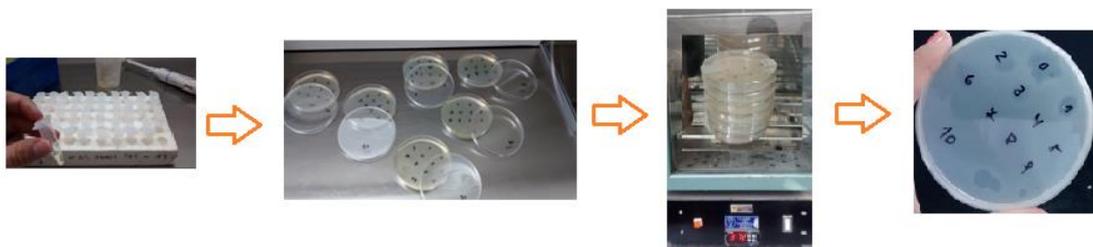


Figura 3. Secuencia para la detección de actividad inhibitoria de SLC y E. Las fotos muestran las diluciones, siembras en placas de agar semisólidas, incubación y la selección de la mejor actividad inhibitoria.

## 2.2.4. PREPARACIÓN DE PELÍCULAS

Para la preparación de las películas se utilizó harina de triticale en la variedad Buck TK 205, con un contenido de:

- humedad,  $13.25 \pm 0.02 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ,
- proteína,  $8.88 \pm 0.02 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ,
- cenizas,  $0.61 \pm 0.02 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ,
- y un tamaño de partícula obtenida por un tamiz estándar de EE. UU. n. ° 100.

La Solución Formadora de Película (SFP) fue obtenida por dispersión de la harina de triticale (4.0 g / 100 ml) en agua por 15 minutos (pH 10.7). Se adicionó glicerol (30 g / 100 g de harina), utilizado como plastificante, y la dispersión resultante fue entonces agitada magnéticamente durante 15 minutos a 75 °C. Se prepararon películas control (sin bacteriocina) y películas activas.

En el caso de las películas activas se añadieron el SLC y la fracción E, en distintas concentraciones a la Solución Formadora de Película (SFP) obteniendo las siguientes películas:

- SLC 1% v/v - (1 ml de SLC/100ml de SFP),
- E1 1% v/v - (1ml de E/100ml de SFP) y
- E2 2% v/v - (2ml de E/100ml de SFP).

Las películas se prepararon usando la Técnica de Evaporación de solvente. Volúmenes determinados, de la solución formadora de película, se vertieron sobre una bandeja plana horizontal de silicona (20 cm de diámetro). Luego, las películas se

secaron a 30°C en estufa con circulación de aire. Después se retiraron del molde de silicona y se almacenaron a temperatura ambiente y a 52% de HR para su acondicionamiento, para luego determinar sus diferentes propiedades en función del tiempo, hasta 45 días.

### **2.2.5. PROPIEDADES GENERALES DE LAS PELÍCULAS (ESPESOR Y DENSIDAD)**

El espesor de las películas se determinó con un micrómetro Schwyz modelo SC1, Suiza (Figura 4). En todos los cálculos se utilizó el valor medio de seis mediciones de grosor en diferentes lugares de cada muestra de película. Estos valores fueron utilizados para la evaluación de la opacidad, la permeabilidad al vapor de agua, el color y las propiedades mecánicas.



Figura 4. Micrómetro Schwyz SC1.

Densidad es la cantidad de masa por unidad de volumen. Podemos interpretar esta definición como el grado de compactación de un material. La densidad de las películas se calculó directamente a partir del peso y las dimensiones de la misma a partir de la siguiente ecuación:

$$D \text{ (g cm}^{-3}\text{)} = m/(A.\delta) \quad (1)$$

Donde A es el área de la película (cm<sup>2</sup>),  $\delta$  el espesor de la película (cm) y m la masa (g).

Finalmente, la densidad de la película se expresó como el promedio de tres determinaciones independientes.

### **2.2.6. CONTENIDO DE HUMEDAD (%H)**

El contenido de humedad es la relación que existe entre el peso de agua contenida en la película en estado natural y el peso de la película después de ser secada en estufa. Esta relación es expresada en porcentaje de acuerdo con Aguirre, Borneo, & León (2011). El método consiste en pesar las películas y luego llevarlas a estufa a 105°C por 24hs. Después de las 24hs en la estufa se dejan enfriar y se pesan nuevamente. El porcentaje de humedad se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%H = [(M-M_f)/M] \times 100 \quad (2)$$

Donde %H es porcentaje de humedad, M es el peso inicial de la muestra y M<sub>f</sub> es el peso final de la muestra seca.

Se realizaron mediciones por triplicado para cada tipo de película y se tomó una medida promedio como resultado.

### **2.2.7. SOLUBILIDAD EN AGUA (S)**

La Solubilidad es el porcentaje de materia seca en la película solubilizada después de 24 horas de inmersión en agua. El método consistió en cortar discos de películas,

previamente pesadas, que luego fueron inmersos en 50ml de agua destilada por 24hs a temperatura ambiente. Luego se secaron a 105°C durante 24hs en estufa con circulación de aire, para así determinar el peso de la materia seca que no fue solubilizada en agua. El peso de la materia seca solubilizada se calculó sustrayendo el peso de la materia seca no solubilizada del peso de la materia seca inicial y se reporta como porcentaje (Fakhouri, Tanada-Palmu, & Grosso, 2004). Los porcentajes de la pérdida de peso de cada muestra de las películas fueron calculados usando la siguiente ecuación (Hernández-Muñoz, Kanavouras, Ng, & Gavara, 2003):

$$\%S = [(p_i - p_{sf})/p_i] \times 100 \quad (3)$$

Donde  $p_i$ : es peso inicial en gramos y  $p_{sf}$ : peso seco final en gramos.

El peso inicial se corrige restando el porcentaje de humedad de las películas. Se realizaron mediciones por triplicado, tomando la media como resultado.

### **2.2.8. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (PVA)**

La Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA) se puede definir como la cantidad de vapor (gramos) que pasa por unidad de superficie de un material de espesor por unidad de tiempo. La PVA se midió gravimétricamente de acuerdo con el método descrito por Aguirre et al. (2011). Para ello, primero fueron acondicionadas las películas en una cámara de humedad controlada con solución saturada de nitrato de magnesio a 25°C y 52% Humedad Relativa (HR) por 48hs, hasta alcanzar el equilibrio de humedad. Luego se determinó el espesor de las mismas.

Posteriormente, cada muestra de película se selló sobre un vaso de permeación circular que contenía sílica gel, el cual es un desecante que absorbe la humedad (Fig.5) permitiendo mantener un ambiente dentro del gabinete a HR constante. La HR dentro de la celda fue siempre más baja que en el exterior, y el transporte de vapor de agua se determinó a partir de la ganancia de peso de la celda de permeación. Los vasos fueron medidos periódicamente y la tasa de transferencia de vapor de agua (TPVA,  $\text{g m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de las películas se determinó a partir de la pendiente del aumento de peso en función del tiempo usando la siguiente fórmula:

$$\text{TPVA} = (\Delta m A^{-1} \Delta t^{-1}) \quad (4)$$

Donde  $\Delta m$  es el aumento de peso de la celda de permeación,  $A$  es el área expuesta y  $\Delta t$  es el tiempo. La permeabilidad al vapor de agua (PVA,  $\text{g m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$ ) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{PVA} = (\text{TPVA} \cdot X) / \Delta P \quad (5)$$

Donde  $X$  es el espesor de la película y  $\Delta P$  es la diferencia de presión parcial de vapor (Pa) a través de la película.

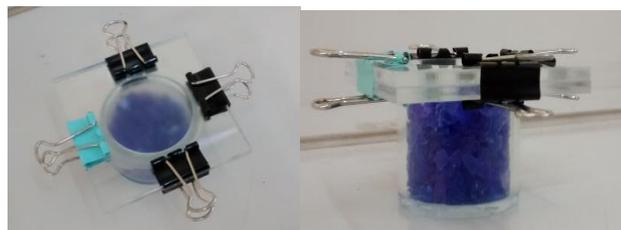


Figura 5. Celdas con sílica gel para la medición de la permeabilidad de las películas.

### **2.2.9. PROPIEDAD MECÁNICA: RESISTENCIA A LA PUNCIÓN (RP)**

La Resistencia a la Punción (RP) proporciona información sobre la fuerza necesaria para punzar una muestra y la resistencia de la película a ser perforada. El texturómetro

mide la fuerza que causa una punción irreversible en la muestra del material. Los ensayos de punción asumen que el tamaño de la muestra es mucho mayor que el del punzón y que no habría diferencias si la muestra fuese mayor aún. Esto es llamado “Geometría semi-infinita”, el ensayo de punción asume que la muestra es de tamaño semi-finito y que los efectos de los bordes son insignificantes. Está generalmente aceptado que el diámetro de la muestra debe ser al menos tres veces mayor a la del punzón.

La RP se midió por el método de Ghorpade, Li, Gennadios, & Hanna (1995), con algunas modificaciones, utilizando un analizador de textura: Instron Texturometer (Fig. 6). Las películas se fijaron sobre una superficie plana y se perforaron con una sonda P/2N (sonda de aguja), moviéndose a 1 mm/s hasta que la aguja pasase a través de la película. El RP se calculó dividiendo la fuerza máxima por el área de la sección transversal de los esfuerzos de distribución (espesor x diámetro de la abertura del soporte de la película, mm<sup>2</sup>). Todas las determinaciones se hicieron cinco veces. Se calcularon las desviaciones promedio y estándar. Los valores experimentales obtenidos para RP, al no tener una relación lineal, se ajustaron utilizando el siguiente modelo, que permite explicar nuestra variable dependiente:

$$\text{Modelo Polinómico: } RP = ax^2 + bx + c \quad (6)$$

Donde “x” es el tiempo de almacenamiento (días).

Este modelo fue elegido en base a los resultados de Borneo et al. (2016). Se adaptaron los valores experimentales de prueba de punción de películas almacenadas de harina de triticale usando varios modelos (modelos polinómicos, lineales y exponenciales). Los coeficientes de determinación de los modelos (R<sup>2</sup>) mostraron qué

parte de la variabilidad de los datos es explicada por los modelos. En todas las variables analizadas el modelo de mayor ajuste fue el polinómico que explicó mejor (que los otros modelos) la variabilidad de la prueba de punción con valores de R2 más altos, lo que implica que la variable tiempo de almacenamiento tiene un efecto simple y un componente cuadrático sobre las variables analizadas. Se utilizó el software Excel para ajustar los datos a los modelos.

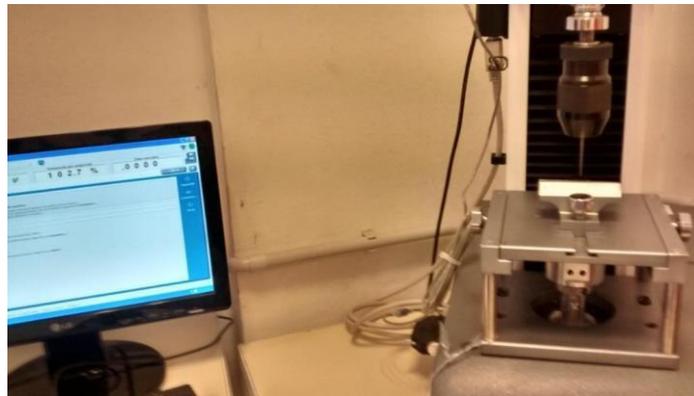


Figura 6. Texturómetro Instron.

## 2.2.10. EVALUACIÓN DEL COLOR

Las mediciones de color se realizaron con un colorímetro Konica Minolta (Minolta CM-508d, Tokio, Japón), que se muestra en la Figura 8. Las películas fueron colocadas sobre una placa blanca, y los resultados fueron expresados con el sistema establecido por la Comisión Internacional de la Iluminación  $L^*$   $a^*$   $b^*$  (CIELab, siglas en francés, Fig 7.), que definen cada color a partir de tres coordenadas denominadas:  $L^*$  (luminosidad o claridad del color), valores de 0=negro y valores de 100=blanco,  $a^*$  (rojo-verde), valores  $-a^*$  verdes y valores  $+a^*$  rojo, y  $b^*$  (amarillo-azul), valores  $-b^*$  azul y valores  $+b^*$  amarillo. Las magnitudes  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  son adimensionales y se definen en función del tipo de estímulo para tratar de simular a los observadores reales

(Joshi & Brimelow, 2002; Marvizadaeh, Oladzadabbasabadi, Nafchi, & Jokar, 2017). Son coordenadas colorimétricas que forman un plano perpendicular a la luminosidad y a su vez, son perpendiculares entre sí. Por otra parte, el corte del eje  $L^*$  con el plano que forman  $a^*$  y  $b^*$  es el punto acromático. El valor  $a^*$  es una medida de la intensidad de color rojo, en el desplazamiento sobre este eje hacia valores positivos del punto acromático se observan los rojos y hacia valores negativos, los verdes. El valor  $b^*$  es una medida de la intensidad de color amarillo, en el desplazamiento sobre este eje hacia valores positivos del punto acromático se observan los amarillos y hacia valores negativos, los azules.



Figura 7. Colorímetro Konica Minolta

El conjunto  $a^*$  y  $b^*$  recibe el nombre de cromaticidad y junto con la luminosidad definen el color de un estímulo (en coordenadas cartesianas).

Se realizaron mediciones sobre las películas de harina triticales, tanto control como las activadas con bacteriocinas, en al menos cinco posiciones seleccionadas aleatoriamente para cada muestra. Se utilizó una placa blanca, como estándar, para comparar la medición de color con respecto a las películas control y activadas. Para

detectar la diferencia de color entre las muestras se calculó el valor  $\Delta E$ , donde  $\Delta$  (delta) es “diferencia de” y E es la letra inicial de *empfindung* que significa sensación (Arrieta et al., 2014; Fai et al., 2016). Cuanto más alto es el valor de  $\Delta E$ , mayor es la desviación en comparación con el estándar.

La diferencia de color total ( $\Delta E^*$ ) entre las películas y el estándar se calculó de la siguiente ecuación:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (7)$$

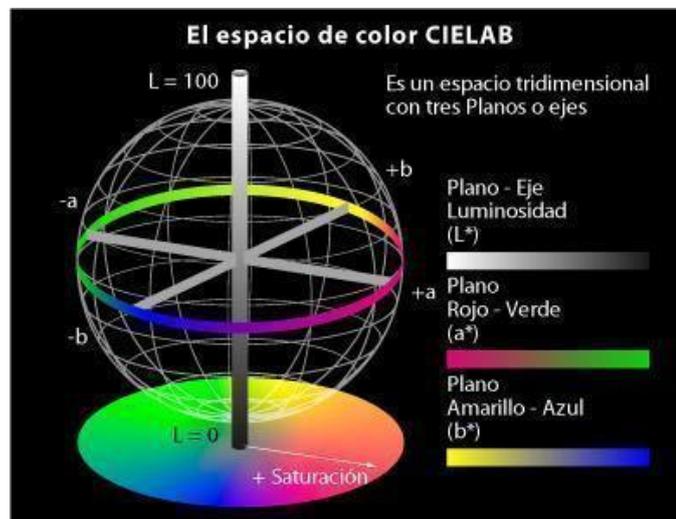


Figura 8. Sistema de color CIELab.

Los valores utilizados para determinar si la diferencia de color total era visualmente evidente fueron los siguientes (Bodart, De Peñaranda, Deneuer, & Flamant, 2008):

$\Delta E^* < 1$  las diferencias de color no son obvias para el ojo humano.

$1 < \Delta E^* < 3$  las diferencias de color no son apreciadas por el ojo humano.

$\Delta E^* > 3$  las diferencias de color son obvias para el ojo humano.

### **2.2.11. MEDICIONES ESPECTROMÉTRICAS Y OPACIDAD (O)**

La opacidad (O) permite evaluar el grado de transparencia de las películas. La opacidad de las películas se calculó dividiendo el valor de la absorbancia a 500nm por el espesor de la película (mm) según el método descrito por Echeverría, Eisenberg, & Mauri (2014). La absorbancia se midió usando un espectrofotómetro Jasco V-730. Cada muestra de película se cortó en una pieza rectangular y se colocó directamente en una celda del espectrofotómetro y las mediciones se realizaron con aire como referencia. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **2.2.12. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS PELÍCULAS ACTIVAS**

La actividad antimicrobiana de las películas indica el grado de inhibición del crecimiento de *L. innocua*. Se determinó colocando círculos de 2 cm. de diámetro de cada película (control y activo) sobre las placas de agar semisólido sembradas con 1% (v / v) del cultivo indicador de *L. innocua* ATCC33090. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h. La actividad de las películas activas fue determinada periódicamente y comparadas con las películas control sin bacteriocinas durante 45 días.

La actividad antimicrobiana, revelada como zona de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora debajo y alrededor de la película, se midió con el programa Imagen J (Abrámoff, Magalhaes, & Ram, 2004).

### **2.2.13. ENSAYOS EN ALIMENTOS**

Para evaluar la capacidad inhibitoria de *L. innocua* de las películas de harina de triticale en un alimento modelo, se utilizó el queso blanco Holanda.

Tabla 4. Características del queso blanco Holanda utilizado.

Contenido de humedad	45%
Actividad del agua ( $a_w$ )	0,95
pH	5,2
Sodio	0,48%
Lípidos	27%

Este queso fue seleccionado por ser de mediana humedad (tabla 4), textura suave, pasta semidura, semi-graso, de aspecto uniforme y color blanco-amarillento. Elaborado con leche parcialmente descremada, acidificada por cultivo de bacterias lácticas y coaguladas por cuajo y/o enzimas específicas. El queso fue comprado en el mercado local.



Figura 9. Queso contaminado con *L. innocua* envasado en bolsa de película de tritiale

Se cortaron rodajas (3 cm x 10 cm) de queso y se sumergieron en solución fisiológica conteniendo *L. innocua* a un nivel de  $5 \times 10^5$  UFC/g. Para la preparación de los envases, se recortaron rectángulos de películas de 12 cm x 9 cm y se sellaron con un termosellador manual en tres de sus lados.

Las rodajas de queso se colocaron en bolsas de películas activadas (películas con SLC y E2) y películas sin bacteriocinas como control (Figura 9). Se termoselló en cuatro lados, cerrando las bolsas. Las muestras se almacenaron a una temperatura de 7°C durante 15 días. Para el análisis microbiológico se tomaron muestras a tiempo 0, 2, 5, 7 y 15 días de almacenamiento.

Posteriormente, las rodajas de queso se transfirieron asépticamente a NaCl al 0,9% p/v (Figura 10) y se homogenizaron por 2 minutos. Se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante recuento en placa. Diluciones seriadas de las muestras homogeneizadas (1:10) en agua de peptona se sembraron en agar selectivo Oxford para *Listeria*. Las placas de agar se incubaron aeróbicamente a 30 °C durante 48 h. Las colonias se contaron y se expresaron como UFC/g.



Figura 10. Cabina de flujo laminar Casiba HL2A. Preparación de la muestra para recuento en placa.

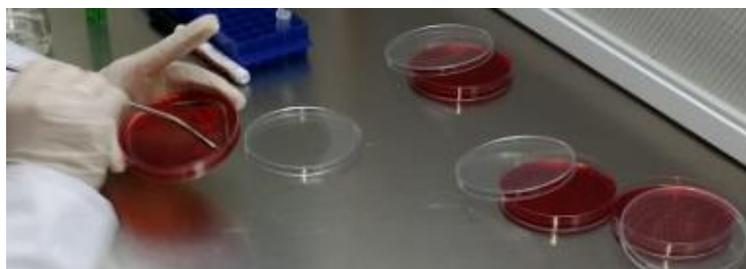


Figura 11. Siembra de las muestras homogeneizadas de queso sobre placas de agar selectivo Oxford para *L. innocua*.

## 2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La densidad, el contenido de humedad, la solubilidad en agua y la permeabilidad al agua se determinaron por triplicado mientras que las propiedades mecánicas se realizaron cinco veces. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para probar las diferencias de medias y se utilizó la prueba de comparación múltiple de Fisher LSD

para averiguar qué medios eran estadísticamente y significativamente diferentes ( $\alpha = 0,05$ ). Los datos estadísticos se realizaron utilizando la versión de software estadístico InfoStat 2014 (Di Rienzo et al., 2014).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. GENERALIDADES DE LAS PELÍCULAS (ESPESOR Y DENSIDAD)

Las películas de harina de triticale fueron homogéneas, resistentes, estables, flexibles, transparentes, de superficie suave y se podían separar fácilmente de las placas (Figura 12). Estas características indican que la harina de triticale tiene un muy buen desempeño como componente formador de las películas. Las películas con el agregado de bacteriocina en sus distintas concentraciones mostraron iguales particularidades, no se observaron poros o grietas. Ramos, Jiménez, Peltzer, & Garrigós, (2012) reportaron similares características en películas, formuladas a base de aislado de proteína de suero de leche.



Figura 12. Película de harina de triticale. Se puede observar su transparencia

El espesor promedio entre las películas control y activas no presentó diferencias significativas, con un valor total de:  $118 \pm 9 \mu\text{m}$ .

La incorporación de bacteriocinas no afectó significativamente a la densidad, como se puede observar en la tabla nro 5.

Tabla 5. Densidad de las películas control y activadas.

<b>Películas</b>	<b>Densidad</b>
Control	$1,31^a \pm 0,09$
SLC	$1,31^a \pm 0,02$
E 1%	$1,29^a \pm 0,30$
E 2%	$1,35^a \pm 0,12$

Los datos se encuentran expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (N =3). Medias con diferentes letras dentro de cada columna son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

### **3.2. CONTENIDO DE HUMEDAD**

La Tabla 6 muestra valores de contenido de humedad (%H) de las películas de harina de triticale control y con el agregado de bacteriocina. Se observa que con el agregado de bacteriocina, a tiempo cero, no se producen cambios significativos, al igual que en películas de triticale con natamicina (Romero et al., 2016). Los valores de porcentaje de humedad observados, oscilaron entre los 16,57 a 18,27%. Tampoco se observaron cambios significativos en películas de quitosano control y el agregado de natamicina (Fajardo et al., 2010).

Tabla 6. Contenido de humedad de películas de harina de triticale control y activas con SLC, E1 y E2.

Película	Porcentaje de humedad (%H)
Control	16,57 <sup>a</sup> ±0,09
SLC	17,34 <sup>a</sup> ±0,02
E 1%	18,27 <sup>a</sup> ±0,30
E 2%	17,81 <sup>a</sup> ±0,12

Los datos se encuentran expresados como la media ± desviación estándar (N =3). Medias con diferentes letras dentro de cada columna son estadísticamente diferentes (p < 0,05)

El contenido de humedad de las películas fue medido a diferentes tiempos de almacenamiento, hasta los 45 días, como muestra la Figura 13. Durante este período no se observaron cambios estadísticamente significativos, tanto para las películas control como para las activas con bacteriocina.

Para películas de gluten de trigo luego del agregado de bacteriocinas sintetizadas por *Lactobacillus curvatus* CRL705, el contenido de humedad no varió significativamente respecto al control, hasta los 15 días de almacenamiento (Massani et al., 2013).

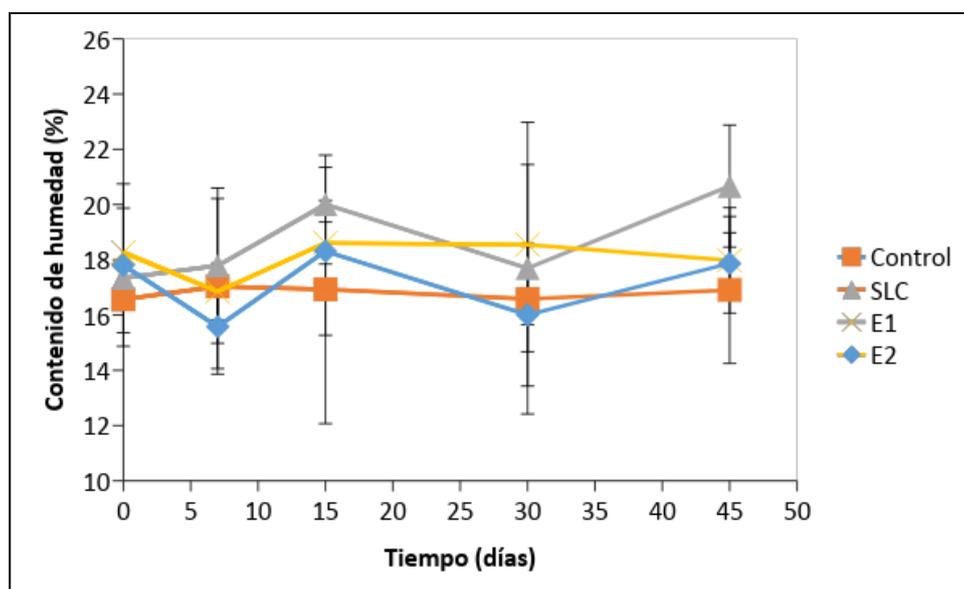


Figura 13. Contenido de humedad de las películas de triticale Control y activas: SLC, E1 y E2.

### 3.3. SOLUBILIDAD (%S)

La solubilidad es un factor importante para la determinación de la resistencia al agua de las películas. Se observaron valores iniciales más altos de solubilidad en agua cuando se añadió la bacteriocina a las películas de harina de triticale en comparación a las películas control (Tabla 7), lo cual puede indicar que dichos compuestos interfieren significativamente en la red polimérica de las películas de harina de triticale. Se observó una tendencia similar para las películas de proteína de suero y caseinato de calcio añadidas con sobrenadantes libres de células de *Lactobacillus rhamnosus* (Beristain-Bauza, Mani-López, Palou, & López-Malo, 2016), mientras que para películas de triticale con natamicina se observó una disminución de los valores de solubilidad (Romero et al., 2016).

Tabla 7. Porcentaje de solubilidad de las películas de harina de triticale control y con el agregado de bacteriocina SLC, E1 y E2.

<b>Película</b>	<b>Solubilidad en agua (%S)</b>
Control	22,78 <sup>a</sup> ±0,56
SLC	28,58 <sup>b</sup> ±0,68
E 1%	28,24 <sup>b</sup> ±1,70
E 2%	27,60 <sup>b</sup> ±2,36

Los datos se encuentran expresados como la media ± desviación estándar (N =3). Medias con diferentes letras dentro de cada columna son estadísticamente diferentes (p < 0,05)

Durante su almacenamiento, como se puede observar en la Figura 14, hubo una caída significativa del porcentaje de solubilidad hasta los 15 días. En las películas con SLC, E1 y E2 continúa disminuyendo levemente el S% hasta los 30 días, de 28.58% a 20.16%, de 28.24% a 20.92% y de 27.6 a 20.96% respectivamente, mostrando mayor resistencia al agua con el tiempo. La película control presentó cambios significativos durante el almacenamiento, pero a los 45 días vuelve a un valor similar al que tenían a tiempo cero.

Si bien el análisis de migración no se realizó, se especula que la bacteriocina podría migrar cuando las películas se solubilizan parcialmente, y este comportamiento puede ser deseable. La actividad antimicrobiana de las películas activas no sólo dependería de la concentración de SLC y E sino también, de la capacidad de migración de la bacteriocina, como sugiere Beristain-Bauza et al. (2016).

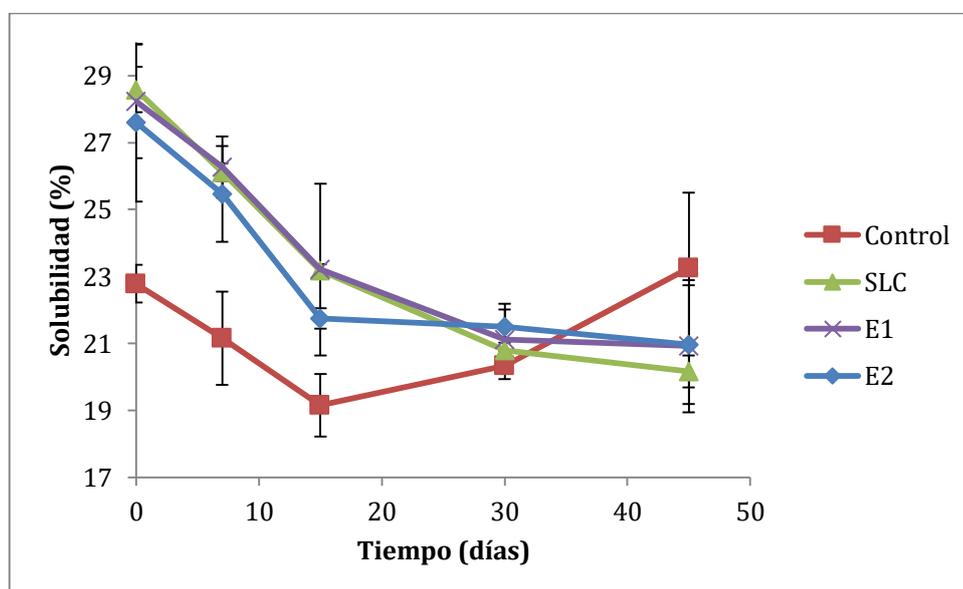


Figura 14. Solubilidad de las películas de triticale Control y activas con CFS, E1 y E2.

### 3.4. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (PVA)

Unas de las propiedades clave de las películas para su aplicación como envase de alimentos, es la propiedad de barrera al vapor de agua, principalmente debido al importante rol del agua en las reacciones de deterioro de los productos alimenticios. Como se puede observar en la Tabla 8, los valores de PVA a tiempo cero no muestran cambios significativos por el agregado de bacteriocina a las películas de triticale.

Tabla 8. Permeabilidad al vapor de agua de las películas de harina de triticale control y activas con SLC, E1 y E2.

<b>Película</b>	<b>Permeabilidad al vapor de agua (PVA) (g m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>)</b>
Control	1,15 <sup>a</sup> ±0,02
SLC	1,16 <sup>a</sup> ±0,17
E 1%	1,09 <sup>a</sup> ±0,05
E 2%	1,05 <sup>a</sup> ±0,18

Los datos se encuentran expresados como la media ± desviación estándar (N =3). Medias con diferentes letras dentro de cada columna son estadísticamente diferentes (p < 0,05)

Durante el almacenamiento (Figura 15) se puede observar que no hay diferencias significativas en los valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas control y de las películas con incorporación de bacteriocina (SLC, E1 Y E2). Resultados similares se obtuvieron cuando se incorporaron bacteriocinas a películas de gluten de trigo (Blanco Massani, Botana, Eisenberg, & Vignolo, 2014). El agregado de esta bacteriocina muestra un comportamiento diferente a películas de triticale activas con natamicina en las que se redujo el valor de PVA (Borneo et al. 2016).

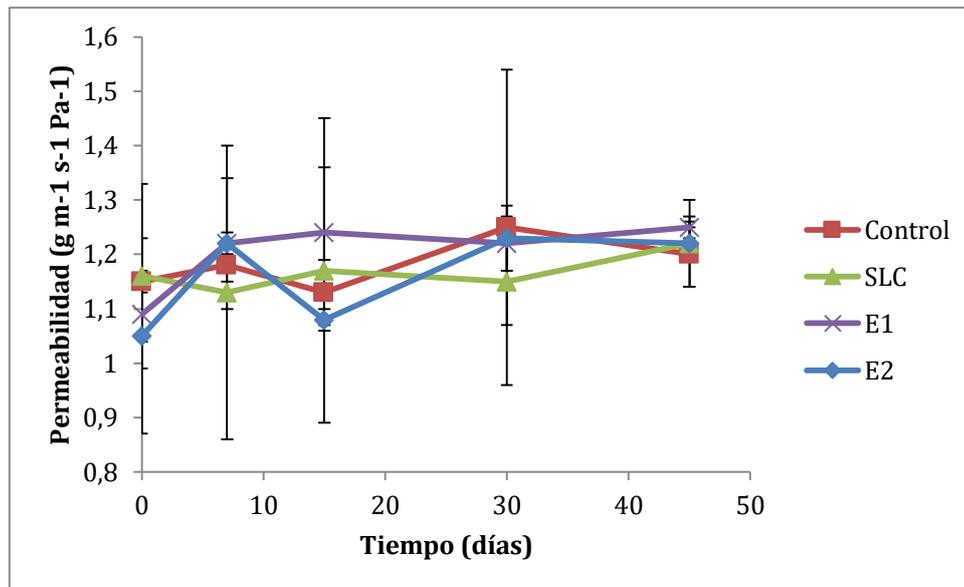


Figura 15. Permeabilidad al Vapor Agua de las películas de triticale (Control, CFS, E1 y E2) durante el almacenamiento.

### 3.5. PROPIEDADES MECÁNICAS. RESISTENCIA A LA PUNCIÓN (RP)

Las propiedades mecánicas son parámetros importantes de las películas biodegradables para el envasado de alimentos, ya que reflejan la resistencia de la película al estrés normal que sufre durante su aplicación. Se evaluó el comportamiento mecánico mediante la punción de las películas. Se observó que el agregado de bacteriocina no produce cambios estadísticamente significativos de la resistencia a la punción de las películas activas en comparación con las películas control (Tabla 9). Podemos considerar, con estos valores registrados, que las películas de harina de triticale poseen buenas propiedades mecánicas aún con el agregado de bacteriocina. Valores similares de RP se han observado en películas de harina de amaranto (Diéguez, Pelissari, do Amaral Sobral, & Menegalli, 2015). Mientras que en películas de caseinato de calcio se observó una importante pérdida de resistencia a la perforación con el agregado de sobrenadante libre de células de *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442 (Beristain-Bauza et al., 2016).

El agregado de bacteriocinas no desestabilizó la estructura de la película. Resultados similares se informaron a partir de la incorporación de natamicina en películas de almidón de tapioca (Resa, Gerschenson, & Jagus, 2014).

Tabla 9. Resistencia a la punción de películas de harina de triticales control y activas con SLC, E1 y E2.

<b>Película</b>	<b>Resistencia a la Punción (RP) (MPa)</b>
Control	1,65 <sup>a</sup> ±0,21
SLC	1,92 <sup>a</sup> ±0,73
E 1%	1,85 <sup>a</sup> ±0,19
E 2%	1,89 <sup>a</sup> ±0,41

Los datos se encuentran expresados como la media ± desviación estándar (N =3). Medias con diferentes letras dentro de cada columna son estadísticamente diferentes (p < 0,05)

También se analizó la resistencia a la punción en función del tiempo de almacenamiento, como muestra en la Figura 16. Se observaron cambios significativos de la fuerza máxima de ruptura con el tiempo de almacenamiento (45 días), en las películas control se observó un aumento del 204%, mientras que, para las películas activas, tanto para que contenían SLC, E1 y E2, aumentaron 173%, 198% y 150% respectivamente. En películas de gluten de trigo con bacteriocinas producida por *Lactobacillus curvatus* CRL705, Blanco Massani et al., (2014) observó a tiempo cero un aumento significativo, mientras que durante el almacenamiento mantuvo valores relativamente constante hasta los 50 días.

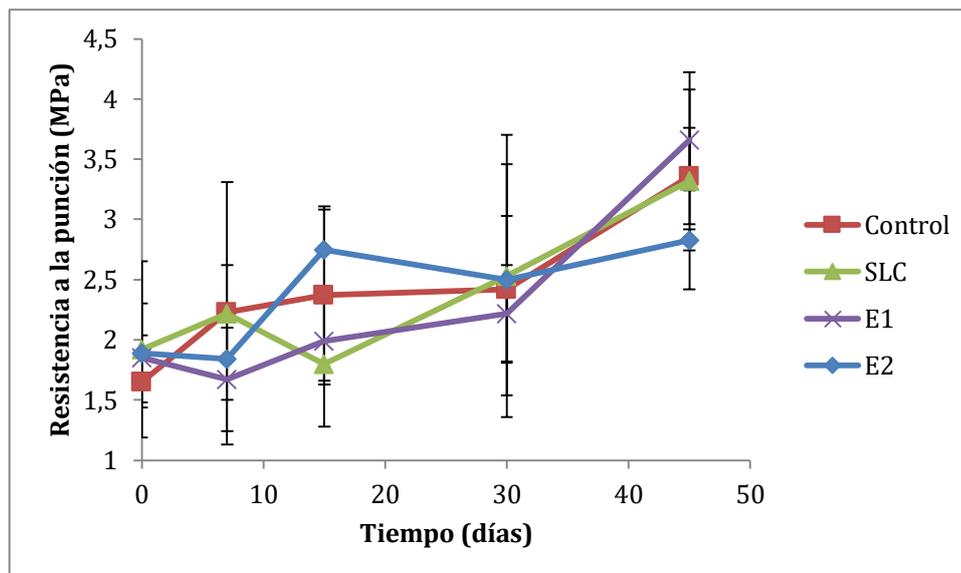


Figura 16. Valores de resistencia a la punción de las películas control y activadas en función del tiempo de almacenamiento.

El aumento de RP durante el tiempo de almacenamiento fue ajustado por la Ecuación modelo Polinómico con los siguientes resultados:

Película	Modelo	Ecuación	R <sup>2</sup>
Control	Polinómico	RP=0,002x <sup>2</sup> +0,0225x+1,8417	0.8722
SLC	Polinómico	RP=0,001x <sup>2</sup> -0,0138x+2,0128	0.9130
E1	Polinómico	RP=0,0015x <sup>2</sup> -0,0269x+1,8655	0.9718
E2	Polinómico	RP=-0,0005x <sup>2</sup> +0,0449x+1,8308	0.7085

Tabla 10. Coeficientes de determinación para las películas de harina de triticale control y activas con SLC, E1 y E2.

Dicho modelo fue determinado previamente, por el estudio realizado sobre el efecto del tiempo de almacenamiento en las propiedades de películas de harina de triticale, por Borneo et al. (2016).

Los coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>) del modelo utilizado en este estudio se presentan en la Tabla 10. Cuanto más altos son los valores del coeficiente R<sup>2</sup>, mejor

permiten expresar el modelo polinómico (Borneo et al., 2016). Se puede observar que entre las películas activas el efecto del almacenamiento fue mayor para las películas SLC y E1, ya que cuando consideramos las ecuaciones del modelo ellas presentaron valores mayores de “a” (Ecuación 4).

### 3.6. COLOR

A partir de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  se calculó el  $\Delta E$ , para detectar la diferencia de color entre las muestras, considerando que cuanto más alto es este valor más se aleja del color del estándar con el cual se compara (Tabla 11):

Tabla 11. Resultados de  $\Delta E$  de las películas de harina de triticale control y activas: SLC, E1 y E2.

Películas	$\Delta E$
Control	9,04 <sup>a</sup> ±0,20
SLC	10,20 <sup>b</sup> ±0,32
E 1	11,20 <sup>c</sup> ±0,57
E 2	12,45 <sup>d</sup> ±0,40

Los datos se encuentran expresados como la media  $\pm$  desviación estándar (N =3). Medias con diferentes letras dentro de cada columna son estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Estos resultados permiten apreciar cambios significativos en  $\Delta E$  con el agregado de bacteriocina. Se puede observar que el aumento de  $\Delta E$  va acompañado con el aumento de la purificación de las bacteriocina. Resultados similares fueron reportados por otros autores en películas de proteínas de suero con el agregado de sobrenadante libre de células de *Lactobacillus rhamnosus* (Beristain-Bauza et al., 2016).

Durante su almacenamiento como se muestra en la Figura 17, se sigue observando valores significativamente diferentes en el  $\Delta E$  en comparación entre las películas

control y activas. A los 15 días, las películas control y con SLC, se puede observar valores similares, mientras que E1 y E2 tiene un  $\Delta E$  significativamente mayores cuando se las compara con control y SLC. A su vez, en cada película en particular si bien presentaron variaciones con respecto al tiempo, éstas no fueron significativas con respecto a los valores observados inicialmente (tiempo 0) en cada caso.

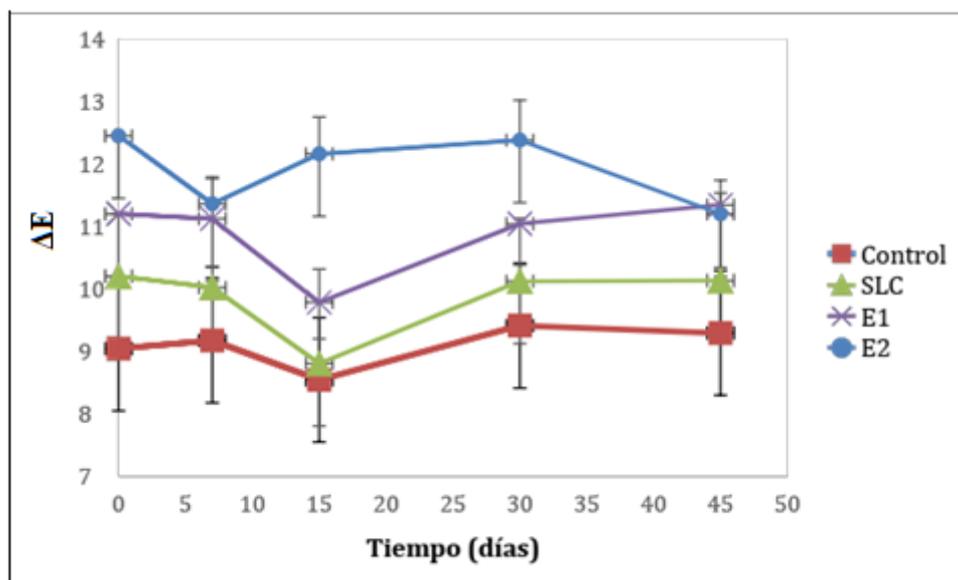


Figura 17.  $\Delta E$  en películas control y activas con SLC, E1 y E2 durante su almacenamiento.

### 3.7. OPACIDAD Y PROPIEDADES ESPECTOMÉTRICAS

La opacidad como propiedad óptica tiene un impacto directo en la apariencia de un envase. Como se puede ver en la Tabla 12 las películas muestran, a tiempo cero, cambios significativos, en la opacidad observada, con la adición de la bacteriocina (SLC y E), posiblemente por la interacción de la bacteriocina con los componentes de las películas provocando un aumento en los valores de esta propiedad. Esto podría ser una desventaja, sin embargo, estos cambios son apenas perceptibles al ojo humano si se utilizan como envase. En películas de proteínas de suero fueron muy afectadas con el

agregado de sobrenadante libre de células *Lactobacillus rhamnosus* NRRL B-442, de acuerdo a lo reportado por Beristain-Bauza et al., (2016).

Tabla 12. Valores de Opacidad de las películas de harina de triticale control y activas a tiempo cero.

Películas	Opacidad (UA mm <sup>-1</sup> )
Control	1,53 <sup>a</sup> ±0,04
SLC	4,77 <sup>b</sup> ±0,01
E 1	5,78 <sup>c</sup> ±0,01
E 2	7,02 <sup>d</sup> ±0,02

Los datos se encuentran expresados como la media ± desviación estándar (N =3). Medias con diferentes letras dentro de cada columna son estadísticamente diferentes (p < 0,05)

Durante el tiempo de almacenamiento se observó una disminución significativa en la opacidad de las películas SLC y E2 (de 4,77 a 4,05 y 7,02 a 6,41, respectivamente) y un aumento en las películas E1 de 5,78 a 6,41, mientras que no hubo cambios significativos en las películas de control observadas (Figura 18).

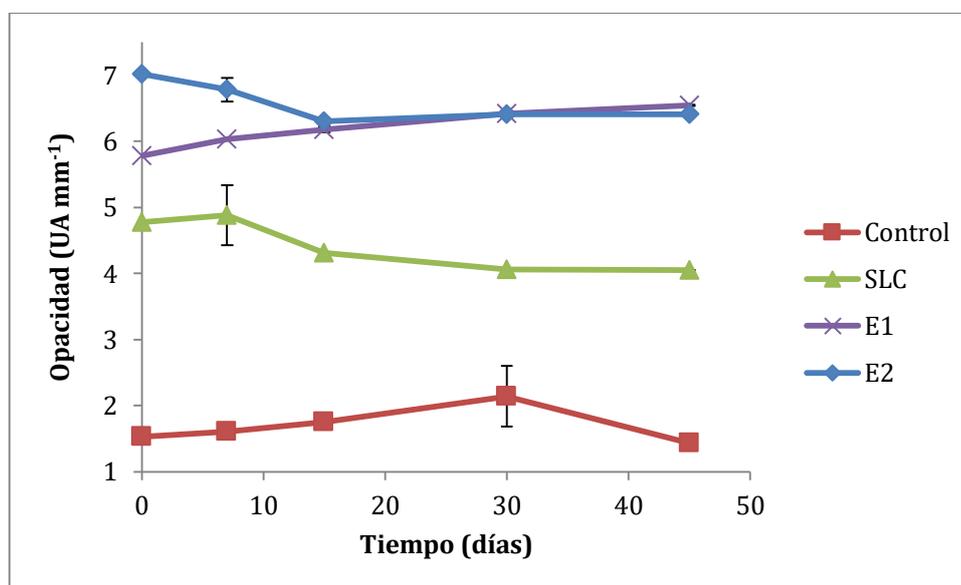


Figura 18. Opacidad de las películas de triticale Control y las activas con SLC, E1 y E2 durante el almacenamiento.

### 3.8. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS PELÍCULAS

El sobrenadante libre de células de *E. faecium* ES216 presentó una actividad antimicrobiana de 1024 UA/mL contra *L. innocua* ATCC33090. La purificación realizada permitió obtener un extracto (E) que presentó una actividad antimicrobiana de 512 UA/ml (Tabla 13). Si bien ocurre una disminución en la actividad antimicrobiana, la purificación permitió eliminar otras proteínas presentes en el medio de cultivo que pueden interferir en la actividad antimicrobiana.

Asimismo, se observa que el nivel de disminución no es tan drástico como se ha registrado para otras bacteriocinas como la *Lactobacillus plantarum* ST31 (Svetoslav Dimitrov Todorov, van Reenen, & Dicks, 2004). Lo mismo se observó con la purificación de *Lactobacillus sakei* MBSa1 (Barbosa et al. 2014). Otro factor que puede provocar una reducción en la actividad antimicrobiana tras la purificación es que la bacteriocina producida sea de clase IIb, compuesta por dos péptidos necesarios para la acción antimicrobiana completa, su diferencia estructural podría dar lugar a diferencias en la elución y la consiguiente disminución en su potencia antimicrobiana (Pingitore et al., 2007).

Tabla 13. Actividad antimicrobiana de películas de triticale con SLC y E.

Muestra	Actividad Antimicrobiana (Unidades arbitrarias/ml)
SLC	1024
E	512

Además, otra posibilidad a tener en cuenta es la producción de más de un péptido con diferentes propiedades fisicoquímicas que dan como resultado una elución diferencial durante la purificación, con la consiguiente disminución de su potencia inhibitoria en el extracto (Henning, Gautam, & Muriana, 2015).

El SLC y el E, se agregaron a las soluciones de formación de película (SFP) para obtener diferentes concentraciones finales en películas activas: SLC (1mL SLC/100mL SFP, 45UA/dm<sup>2</sup> película), E1 (1mL E1/100mL SFP, película 22.5UA/dm<sup>2</sup>) y E2 (2mL E2/100mL SFP, película 45UA/dm<sup>2</sup>). La actividad antimicrobiana de las diferentes películas (control y activadas) se analizó a través del método de difusión en agar. Como se esperaba, no se observaron zonas de inhibición para películas control. Por otro lado, *L. innocua* ATCC33090 fue claramente inhibida por las películas preparadas con SLC, E1 y E2 (Figura 19).

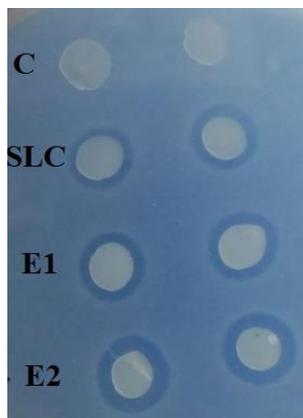


Figura 19. Actividad antimicrobiana de las películas de harina de triticale Control (C), SLC (sobrenadante libre de células), E1 y E2 (extractos)

La etapa de purificación de las bacteriocinas da como resultado un menor contenido de proteínas y otros componentes de los medios de cultivo, por lo que se piensa que la liberación de bacteriocina (E), más purificada, permite una mejor acción inhibitoria sobre *L. innocua* a comparación del SLC, el cual ejerce un efecto inhibitor más bajo. Los envases activos están diseñados no sólo para contener los alimentos, sino también

para mantenerlos seguros y protegidos. Para cumplir este objetivo, el envase activo debe mantener sus propiedades antimicrobianas a lo largo del tiempo, al menos de acuerdo con la vida útil de los productos. En relación a esto se estableció un período de evaluación de 45 días. Se evaluó el efecto del envejecimiento de las películas de formulación (control, SLC, E1 y E2), como se observa en la tabla 14.

Tabla 14. Actividad antimicrobiana de las películas de harina de triticale sin bacteriocina (control) y que contiene sobrenadante libre de células (SLC) y extracto de bacteriocina semipurificado (E1 y E2), expresada como zona de inhibición (mm).

<b>Tiempo de almacenamiento</b>	<b>Zona de Inhibición Diámetro (mm)</b>			
	<b>Película Control</b>	<b>Película c/ SLC</b>	<b>Película c/ E1</b>	<b>Película c/ E2</b>
<b>0</b>	0	6.1 <sup>aA</sup> ±0.4	6.2 <sup>aA</sup> ±0.4	8.0 <sup>aB</sup> ±0.7
<b>15</b>	0	6.4 <sup>aA</sup> ± 0.2	6.7 <sup>aA</sup> ± 0.3	8.1 <sup>aB</sup> ± 0.2
<b>30</b>	0	5.9 <sup>aA</sup> ± 0.3	6.5 <sup>aA</sup> ± 0.2	7.3 <sup>aB</sup> ± 0.3
<b>45</b>	0	5.8 <sup>aA</sup> ± 0.3	5.8 <sup>aA</sup> ± 0.3	6.6 <sup>bB</sup> ± 0.3

Los valores reportados son medias (n = 3) ± desviación estándar. Las diferentes letras minúsculas como superíndices en una columna indican diferencias significativas (p <0.05). Diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas (p <0.05).

Las películas de harina de triticale inmovilizaron físicamente los compuestos activos en la matriz polimérica y no químicamente, permitiendo una liberación gradual y mantenimiento la actividad antimicrobiana durante el tiempo de almacenamiento (Balasubramanian, E Rosenberg, Yam, & Chikindas, 2009). Las películas activas no mostraron una disminución significativa de la actividad antimicrobiana a lo largo del período de evaluación, con halos de inhibición mayores a 5 mm en los ensayos de inhibición en agar, durante todo el período evaluados. No hubo evidencia de colonias resistentes a la bacteriocina dentro de las zonas de inhibición en ninguna de las

formulaciones evaluadas, por lo menos hasta las 48 hs. Esto significa que al menos hasta 45 días hay una liberación suficiente de bacteriocina con efecto bactericida.

La permanencia del efecto observado es mayor que la informada en otras películas bioactivas que han utilizado extractos de bacteriocinas en películas multicapas con un almacenamiento de 50 días (Massani et al., 2013). También se reportó una reducción de la actividad antimicrobiana en películas de gelatina con el agregado de bacteriocina producida por *E. faecium* SM21 durante un almacenamiento de 24 horas (Ibarguren et al., 2015). En películas de proteína de guisante utilizadas como soporte con la incorporación de SLC de bacteriocinas producida por *Lactobacillus plantarum*, la actividad antimicrobiana máxima de ésta, ocurrió a los 15 días de almacenamiento y luego disminuyó (Sánchez-González, Saavedra, & Chiralt, 2013).

La efectividad de las películas con actividad antilisteria podría potenciarse con incorporación de antimicrobianos con otros objetivos como la natamicina. La combinación de ambos antimicrobianos se propuso recientemente utilizando otras películas (Ollé Resa, Gerschenson, & Jagus, 2016). Las películas de triticale ya han mostrado resultados positivos usando natamicina (Romero et al., 2016), por lo que podría ser factible combinar ambas bacteriocinas sobre esta película y lograr un efecto antimicrobiano más amplio.

### **3.9. ENSAYOS SOBRE ALIMENTOS**

Las películas activas pudieron reducir las UFC/g de *Listeria* durante el ensayo en alimentos. Las muestras de queso envasadas con películas control alcanzaron niveles de  $1 \times 10^5$  CFU/g de *Listeria* después de 3 días y  $4 \times 10^6$  UFC/g en el día 15. Las películas

con SLC redujeron significativamente la cantidad de *Listeria* en el queso a casi  $1 \times 10^4$  UFC/g el día 3 y continuaron disminuyendo ligeramente a  $4 \times 10^3$  UFC/g hasta el día 15. Las películas con E2 también alcanzaron los niveles de recuento más bajos de *Listeria* después de 15 días de almacenamiento alcanzando  $1.7 \times 10^3$  UFC/g (Figura 20).

Después de los 5 días, ambas películas activas disminuyeron los recuentos de *Listeria* en 1  $\log_{10}$  en comparación con las películas control. Los recuentos bacterianos en las muestras de control aumentaron a  $1,5 \times 10^5$  UFC/g después de 5 días y permanecieron estables hasta el día 10. Luego, aumentaron bruscamente a  $4 \times 10^6$  UFC/g a los 15 días de almacenamiento. En este punto, el recuento de células viables de *Listeria* en el queso envasado con las películas activas, disminuyó a  $4 \times 10^3$  UFC/g y  $1,7 \times 10^3$  UFC/g para películas SLC y E2 respectivamente, lo que representó una reducción de 3 unidades logarítmicas en comparación con las películas control.

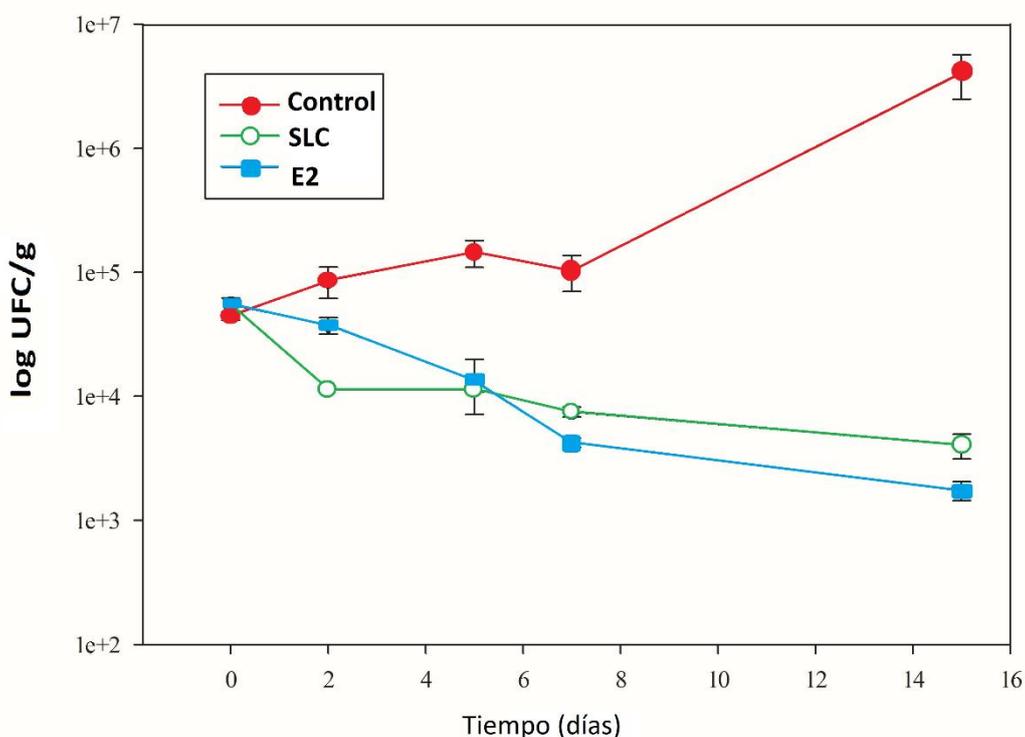


Figura 20. Cinética de crecimiento de *Listeria innocua* en muestras de queso durante el almacenamiento a 7 °C empaquetados con películas control, SLC y E2.

Estos resultados implican una inactivación eficiente del microorganismo en comparación con informes como el de los autores Cao-Hoang, Chaine, Grégoire, & Waché, (2010) que reportaron en películas de caseinato de sodio una reducción en 1.1 log<sup>10</sup> de patógeno usando películas con 1000 UA/cm<sup>2</sup> de nisina. Se observaron los mismos niveles de inhibición de *Listeria* con paquetes híbridos activados con el antimicrobiano enterocina 416K1 (Iseppi et al., 2008). Fabra et al., (2017) observaron una disminución similar de alrededor de 1 log<sub>10</sub> en el día 4, en películas biodegradables de almidón con el agregado de SLC de *Lactobacillus curvatus* P99. Sin embargo, en ese trabajo *Listeria* alcanzó niveles similares a una película control en el día 10.

La disminución de los recuentos de *Listeria* observados en nuestro trabajo demostró una poderosa actividad inhibidora de las películas activas. Nuestros análisis microbianos en queso confirmaron la eficacia obtenida en los ensayos de difusión *in vitro*.

## 4. CONCLUSIÓN

Las películas de harina de triticale se adecúan excelentemente como matriz de soporte de las sustancias antimicrobianas tales como las bacteriocinas aquí investigadas. La utilización de una materia prima autóctona y de bajo costo, como el cereal de triticale, hizo posible elaborar una película biodegradable en base a su harina, que se desarrolló efectivamente según la técnica de evaporación de solvente. En este trabajo fueron caracterizadas las propiedades físico-químicas, ópticas y mecánicas de estas películas, tanto control como activadas, observándose propiedades comparables a otras películas de otra naturaleza o elaboradas con harinas de otras especies y bacteriocinas. También fue investigado el efecto del tiempo de almacenamiento sobre dichas propiedades, observando valores constantes y apropiados durante el almacenamiento, especialmente hasta los 45 días. Se obtuvieron propiedades ópticas, de barrera y mecánicas adecuadas.

Las películas activas con SLC, E1 y E2 han demostrado una fuerte actividad antimicrobiana. Esta bioactividad persiste durante más de 45 días. Además, la adición de estos extractos no tiene un efecto significativo sobre las propiedades generales de las películas. Este período es consistente con la vida útil de algunos productos lácteos y cárnicos envasados. Se sabe que la prevalencia de *L. monocytogenes* en diferentes tipos de queso después del envasado y al final de la vida útil es un problema en diferentes países. La estabilidad de la actividad inhibitoria se acompañó sin aparición de colonias resistentes a lo largo del período de evaluación en ensayos con placas, lo cual demuestra la persistencia del efecto bactericida.

La película de harina de triticale con actividad antimicrobiana constituye una barrera efectiva que puede mejorar la seguridad de diferentes productos. En un ensayo

utilizando queso como alimento modelo, se determinó que la actividad antimicrobiana actúa sobre la superficie del alimento en contacto a lo largo de vida útil del producto. Los quesos envasados con las películas mostraron una disminución significativa de los recuentos de *Listeria* a lo largo del período evaluado, una disminución de 3 unidades logarítmicas de células viables de *Listeria* en comparación con las películas control después de 15 días. Las películas activas de triticale con bacteriocina de *Enterococcus faecium* 216 son un método prometedor para superar los problemas asociados con la contaminación posterior al proceso alimentario, mejorando la seguridad microbiana de los quesos. La aplicación de estas películas podría extenderse al envasado de otros alimentos.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., & Ram, S. J. (2004). Image processing with ImageJ. *Biophotonics international*, 11(7), 36–42.
- Aguirre, A., Borneo, R., & León, A. E. (2011). Properties of triticale flour protein based films. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1853–1858.
- Aguirre, A., Borneo, R., & León, A. E. (2013). Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, 1, 2-9. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2012.12.001>
- Aguirre, Alicia, Borneo, R., & León, A. E. (2013). Properties of triticale protein films and their relation to plasticizing–antiplasticizing effects of glycerol and sorbitol. *Industrial crops and products*, 50, 297–303.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 837-842. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.021>
- Alerte, V., Cortés A, S., Díaz T, J., Vollaire Z, J., Espinoza M, M. E., Solari G, V., ... Torres H, M. (2012). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y agua en la Región Metropolitana, Chile (2005-2010). *Revista chilena de infectología*, 29(1), 26-31. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000100004>
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939-2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Arrieta, M. P., Fortunati, E., Burgos, N., Peltzer, M. A., López, J., & Peponi, L. (2016). Nanocellulose-based polymeric blends for food packaging applications. En *Multifunctional Polymeric Nanocomposites Based on Cellulosic Reinforcements* (pp. 205–252). Elsevier.
- Arrieta, Marina P., Peltzer, M. A., López, J., del Carmen Garrigós, M., Valente, A. J., & Jiménez, A. (2014). Functional properties of sodium and calcium caseinate antimicrobial active films containing carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 121, 94–101.

- Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A. J. G., Lebrihi, A., & Lefebvre, G. (2001). Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *International Journal of Food Microbiology*, 68(1), 93-104. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00482-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00482-2)
- Balasubramanian, A., E Rosenberg, L., Yam, K., & Chikindas, M. (2009). Antimicrobial Packaging: Potential vs. Reality—A Review. *Journal of Applied Packaging Research*, 3, 193-221.
- Barbosa, M. S., Todorov, S. D., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Rabesona, H., Ivanova, I. V., ... Franco, B. (2014). Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* MBS a1 isolated from Brazilian salami. *Journal of applied microbiology*, 116(5), 1195–1208.
- Bastidas Flores, V. D. C. (2016). *Envoltura comestible a base de celulosa microcristalina de bagazo de caña de azúcar* (B.S. thesis).
- Beristain-Bauza, S. C. (2012). *Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos*. 15.
- Beristain-Bauza, S. C., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2016). Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Control*, 62, 44–51.
- Beutin, L., & Martin, A. (2012). Outbreak of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 Infection in Germany Causes a Paradigm Shift with Regard to Human Pathogenicity of STEC Strains. *Journal of Food Protection*, 75(2), 408-418. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-452>
- Blanco Massani, M., Botana, A., Eisenberg, P., & Vignolo, G. (2014). Development of an active wheat gluten film with *Lactobacillus curvatus* CRL705 bacteriocins and a study of its antimicrobial performance during ageing. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(1), 164–171.
- Bodart, M., De Peñaranda, R., Deneayer, A., & Flamant, G. (2008). Photometry and colorimetry characterisation of materials in daylighting evaluation tools. *Building and Environment*, 43(12), 2046–2058.
- Borneo, R., Alba, N., & Aguirre, A. (2016). New films based on triticale flour: Properties and effects of storage time. *Journal of Cereal Science*, 68, 82–87.

- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 237–248.
- 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(7), 940-944. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.025>
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives: Adding molecules to food, pros and cons.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377-399. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>
- Castellano, P. (2003). Mode of action of lactocin 705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2), 35-43. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00479-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00479-8)
- Castillo, R., Escobar, E., Fernández, D., Gutiérrez, R., Morcillo, J., Núñez, N., & Peñaloza, S. (2015). BIOPLÁSTICO A BASE DE LA CÁSCARA DEL PLÁTANO. *Revista de Iniciación Científica*, 1(1), 34-37.
- Cebrián, G., Mañas, P., & Condón, S. (2016). Comparative Resistance of Bacterial Foodborne Pathogens to Non-thermal Technologies for Food Preservation. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00734>
- Ceron, J. P. Q. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Revista Tumbaga*, 1(5). Recuperado de <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/59>
- Chams, L. M. C. (s. f.). *Trabajo de grado presentado para optar al título de*: 106.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Food microbiology: Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Dennett, A. L., Wilkes, M. A., & Trethowan, R. M. (2013). Characteristics of Modern Triticale Quality: The Relationship Between Carbohydrate Properties,  $\alpha$ -Amylase Activity, and Falling Number. *Cereal Chemistry*, 90(6), 594–600.
- Deraz, S. F., Karlsson, E. N., Hedström, M., Andersson, M. M., & Mattiasson, B. (2005). Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM

20079. *Journal of Biotechnology*, 117(4), 343-354.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.02.005>
- Diéguez, M. C. V., Pelissari, F. M., do Amaral Sobral, P. J., & Menegalli, F. C. (2015). Effect of process conditions on the production of nanocomposite films based on amaranth flour and montmorillonite. *LWT-Food Science and Technology*, 61(1), 70–79.
- Dobrucka, R., & Cierpiszewski, R. (2014). Active And Intelligent Packaging Food – Research And Development – A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64(1), 7-15.  
<https://doi.org/10.2478/v10222-012-0091-3>
- Durango, A. M., Soares, N. F. F., Benevides, S., Teixeira, J., Carvalho, M., Wobeto, C., & Andrade, N. J. (2006). Development and evaluation of an edible antimicrobial film based on yam starch and chitosan. *Packaging Technology and Science: An International Journal*, 19(1), 55–59.
- Durango, Alba Manuela, Soares, N. de F. F., & Arteaga, M. R. (2011). Filmes y revestimientos comestibles como empaques activos biodegradables en la conservación de alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 9(1), 112-118.
- Echeverría, I. (2012). *Materiales biodegradables en base a proteínas de soja y montmorillonitas* (PhD Thesis). Facultad de Ciencias Exactas.
- Echeverría, I., Eisenberg, P., & Mauri, A. N. (2014). Nanocomposites films based on soy proteins and montmorillonite processed by casting. *Journal of Membrane Science*, 449, 15–26.
- Eswaranandam, S., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2004). Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin-incorporated soy protein film against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Salmonella gaminara*. *Journal of Food Science*, 69(3), FMS79–FMS84.
- Fabra, M. J., Martínez-Sanz, M., Gómez-Mascaraque, L. G., Coll-Marqués, J. M., Martínez, J. C., & López-Rubio, A. (2017). Development and characterization of hybrid corn starch-microalgae films: Effect of ultrasound pre-treatment on structural, barrier and mechanical performance. *Algal Research*, 28, 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.010>
- Fai, A. E. C., de Souza, M. R. A., de Barros, S. T., Bruno, N. V., Ferreira, M. S. L., & de Andrade Gonçalves, É. C. B. (2016). Development and evaluation of biodegradable films and coatings obtained from

- fruit and vegetable residues applied to fresh-cut carrot (*Daucus carota* L.). *Postharvest Biology and Technology*, *112*, 194–204.
- Fajardo, P., Martins, J. T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, *101*(4), 349–356.
- Fakhouri, F. M., Tanada-Palmu, P. S., & Grosso, C. R. F. (2004). Characterization of composite biofilms of wheat gluten and cellulose acetate phthalate. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *21*(2), 261–264.
- Fernández Valdés, D., Bautista Baños, S., Fernández Valdés, D., Ocampo Ramírez, A., García Pereira, A., & Falcón Rodríguez, A. (2015). Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, *24*(3), 52-57.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of food protection*, *77*(1), 150–170.
- Gallo, G. A. (2016). *Estudio de propiedades fisicoquímicas y biológicas de películas bioactivas a base de quitosano y su efecto sobre la extensión de la vida útil de vegetales mínimamente procesados*. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/59419>
- Galus, S., & Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, *45*(2), 273–283.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, *120*(1-2), 51-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>
- Garzón, T., & Allister, M. (2009). La inocuidad de alimentos y el comercio internacional. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *22*(3), 330-338.
- Ghorpade, V. M., Li, H., Gennadios, A., & Hanna, M. A. (1995). Chemically modified soy protein films. *Transactions of the ASAE*, *38*(6), 1805–1808.
- Gokoglu, N. (2019). Novel natural food preservatives and applications in seafood preservation: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(5), 2068–2077.

- González, L. T., Hernández, A. I. R., Cuellar, M. del R. L., Martínez, V. M. J., & Hernández, N. C. (2017). Diseño y caracterización de películas de gelana-pectina adicionadas con bacteriocinas y EDTA, con actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en medios a base de Barbacoa estilo Tulancingo. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, 3(6).
- Granada-Restrepo, D., Medina-Pineda, Y., Culebras-Rubio, M., & Gómez-Clari, C. (2014). Development and characterization of an active biodegradable film with antioxidants (alpha-tocopherol) from whey proteins. *Vitae*, 21(1), 11–19.
- Güllüce, M., Karadayı, M., & Barış, Ö. (2013). *Bacteriocins: Promising Natural Antimicrobials*. <https://doi.org/10.13140/2.1.5014.5606>
- Guo, M., Jin, T. Z., Yadav, M. P., & Yang, R. (2015). Antimicrobial property and microstructure of micro-emulsion edible composite films against *Listeria*. *International journal of food microbiology*, 208, 58–64.
- Guo, X., Lu, Y., Cui, H., Jia, X., Bai, H., & Ma, Y. (2012). Factors affecting the physical properties of edible composite film prepared from zein and wheat gluten. *Molecules*, 17(4), 3794–3804.
- Guzmán, L. E., Acevedo, D., Romero, L., & Estrada, J. (2015). Elaboración de una película comestible a base de colágeno incorporado con nisina como agente antimicrobiano. *Información tecnológica*, 26(3), 17–24.
- Heng, N. C. K., & Tagg, J. R. (2006). What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2), 160. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273-c1>
- Henning, C., Gautam, D., & Muriana, P. (2015). Identification of multiple bacteriocins in *Enterococcus* spp. using an *Enterococcus*-specific bacteriocin PCR array. *Microorganisms*, 3(1), 1–16.
- Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2017). BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS: MECANISMOS DE ACCIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA PATÓGENOS EN QUESOS. *Interciencia*, 42(6). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=33951621002>
- Hernández-Muñoz, P., Kanavouras, A., Ng, P. K., & Gavara, R. (2003). Development and characterization of biodegradable films made from wheat gluten protein fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7647–7654.

- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., & Farahmandghavi, F. (2016). Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. *Food chemistry*, *194*, 1266–1274.
- Ibáñez, F. C. (2003). *Aditivos alimentarios*. 10.
- Ibarguren, C., Céliz, G., Díaz, A. S., Bertuzzi, M. A., Daz, M., & Audisio, M. C. (2015). Gelatine based films added with bacteriocins and a flavonoid ester active against food-borne pathogens. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *28*, 66–72.
- Inocuidad de los alimentos. (s. f.). Recuperado 7 de agosto de 2018, de World Health Organization website: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Iseppi, R., Pilati, F., Marini, M., Toselli, M., de Niederhäusern, S., Guerrieri, E., ... Bondi, M. (2008). Antilisterial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *International Journal of Food Microbiology*, *123*(3), 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.015>
- Iwata, T. (2015). Biodegradable and bio-based polymers: future prospects of eco-friendly plastics. *Angewandte Chemie International Edition*, *54*(11), 3210–3215.
- Jabeen, N., Majid, I., & Nayik, G. A. (2015). Bioplastics and food packaging: A review. *Cogent Food & Agriculture*, *1*(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1117749>
- JAHUEY HERNÁNDEZ, M. (2014). *APLICACIÓN DE RECUBRIMIENTO COMESTIBLE PARA REDUCIR LA ABSORCIÓN DE ACEITE DURANTE EL PROCESO DE FREIDO EN LOS ALIMENTOS*.
- Joshi, P., & Brimelow, C. J. B. (2002). Colour measurement of foods by colour reflectance. En *Colour in Food* (pp. 80–114). Elsevier.
- Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Bimbiraitė-Survilienė, K., Naujokaitytė, G., Šernienė, L., Mulkytė, K., ... Maruška, A. (2017). Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(4), 1323-1335. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8088-9>
- Khan, R. U., & Naz, S. (2013). The applications of probiotics in poultry production. *World's Poultry Science Journal*, *69*(03), 621-632. <https://doi.org/10.1017/S0043933913000627>
- Kim, J.-S., Her, J.-Y., & Lee, K.-G. (2015). Formation and reduction of carcinogenic furan in various model systems containing food additives. *Food chemistry*, *189*, 108–113.

- Kore, V. T., Tawade, S. S., & Kabir, J. (2016). Application of Edible Coatings on Fruits and Vegetables. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*, 3(1).
- Laursen, M. F., Bahl, M. I., Licht, T. R., Gram, L., & Knudsen, G. M. (2015). A single exposure to a sublethal pediocin concentration initiates a resistance-associated temporal cell envelope and general stress response in *Listeria monocytogenes*. *Environmental microbiology*, 17(4), 1134–1151.
- Lopez, J. E., Silva-Weiss, A., Giménez, B., Matiacevich, S., Saavedra, N., Valenzuela, V., ... Osorio, F. A. (2016). Propiedades físicas, térmicas y reológicas de películas comestibles elaboradas de carboximetilcelulosa (CMC). *Agronomía Colombiana*, 34(1Supl), S152–S155.
- López-Díaz, A. S. (2015). *Películas comestibles elaboradas a base de frutas y verduras*. 12.
- Lopez-Rubio, A., Almenar, E., Hernandez-Muñoz, P., Lagarón, J. M., Catalá, R., & Gavara, R. (2004). Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications. *Food Reviews International*, 20(4), 357–387.
- Mahapatra, S. K., & Parija, S. C. (2018). *FOOD ADDITIVES: POTENTIAL RISK FOR CANCER*.
- Majid, I., Nayik, G. A., Dar, S. M., & Nanda, V. (2016). Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.
- Manley, M., McGoverin, C. M., Snyders, F., Muller, N., Botes, W. C., & Fox, G. P. (2013). Prediction of Triticale Grain Quality Properties, Based on Both Chemical and Indirectly Measured Reference Methods, Using Near-Infrared Spectroscopy. *Cereal Chemistry*, 90(6), 540–545.
- Maqueda, M., Galvez, A., Bueno, M., Sanchez-Barrena, M., Gonzalez, C., Albert, A., ... Valdivia, E. (2004). Peptide AS-48: Prototype of a New Class of Cyclic Bacteriocins. *Current Protein & Peptide Science*, 5(5), 399-416. <https://doi.org/10.2174/1389203043379567>
- Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., & Gutiérrez, E. (2013). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones/Chitin and Chitosan friendly polymer. A review of their applications. *Revista Tecnocientífica URU*, (1), 53–58.
- Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerro-Brauer, J. M., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M., ... Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 305-315. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.069>

- Martinis, E. C. P. D., Públío, M. R. P., Santarosa, P. R., & Freitas, F. Z. (2001). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged brazilian meat and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(1), 32-37. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000100008>
- Marvizadeh, M. M., Oladzadabbasabadi, N., Nafchi, A. M., & Jokar, M. (2017). Preparation and characterization of bionanocomposite film based on tapioca starch/bovine gelatin/nanorod zinc oxide. *International journal of biological macromolecules*, 99, 1–7.
- Massani, M. B., Vignolo, G. M., Eisenberg, P., & Morando, P. J. (2013). Adsorption of the bacteriocins produced by *Lactobacillus curvatus* CRL705 on a multilayer-LLDPE film for food-packaging applications. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 128–138.
- Masuelli, M. A. (2017). Formulation, Properties and Performance of Edible Films and Coatings from Marine Sources in Vegetable and Fruits. En *Biopackaging* (pp. 110–211). CRC Press.
- McGoverin, C. M., Snyders, F., Muller, N., Botes, W., Fox, G., & Manley, M. (2011). A review of triticale uses and the effect of growth environment on grain quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(7), 1155–1165.
- Mellado, M. Z., Matus, I. T., & Madariaga, R. B. (2008). Antecedentes sobre el triticale en Chile y otros países. *Bol. INIA*, (183), 75.
- Mellinas, C., Valdés, A., Ramos, M., Burgos, N., Garrigós, M. del C., & Jiménez, A. (2016). Active edible films: Current state and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2).
- Miescher, S., Stierli, M. P., Teuber, M., & Meile, L. (2000). Propionicin SM1, a Bacteriocin from *Propionibacterium jensenii* DF1: Isolation and Characterization of the Protein and its Gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 23(2), 174-184. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(00\)80002-8](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80002-8)
- Mohseni, S., Ghavidel, R. A., & Asl, A. F. A. (2014). Shelf life extension of fresh-cut apples using whey protein concentrate, soy protein isolate, carrageenan and alginate films. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 5(4), 60–67.
- Morales, H., Laura, A., Canchola, M., & Guivini, M. (2017). *Estudio del efecto de películas comestibles de gelatina y proteína de suero de leche en frutos*. Recuperado de <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/23711>

- Naghmouchi, K., Drider, D., Kheadr, E., Lacroix, C., Prevost, H., & Fliss, I. (2006). Multiple characterizations of *Listeria monocytogenes* sensitive and insensitive variants to divergicin M35, a new pediocin-like bacteriocin. *Journal of Applied Microbiology*, *100*(1), 29-39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02771.x>
- Navarro-Contreras, A. L., Chaires-González, C. F., Rosas-Burgos, E. C., Borboa-Flores, J., Wong-Corral, F. J., Cortez-Rocha, M. O., & Cinco-Moroyoqui, F. J. (2014). Comparison of protein and starch content of substituted and complete triticales (X *Triticosecale* Wittmack): Contribution to functional properties. *International journal of food properties*, *17*(2), 421–432.
- Nereyda, E. (2011). *USO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NATURALES EN LA CONSERVACIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS*. *7*, 19.
- Ollé Resa, C. P., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2016). Starch edible film supporting natamycin and nisin for improving microbiological stability of refrigerated argentinian Port Salut cheese. *Food Control*, *59*, 737-742. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.056>
- Olvera-García, M. (2015). *Detección de Proteínas con Actividad Antibacteriana Producidas por Bacterias Ácido Lácticas*. *19*(1), 20.
- Oregel-Zamudio, E., Aguilar, C. N., Oyoque-Salcedo, G., Angoa-Pérez, M. V., & Mena-Violante, H. G. (2016). CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE PELÍCULAS COMESTIBLES A BASE DE CERA DE CANDELILLA. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, *17*(1).
- Özogul, F., & Hamed, I. (2018). The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *58*(10), 1660–1670.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *50*(3), 512-542. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000300018>
- Patrovský, M., Kouřimská, L., Havlíková, Š., Marková, J., Pechar, R., & Rada, V. (2016). Utilization of bacteriocin-producing bacteria in dairy products. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđdjenje proizvodnje i prerade mlijeka*, *66*(3), 215–224.

- Peña Serna, C. (2015). *Desenvolvimento de filmes biodegradáveis à base de zeína, caracterização das propriedades funcionais e estruturais e avaliação do uso como cobertura na conservação das características físico-químicas do queijo Minas padrão.*
- Pereda, M., Ponce, A. G., Marcovich, N. E., Ruseckaite, R. A., & Martucci, J. F. (2011). Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1372–1381.
- Pereda, Mariana, Marcovich, N. E., & Mosiewicki, M. A. (2015). Sodium caseinate films containing linseed oil resin as oily modifier. *Food Hydrocolloids*, 44, 407-415. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.016>
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>
- Pingitore, E. V., Salvucci, E., Sesma, F., & Nader-Macias, M. E. (2007). Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB). *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, 1, 557–568.
- Prodpran, T., Nagarajan, M., & Benjakul, S. (2016). Films and Coatings from Collagen and Gelatin. En *Edible Films and Coatings* (pp. 121–142). CRC Press.
- Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., & Girbés, T. (2014). Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, 05, 1765. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.518190>
- Rakha, A., Aman, P., & Andersson, R. (2011). Dietary fiber in triticale grain: Variation in content, composition, and molecular weight distribution of extractable components. *Journal of cereal science*, 54(3), 324–331.
- Rakha, A., Aman, P., & Andersson, R. (2013). Rheological characterisation of aqueous extracts of triticale grains and its relation to dietary fibre characteristics. *Journal of cereal science*, 57(2), 230–236.
- Ramírez, J. C. R., Ulloa, P. R., & Velázquez, M. Y. (2011). *Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud.* (7), 16.

- Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., & Garrigós, M. C. (2012). Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering*, *109*(3), 513–519.
- Ramos, Ó. L., Reinas, I., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Cerqueira, M. A., Pereira, R. N., ... Malcata, F. X. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocolloids*, *30*(1), 110-122. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.001>
- Resa, C. P. O., Gerschenson, L. N., & Jagus, R. J. (2014). Natamycin and nisin supported on starch edible films for controlling mixed culture growth on model systems and Port Salut cheese. *Food Control*, *44*, 146–151.
- Reyes-Avalos, M. C., Minjares-Fuentes, R., Esparza-Rivera, J. R., Contreras-Esquivel, J. C., Sáenz, M., César, J., & Meza-Velázquez, J. A. (2017). Calidad de melón cantaloupe (*Cucumis melo*) cubierto con una película comestible de alginato-hpmc-parafina. *Nova scientia*, *9*(18), 222-238. <https://doi.org/10.21640/ns.v9i18.797>
- Rhim, J.-W., Park, H.-M., & Ha, C.-S. (2013). Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, *38*(10-11), 1629-1652. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.008>
- Ribotta, P. D., & Tadini, C. C. (2009). *Alternativas tecnológicas para la elaboración y la conservación de productos panificados*. Córdoba (Argentina): Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
- Rodriguez-Marín, M. L., Bello-Perez, L. A., Yee-Madeira, H., & González-Soto, R. A. (2013). Propiedades mecánicas y de barrera de películas elaboradas con harina de arroz y plátano reforzadas con nanopartículas: Estudio con superficie de respuesta. *Revista mexicana de ingeniería química*, *12*(1), 165-176.
- Romero, V., Borneo, R., Passalacqua, N., & Aguirre, A. (2016). Biodegradable films obtained from triticale (x Triticosecale Wittmack) flour activated with natamycin for cheese packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, *10*, 54–59.
- Rubio-Anaya, M. (2012). *Polímeros utilizados para la elaboración de películas biodegradables*. 9.

- Ruiz, M. J., Colello, R., Padola, N. L., & Etcheverría, A. I. (2017). Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 174-177. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.005>
- Salvucci, E., LeBlanc, J. G., & Pérez, G. (2016). Technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. *LWT-Food Science and Technology*, 70, 185–191.
- Salvucci, E., Saavedra, L., Hebert, E. M., Haro, C., & Sesma, F. (2012). Enterocin CRL35 inhibits *Listeria monocytogenes* in a murine model. *Foodborne pathogens and disease*, 9(1), 68–74.
- Sánchez-González, L., Saavedra, J. I. Q., & Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 92–98.
- Santos, J. C., Sousa, R. C., Otoni, C. G., Moraes, A. R., Souza, V. G., Medeiros, E. A., ... Soares, N. F. (2018). Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.
- Sanyang, M. L., Sapuan, S. M., Jawaid, M., Ishak, M. R., & Sahari, J. (2016). Effect of plasticizer type and concentration on physical properties of biodegradable films based on sugar palm (*Arenga pinnata*) starch for food packaging. *Journal of food science and technology*, 53(1), 326–336.
- Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai: revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible*, 7(1), 153–170.
- SERRALLÉ, M. J. (2015). *Encapsulación en liposomas de aceites esenciales para mejorar su retención en la elaboración de films de quitosano*.
- Settanni, L., & Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 123-138. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.001>
- Silva, C. C., Silva, S. P., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in microbiology*, 9, 594.
- Silva, M. M., & Lidon, F. (2016). FOOD PRESERVATIVES – AN OVERVIEW ON APPLICATIONS AND SIDE EFFECTS. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 366-373. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-04-351>

- Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S., & Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, *41*(8), 781-785. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.04.007>
- Sloan, E. (2017). *Consumers Are Thirsty for New Beverage Options*. INST FOOD TECHNOLOGISTS 525 WEST VAN BUREN, STE 1000, CHICAGO, IL 60607-3814 USA.
- Sobrino-López, A., & Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, *18*(4), 329-343. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.009>
- Souza, E. L. de, Silva, C. A. da, & Sousa, C. P. de. (2005). Bacteriocins: molecules of fundamental impact on the microbial ecology and potential food biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *48*(4), 559-566. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000500008>
- Šuput, D., Lazić, V., Popović, S., Hromiš, N., & Bulut, S. (2017). Biopolymer films synthesis and characterisation. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, *21*(1), 9–12.
- Swe, P. M., Heng, N. C., Cook, G. M., Tagg, J. R., & Jack, R. W. (2010). Identification of DysI, the immunity factor of the streptococcal bacteriocin dysgalactin. *Applied and environmental microbiology*, *76*(23), 7885–7889.
- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, *14*(3), 71–78.
- Todorov, Svetoslav D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action: produção, organização genética e modo de ação. *Brazilian Journal of Microbiology*, *40*(2), 209-221. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000200001>
- Todorov, Svetoslav D. (2019). Chapter 8 - What Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria Do in the Milk? En L. A. Nero & A. F. De Carvalho (Eds.), *Raw Milk* (pp. 149-174). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810530-6.00008-0>
- Todorov, Svetoslav Dimitrov, 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.
- Valle-Guadarrama, S., López-Rivera, O., Reyes-Vigil, M., Castillo-Merino, J., & Santos-Moreno, A. (2008). Recubrimiento comestible basado en goma arábica y carboximetilcelulosa para conservar

- frutas en atmósfera modificada. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XIV.  
<https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2005.11.051>
- Vieira, M. G. A., da Silva, M. A., dos Santos, L. O., & Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47(3), 254-263.  
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>
- Villada, H. S., Acosta, H., & Velasco, R. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas Agrarios*, 12(2), 5-19. <https://doi.org/10.21897/rta.v12i2.652>
- 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 science*, 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.
- Yang, S.-C., Lin, C.-H., Sung, C. T., & Fang, J.-Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 5.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241>
- Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>
- Zactiti, E. M., & Kieckbusch, T. G. (2006). Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 462–467.
- Zhu, F. (2017). Triticale: Nutritional composition and food uses. *Food Chemistry*.
- Zubeldía, F., Ansorena, M. R., & Marcovich, N. E. (2015). Wheat gluten films obtained by compression molding. *Polymer Testing*, 43, 68–77.

## 6. ANEXOS

*Anexo I: resumen del trabajo presentado en el “IV Jornadas de Difusión de Investigación y Extensión en Ingeniería Química” y “II Jornadas ICTA” el día 06 de Noviembre de 2015, Córdoba, Argentina.*

### **Desarrollo de películas biodegradables con actividad antimicrobiana por la incorporación de BLIS**

Salvucci E.<sup>1,2</sup>, Rossi M.<sup>1</sup>, Pérez G.<sup>1,3</sup>, Borneo R.<sup>1,2</sup>, Aguirre A.<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>ICYTAC-CONICET-UNC;<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC;<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC

\* [alicia.aguirre@unc.edu.ar](mailto:alicia.aguirre@unc.edu.ar)

Los envases activos además de funcionar como barreras físicas producen cambios positivos en el alimento almacenado, aportando mejoras y alargando su vida útil. Las bacteriocinas o las moléculas BLIS (del inglés, Sustancia tipo bacteriocina, cuando aún no se ha caracterizado su secuencia peptídica) producidas por bacterias lácticas tienen un lugar especial en la investigación ya que, dado su carácter seguro, es posible una aplicación de las mismas en la industria de alimentos. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar películas activas a partir de harina de triticale por el agregado de sustancia tipo bacteriocina y evaluar las propiedades mecánicas, ópticas y la actividad antimicrobiana *in vitro* de las mismas. Se trabajó con la cepa *Enterococcus spp.* ES216 aislada de avena. Se evaluó su actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas indicadoras (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua* ATCC3090). Se determinó que la cepa productora produce una sustancia tipo bacteriocina termoestable, sensible a proteasas con actividad antimicrobiana sobre *Listeria*. Se obtuvo un sobrenadante libre de células (SLC) de la célula productora, se determinó actividad calculando las unidades arbitrarias de actividad (UA) mediante el método de dilución seriada y *spot-on-lawn*. Se realizó un extracto de la BLIS mediante precipitación con sulfato de amonio y posterior pasaje en una columna C18 (E). La actividad antimicrobiana del SLC fue de 2048

UA/mL en tanto que en E fue de 512 UA/mL. Ambos fueron utilizados para realizar películas bioactivas. Las películas de harina de triticales se elaboraron según la técnica de evaporación de solvente. Se prepararon películas control y activas con bacteriocina. La propiedad mecánica fuerza de punción en la ruptura se midió con texturómetro Instron, la opacidad de las películas se determinó con espectrofotómetro como Abs500/espesor y la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar. Los resultados se trataron estadísticamente mediante análisis de varianza y los resultados fueron comparados por el Student's *t*-test a nivel de significación de  $p < 0,05$ . La fuerza de punción no fue afectada significativamente por la incorporación de bacteriocina a las películas de harina de triticales. Las películas mostraron un aumento de la opacidad con la incorporación de bacteriocina dependiente de su concentración. La película control no inhibió el crecimiento de *Listeria* pero si lo hicieron las películas activadas. Se observó que el halo de inhibición fue mayor en las películas elaboradas con bacteriocina purificada (E), siendo el valor del mismo proporcional a la concentración, con halos de difusión de hasta 3,59 mm de radio para una concentración de 2%.

Palabras Clave: películas bioactivas, triticales, bacteriocina, *Listeria*

**Anexo II: resumen del trabajo presentado en el “VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos” en los días 02, 03 y 04 de Noviembre de 2016 en CICYTAC, Córdoba, Argentina.**

## **Caracterización de películas de harina de triticale con actividad antimicrobiana por la incorporación de BLIS**

Rossi M.<sup>1</sup>, Salvucci E.<sup>1,2</sup>, Colombo, A.<sup>2</sup>, Pérez G.<sup>1,3</sup>, Borneo R.<sup>1,2</sup>, Aguirre A.<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>ICYTAC-CONICET-UNC;<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC;<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Córdoba, Argentina

\* [alicia.aguirre@unc.edu.ar](mailto:alicia.aguirre@unc.edu.ar)

Los envases activos son aquellos que actúan como barreras físicas y también producen cambios positivos en el alimento almacenado, aportando mejoras y alargando su vida útil. Las bacteriocinas o moléculas BLIS son producidas por bacterias lácticas y tienen un lugar especial en la investigación ya que, dado su carácter seguro, es posible la aplicación de las mismas en la industria de alimentos. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar películas activas a partir de harina de triticale (*x Triticosecale* Wittmack) por el agregado de sustancia tipo bacteriocina (BLIS) y evaluar sus propiedades de barrera, mecánicas y ópticas y medir la actividad antimicrobiana *in vitro* de las mismas. Se trabajó con la cepa *Enterococcus spp.* ES216 aislada de avena. Se evaluó su actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas indicadoras (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria innocua* ATCC3090). Se determinó que la cepa productora produce una sustancia tipo bacteriocina termoestable, sensible a proteasas con actividad antimicrobiana sobre *Listeria*. Se trabajó con dos fracciones activas: un sobrenadante libre de células (SLC) de la célula productora y un extracto (E) obtenido mediante precipitación con sulfato de amonio y posterior pasaje en una columna C18. Se determinó actividad inhibitoria calculando las unidades arbitrarias de actividad (UA) mediante el método de dilución seriada y *spot-on-lawn*. Las películas se elaboraron según la técnica de evaporación de solvente. Se prepararon películas control y activadas por la incorporación de fracciones activas a distintas concentraciones (1% y 2%) y se midieron sus propiedades. La fuerza de punción en la ruptura se midió con texturómetro Instron, la opacidad de las películas se determinó con espectrofotómetro (Abs500/espesor) y la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar. Los resultados se trataron estadísticamente mediante análisis de varianza y los resultados fueron comparados por el Student's *t*-test a nivel de significación de  $p < 0,05$ . Los resultados mostraron que la actividad antimicrobiana del SLC fue de 2048 UA/mL, en tanto que en E fue de 512 UA/mL. La incorporación de las fracciones activas no afectó significativamente la permeabilidad al vapor de agua ni la

fuerza de punción de las películas de triticale. Las películas mostraron un aumento de la opacidad con la incorporación de bacteriocina dependiente de su concentración. La película control no inhibió el crecimiento de *Listeria* pero si lo hicieron las películas activadas. Se observó que el halo de inhibición fue mayor en las películas elaboradas con bacteriocina purificada (E), siendo el valor del mismo proporcional a la concentración. En conclusión, la adición de BLIS a películas de harina de triticale permite obtener un material con propiedades apropiadas para ser utilizadas como empaque de alimentos, siendo necesario posteriormente un estudio de su efectividad como envase activo sobre productos específicos.

Palabras Clave: películas bioactivas, triticale, bacteriocina, *Listeria*

# Anexo III: Triticale flour films added with bacteriocin-like substance (BLIS) for active food packaging applications

ARTICLE IN PRESS

Food Packaging and Shelf Life 22 (2018) 212–222



Contents lists available at ScienceDirect

Food Packaging and Shelf Life

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jfpal](http://www.elsevier.com/locate/jfpal)



## Triticale flour films added with bacteriocin-like substance (BLIS) for active food packaging applications

Emiliano Salvucci<sup>b</sup>, Mariana Rossi<sup>a</sup>, Andrés Colombo<sup>a</sup>, Gabriela Pérez<sup>b,c</sup>, Rafael Borneo<sup>a,b</sup>, Alicia Aguirre<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Cátedra de Química Aplicada, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sarsfield 1600, 5000, Córdoba, Argentina

<sup>b</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (ICTAC-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba), Juan Willy Ory 3400, Córdoba, Argentina

<sup>c</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Cátedra de Química Biológica, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Valparaiso 474, 5000, Córdoba, Argentina

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Triticale flour film  
Active packaging  
Bacteriocin  
Food conservation

### ABSTRACT

Active triticale flour films were obtained by adding bacteriocin-like substance (BLIS) produced by *Enterococcus faecium* E5216 with antimicrobial activity against *Listeria innocua* ATCC33090. Active and control films were characterized. The incorporation of the active fractions did not significantly affect the density, moisture content, water vapor permeability and puncture strength of film. Solubility, color and opacity were dependent on the fraction incorporated into the films. Activated films maintain the antimicrobial activity until 45 days of evaluation. Also, active and control triticale film were used to obtain base-coated pouches to package inoculated cheese slices under controlled conditions. Active triticale packaging could reduce the counts of *Listeria* in 3 log comparing to control after 15 days of storage. These results suggest that triticale flour films activated with this BLIS could provide an alternative strategy for active food packaging applications.

### 1. Introduction

Nowadays, there is a growing demand for high quality, minimally processed and safety food products. This situation in a context of current food production and trade represents a major challenge for food safety and quality. Foodborne illness, chemicals in foods and sustainability are the top consumer food safety issues (Sloan, 2017). Most of the microorganisms can cause undesirable reactions that deteriorate flavor, odor, color, sensory, and nutritional properties of food and some of them can potentially cause foodborne diseases. Thus, it is important to develop active packages designed not only to contain and protect food, but also to keep food safe and secure, retain food quality and freshness and maintain or extend the product quality and shelf life (Bajz, Kavishankar, Mohan, & Srinivasa Gupta, 2015).

Bacteriocins are short, cationic, amphiphilic, ribosomally synthesized peptides produced by bacteria. They exert bacteriostatic or bactericidal effects by various mechanisms including inhibition of cell wall synthesis, permeabilization of the target cell membrane or inhibition of RNase or DNase activity (Bull, Penrose, Hara, & Kennedy, 2014). Bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria (LAB) have a great potential for industrial or medicinal applications due to the GRAS status (Generally Recognized as Safe) of LAB.

The interest in application of natural metabolites like bacteriocins in the prevention of food spoilage and the extension of food shelf life has increased during the last decade (Bull et al., 2014). One group of bacteriocins has special interest since their antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*. This pathogen has been associated with many types of foods including milk and dairy products, cooked and ready-to-eat meat, poultry, seafood, vegetables, and fruits (Martinez et al., 2015). Dairy products are the leading source of listeriosis outbreaks and became a major concern to the dairy industry and public health. Listeriosis is a high mortality infection associated with the ingestion of contaminated food. Bacteriocins particularly synthesized by the genus *Enterococcus* are called enterocins and they have shown antibacterial activity (Salvucci, Saravada, Helbert, Hara, & Serna, 2012). Previous studies in our lab had demonstrated that *Enterococcus faecium* E5216 isolated from oat produces antimicrobial peptides with an antagonistic effect against Lactic Acid Bacteria and *Listeria* (Salvucci, Leblanc, & Nuez, 2016). Active packaging with antimicrobial action by the inclusion bacteriocins and other antimicrobials is a necessary field of research and technology development (Silaco Mazalet, Botana, Hornberg, & Vignolo, 2013).

Food packaging research has focused on biodegradable and/or edible films made from natural polymers (Araoz, De Joux, Takiz, &

\* Corresponding author at: Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Cátedra de Química Aplicada, Universidad Nacional de Córdoba, Av. Vélez Sarsfield 1600, 5000, Córdoba, Argentina.

E-mail address: [alicia.aguirre@conicet.gov.ar](mailto:alicia.aguirre@conicet.gov.ar) (A. Aguirre).

<https://doi.org/10.1016/j.jfpal.2018.05.007>

Received 29 November 2017; Received in revised form 25 April 2018; Accepted 30 May 2018  
2214-2894/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article as: Salvucci, E., Food Packaging and Shelf Life (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jfpal.2018.05.007>

Chirak, 2010). A particular interest has been focused on the use of triticale to prepare films. Triticale (x *Triticosecale* Wittmack) is the hybrid between wheat (*Triticum* sp.) and rye (*Secale* sp.). As an advantage, triticale combines the high yield potential from wheat and the tolerance of disease and environmental factors from rye. The world production of triticale has kept growing during the last years (Zhu, 2010). Although there is an insufficient demand for its use as foodstuff, this cereal may be suitable for animal food, forage, energy, bioethanol production and film formation (Aguirre, Soriano, & León, 2011; Marović et al., 2014; Pejin et al., 2009; Zhu, 2010). Films produced from triticale flour exhibited properties comparable to those of other films made from the flour of other species. Triticale films have better mechanical properties (tensile strength) than amaranth films, similar to the blue corn flour, and lower elongation values than banana, rice quinoa and achira flour films. Triticale flour films also present excellent water vapor barrier, with lower water vapor permeability values than banana, amaranth and achira flour films. The functional properties of triticale flour films maintained adequate values during storage, especially until 45 days of storage, providing adequate optical, barrier, and mechanical properties for renewable and biodegradable material, highlighting the potential of these films for food packaging applications (Soriano, Aiba, & Aguirre, 2016).

Since the market for minimally processed food is broadening, packaging is being employed as part of the strategies that contribute to the food preservation. In addition, considering the trend by which consumers try to avoid plastics by limiting intake of food stored in plastic and the demand for natural antimicrobial compounds, there is an increasing interest in the development of new food packaging materials. In this context, the use of biopolymers derived from agriculture products appears as an interesting alternative. Triticale films can be a suitable matrix to incorporate bacteriocins. Although extensive information on active films incorporated with antimicrobials is available in the literature, scarce data exist of the activity of bacteriocin-like substances (BLS) when incorporated in films, and essentially no data at all encompassing incorporation of BLS in triticale flour films. The purpose of this study was to develop an innovative material for active food packaging by incorporating bacteriocin-like substances (BLS) produced by *E. faecium* ES216 into triticale flour films. The effects of this incorporation on the physicochemical, optical, barrier and mechanical properties of films were analyzed. In addition, antimicrobial activity against foodborne microorganism *Listeria* of bioactive films and their efficacy on a food model during storage was also evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strain and growth conditions

All bacterial stock cultures were maintained in their appropriate broths containing 20% glycerol at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . *Stenococcus faecium* ES216 was grown in Man Rogosa Sharpe (MRS) broth at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . *Listeria innocua* ATCC33,090 was used as indicator strain and as contaminant in food assays. It was grown in Brain Heart Infusion (BHI) broth and *Listeria* Selective agar Oxford at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . For serratid agar, 0.7% of agar was added to broth. For agarized media 1.5% agar was added to broth.

### 2.2. Cell free supernatant and bacteriocin extract

The producer strain *E. faecium* ES216 was grown in MRS at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  until stationary phase. The culture was centrifuged 10,000 rpm, 10 min. Supernatant was kept and then filtered by a  $0.2\text{ }\mu\text{m}$  pore filter. This cell free supernatant (CFS) was used in active film production.

A semi purified bacteriocin extract (E) from *E. faecium* ES216 was obtained by ammonium sulfate precipitation of a 16 h culture supernatant, resuspended in minimum volume of sterile water (2 mL) and passed through a G-18 solid phase extraction cartridge, as earlier reported (Vera-Pingitore, Salvucci, Soriano, & Nader-Macias, 2007).

For antimicrobial activity determination, the spot-on-lawn assay on a double layer agar against *L. innocua* ATCC33090 (bacteriocin sensitive) was performed. Serratid BHI agar (0.7% agar) was seeded with a 1% (v/v) stationary phase culture of the indicator strain (top agar) and pour onto plates pre-poured with BHI agar 1.5% (bottom agar). Serial dilutions (2:1) of the CFS and the bacteriocin extract (E) were performed. 10  $\mu\text{L}$  of each dilution were spotted onto the overlay. The inhibitory activity after incubation at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 16 h was determined. The antimicrobial activity of the supernatant was expressed as arbitrary units per mL (AU/mL). This value was obtained as the reciprocal of the highest dilution capable of producing a clear inhibition zone ( $\geq 5\text{ mm}$ ) of the indicator strain.

### 2.3. Film preparation

Triticale (variety Buck TK 205) flour (moisture content,  $13.25 \pm 0.02\text{ g } 100\text{ g}^{-1}$ , protein content,  $8.80 \pm 0.02\text{ g } 100\text{ g}^{-1}$ , ash content,  $0.61 \pm 0.02\text{ g } 100\text{ g}^{-1}$ , particle size: pass through a US Standard Sieve No. 100) was used. Film-forming solutions were obtained by dispersion of triticale flour (4.0 g/100 mL water) for 15 min. The pH was adjusted to 10.7 with 1 N NaOH. Glycerol (Cicorel, Argentina, 30 g/100 g flour), used as plasticizer, was added and the resulting dispersion was then magnetically stirred for 15 min at  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Control (without BLS) and active films were prepared. Films based on film forming solution (triticale flour, solvent (water) and glycerol) were prepared as control. In the case of active triticale flour films, the antimicrobials (CFS and E) were added at different concentrations to the film forming solution (FFS) for obtaining different final concentrations: CFS: 1% v/v (1 mL CFS/100 mL solution), E1: 1% v/v (1 mL E/100 mL solution) and E2: 2% v/v (2 mL E/100 mL solution). Films were prepared by using the casting technique. Measured volumes (2.0 mL) of the film forming solution were poured onto a horizontal flat silicon tray (20 cm diameter). Films were dried at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  in an oven with air circulation. Dry films were peeled off the casting surface and preconditioned prior to the characterization in an environmental chamber at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  and 52% relative humidity (Fig. 1A). The thickness of the films was determined with a micrometer Schwyz SCL. The average value of six thickness measurements at different locations on each film sample was used in all calculations. Aged triticale flour films were stored for 45 days at room temperature, 52% relative humidity, and different properties were determined as a function of time.

### 2.4. Film properties

The functional properties of the triticale flour film formulated with BLS were periodically determined and compared with a control film without bacteriocins.

#### 2.4.1. Antimicrobial activity of the active films

The antimicrobial activity of the films was determined by placing 2.0 cm-diameter punched circles of each film (control and active) directly onto the serratid agar plates seeded with 1% (v/v) stationary phase culture of the indicator strain *Listeria innocua* ATCC33090. Films were incubated at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h. The antimicrobial activity, revealed as a zone of growth inhibition of the indicator strain beneath and around the film, was measured with Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) according to Abarca et al., Magalhäes and Iam (2014).

#### 2.4.2. Density, moisture content and film solubility

The film density ( $\rho$ ) was calculated directly from the film weight and dimensions according to:

$$\rho (\text{g cm}^{-3}) = m/(A \cdot \delta) \quad (1)$$

Where  $A$  is the film area ( $\text{cm}^2$ ),  $\delta$  the film thickness (cm),  $m$  the mass (g). The film density was expressed as the average of three independent



Fig. 1. A. Triflake flour film. B. Cheese slices in triflake film pouches.

#### determinations

Moisture content (MC) and solubility in water (S) of control and activated triflake flour films were determined according to *Romero, Romero, Pantoja-Capoa, and Aguirre, 2016*. Triplicate measurements of MC and S were conducted for each type of film and an average was taken as the result.

#### 2.4.3. Mechanical properties: Puncture strength

Puncture strength was measured using a texture analyzer Instron Textrometer. The films were fixed on a still flat surface with a 10 mm diameter hole and perforated with a F/2.N probe (needle probe), moving at 1 mm/s until the needle pass through the film. The PS was calculated by dividing maximum force by the cross-sectional area of the distribution efforts (thickness  $\times$  diameter of the opening of film holder, mm<sup>2</sup>). All determinations were made five times. Mean and standard deviation were calculated.

The experimental values obtained for PS were fitted using the following model:

$$\text{Polynomial model: } PS = ax^2 + bx + c \quad (2)$$

Where  $x$  is the storage time (days). This model was chosen based on the results of *Romero et al. (2016)*. They fitted experimental values of puncture test of starch triflake flour films using several models (polynomial, linear and exponential models). The coefficients of determination of the models ( $R^2$ ) showed how much of the variability of the data is explained by the model. The polynomial model explained better (than the other models) the variability of puncture test with higher  $R^2$  values. Excel was used to fit data to the model.

#### 2.4.4. Color evaluation

Measurements of color were performed on white background with a Minolta colorimeter (Minolta CM-500d, Tokyo, Japan). The CIE Lab parameters ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ) were measured in at least five positions randomly selected for each sample. Color parameters range from  $L^* = 0$  (black) to  $L^* = 100$  (white),  $-a^*$  (greenness) to  $+a^*$  (redness) and  $-b^*$  (blueness) to  $+b^*$  (yellowness). Film's color was measured on the surface of a standard plate and total color difference ( $\Delta E$ ) was calculated using the following equation:

$$\Delta E = \left[ (L^*_{standard} - L^*_{sample})^2 + (a^*_{standard} - a^*_{sample})^2 + (b^*_{standard} - b^*_{sample})^2 \right]^{1/2} \quad (3)$$

Values were expressed as the means of five measurements on different areas of each film.

#### 2.4.5. Spectropic measurements and opacity

The opacity of the film was calculated by dividing the value of absorbance at 500 nm by the film's thickness (mm) based on the method described by (*Schwarzen, Eisenberg, & Meaurio, 2014*). The absorbance was measured using a Jasco V-730 Spectrophotometer. Each film specimen was cut into a rectangular piece and placed directly in a spectrophotometer cell, and measurements were performed with air as the reference. All determinations were performed in triplicate.

#### 2.4.6. Water vapor permeability (WVP)

WVP was measured gravimetrically according to the method reported by *Aguirre et al. (2011)*. Each film sample was sealed over a circular permeation cup containing silica gel (desiccant at relative humidity (RH) of 0%). The environment within the cabinet was held at 52% RH and controlled temperature (25 °C). The RH inside the cell was always lower than the outside, and water vapor transport was determined from the weight gain of the permeation cell. Cups were periodically weighed and water vapor transfer rates (WVTR,  $g\ m^{-2}\ s^{-1}$ ) of films were determined from the slope of weight gain versus time plots using  $WVTR = (\Delta m\ A^{-1}\ \Delta t^{-1})$ , where  $\Delta m$  is weight gain of permeation cell (g),  $A$  is the exposed area and  $\Delta t$  is time. Water vapor permeability (WVP,  $g\ m^{-1}\ s^{-1}\ Pa^{-1}$ ) was calculated using the following equation:

$$WVP = (WVTR\ X) / \Delta P \quad (4)$$

Where  $X$  is film thickness and  $\Delta P$  is vapor partial pressure difference (Pa) across the film.

#### 2.5. Food assays

White semi-firm cheese (moisture content 43%,  $a_w$  0.95, pH 5.2, Na 0.40%, fat content 22%), purchased from local market, was chosen as a food model. Slices (0.3 cm  $\times$  3 cm  $\times$  10 cm) of cheese were cut and inoculated with *L. innocua* at a level of  $5.5 \times 10^8$  CFU/g by spreading 1 ml of suitable dilute suspensions on the surface. For pouches preparation, two rectangles of films of 12 cm  $\times$  9 cm were cut and sealed by heat on three sides. The slices of cheese were placed on active film pouches and sealed completely. A film without bacteriocin was used as a control pouch. Pouches containing the cheese slices were stored at 7 °C for 15 days. Samples of cheese were taken at 0, 3, 5, 10 and 15 days of storage and used for microbiological analysis.

#### 2.6. Microbiological analysis

Cheese slices were aseptically transferred to NaCl 0.9% and homogenized for 2 min. Number of viable cells were determined. Serial

diffusion of the homogenized samples (1:1.0) in peptone water were spread on *Listeria* Selective agar Oxford. Agar plates were aseptically incubated at 30 °C for 48 h. Colonies were counted and expressed as CFU/g.

### 2.7. Statistical analysis

Density, moisture content, water activity and water permeability were determined in triplicate while mechanical properties were performed five times. Analysis of variance (ANOVA) was carried out to test mean differences and Fisher LSD multiple comparison test was used to find out which means were statistically and significantly different ( $\alpha = 0.05$ ). Statistical data were performed using the Infostat statistical software version 2016 (Di Rienzo et al., 2016).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Antimicrobial activity of films

Cell free supernatant (CFS) of *K. fauconii* ES216 has shown an antimicrobial activity of 1024 AU/ml against *Listeria innocua* ATCC33090. This CFS was submitted to bacteriocin purification. The semi-purified bacteriocin (E) has shown an antimicrobial activity of 512 AU/ml. During semi-purification, it was observed a decrease in AU. Even when this lower activity is predictable and it is widely observed, the level of decrease is not as drastic as was reported for other bacteriocins (Todorov, Vaz-Velho, & Gibbs, 2004). Normally, this lower total activity is accompanied by a lower content of protein and this result in a better specific activity (Sarboza et al., 2014). It could also be possible that the bacteriocin produced is a chain 16, those composed by two peptides required for full antimicrobial action, their structural differences could result in differences in elution (Vera-Figueroa et al., 2007). Moreover, other possibility to take into account is the production of more than one peptide with different physicochemical properties that result in differential elution during purification with the consequent low inhibitory power in the extract (Henning, Gerten, & Mariani, 2015).

CFS and E were added to the film forming solutions for obtaining different final concentrations in activated films: CFS (1 ml CFS/100 ml solution, 45 AU/dm<sup>2</sup> film), E1 (1 ml E/100 ml solution, 22.5 AU/dm<sup>2</sup> film) and E2 (2 ml E/100 ml solution, 45 AU/dm<sup>2</sup> film). The antimicrobial activity of the different films (control and activated) was analyzed through the agar diffusion method. As expected, no inhibition zones for control films were observed. On the other hand, *L. innocua* ATCC33090 was clearly inhibited by the films prepared with CFS and E (Table 1). The purification step of bacteriocins results in a lower content of proteins and other components from the culture media and it seems that the release of more purified bacteriocin (E) allow a better action on *L. innocua*. The addition of CFS to triticale films exerted a lower inhibitory effect.

**Table 1**  
Antimicrobial activity of triticale flour films without BLES (control) and containing cell free supernatant (CFS) and semipurified bacteriocin extract (E1 and E2), expressed as inhibition zone (mm).

Storage time (days)	Inhibition zone			
	Control film	CFS film	E1 film	E2 film
0	0	6.1 <sup>ab</sup> ± 0.4	6.2 <sup>ab</sup> ± 0.4	6.0 <sup>ab</sup> ± 0.7
5	0	6.4 <sup>ab</sup> ± 0.2	6.7 <sup>ab</sup> ± 0.3	6.1 <sup>ab</sup> ± 0.2
30	0	5.9 <sup>ab</sup> ± 0.3	6.5 <sup>ab</sup> ± 0.2	7.3 <sup>ab</sup> ± 0.3
45	0	5.8 <sup>ab</sup> ± 0.3	5.8 <sup>ab</sup> ± 0.3	6.6 <sup>ab</sup> ± 0.3

Reported values are means (n = 3) ± standard deviation. Different lowercase letters as superscript in a column indicate significant differences (p < 0.05). Different capital letters in the same row indicate significant differences (p < 0.05).

Active packages are designed to not only contain and protect food, but also to keep food safe and secure. To fulfil this aim, active packages should maintain their antimicrobial properties over time at least in accordance with the shelf life of the products. We established an evaluation period of 45 days. The effect of ageing on films was assayed. Triticale flour films could act as suitable matrix to support the active compounds, maintaining an antimicrobial activity during storage time, as is shown in Table 1. This means that at least until 45 days there is a sufficient release of bacteriocin with bactericide effect.

The antimicrobial stability observed in this work was earlier reported for bacteriocins using different matrices (Santago-Silva et al., 2008). This permanence of the effect observed in our work is better than other bioactive films reported using bacteriocins extracts. Blanco Mazzoni et al. (2013) observed a slight decrease in anti-*Listeria* activity in the same period using wheat gluten as matrix. Reduced antimicrobial activity was reported in films with skin using hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) as support (Sobó, Ham-Pichavant, & Corra, 2002). Also, mice shown a decrease in activity after the first week in a similar assay (Scammell et al., 2000). In pea protein films used as support for bacteriocin producer strains, the maximum bacteriocin production occurs at 15 storage days and afterwards decreases (Sánchez-González, Quintanar-Suavedra, & Chiniát, 2013).

### 3.2. Film characterization

Biodegradable films must possess adequate properties to maintain durability and integrity and withstand the external stresses that prevail during food processing, handling and storage. The functional properties of the formulated triticale flour films with bacteriocins during 45 days of storage were periodically determined and compared with a control film without bacteriocins.

The properties of control and active films (formulated with BLES: CFS, E1 and E2) at time 0 were compared. Results are shown in Table 2. Incorporation of BLES into triticale flour films did not significantly (p > 0.05) affect the density, moisture content (MC), water vapor permeability (WVP) and puncture strength (PS) values relative to control films. Blanco Mazzoni et al. (2013) observed similar results in wheat gluten films. The authors also reported that initially the mechanical properties of control and activated wheat gluten (WG) films were significantly different (tensile strength 2.0 and 2.7 MPa; elongation at break 201% and 190%, respectively, for the control and active films). Beristain-Suarez, Martínez-López, Fábra, and López-Malo, 2016 reported losses of puncture strength when cell-free supernatant was incorporated to whey protein tablets and calcium caseinate films. On the other hand, the mechanical properties and water vapor permeability of gelatin films were not affected by the addition of bacteriocins (Jha et al., 2015).

When CFS and E were incorporated in triticale films a statistically significant increase (p < 0.05) of an lability was attained with regard to the control film. Solubility is an important feature in determining the water resistance of films. The higher values of solubility in water observed when bacteriocins were added to triticale flour films in comparison to control film (Table 2) might indicate that those compounds interfere significantly with the polymeric network of triticale flour films. A similar trend was observed for whey protein and calcium caseinate films added with cell free supernatants of *Lactobacillus rhamnosus* (Beristain-Suarez et al., 2016). This behavior may be desirable, thus the bacteriocins could migrate when films are partially solubilized. The antimicrobial activity of the active film not only depended on the concentration of CFS and E but also it depends on the migration capacity of the bacteriocins.

Color is an important decision factor in the consumer's willingness to buy a food product or to be attracted to a particular container. Table 2 also shows the significant changes in AE and opacity observed. The addition of CFS and E increased AE and opacity values of triticale flour films. These results are similar to those reported by other authors

Table 2

Properties of critical flour films without BLS (control) and containing cell free supernatant (CFS) and semipurified bacteriocin extract (E1 and E2) of *L. foodorum* ES216 isolated from oat

Film	Density ( $\text{g cm}^{-3}$ )	Moisture content (%)	Solubility (%)	WVP ( $\text{d}^{-1}$ ) ( $\text{g s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{Pa}^{-1}$ )	PS (MPa)	ΔE	Opacity ( $\text{UA mm}^{-1}$ )
Control	$1.51^{\text{a}} \pm 0.09$	$16.9^{\text{a}} \pm 0.02$	$22.7^{\text{d}} \pm 0.56$	$1.15^{\text{a}} \pm 0.02$	$1.65^{\text{a}} \pm 0.02$	$9.0^{\text{d}} \pm 0.20$	$1.52^{\text{d}} \pm 0.04$
CFS	$1.51^{\text{a}} \pm 0.02$	$17.9^{\text{a}} \pm 0.30$	$20.5^{\text{b}} \pm 0.68$	$1.16^{\text{a}} \pm 0.17$	$1.92^{\text{a}} \pm 0.73$	$10.2^{\text{b}} \pm 0.22$	$4.77^{\text{b}} \pm 0.01$
E1	$1.29^{\text{a}} \pm 0.30$	$16.2^{\text{a}} \pm 1.00$	$28.2^{\text{c}} \pm 1.70$	$1.05^{\text{a}} \pm 0.19$	$1.85^{\text{a}} \pm 0.19$	$11.2^{\text{b}} \pm 0.19$	$5.72^{\text{b}} \pm 0.01$
E2	$1.55^{\text{a}} \pm 0.12$	$17.8^{\text{a}} \pm 2.98$	$27.6^{\text{c}} \pm 2.36$	$1.05^{\text{a}} \pm 0.19$	$1.85^{\text{a}} \pm 0.19$	$12.4^{\text{b}} \pm 0.40$	$7.02^{\text{b}} \pm 0.02$

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Different letters as superscript in a column indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). WVP: Water vapor permeability; PS: puncture strength; ΔE: total color difference.

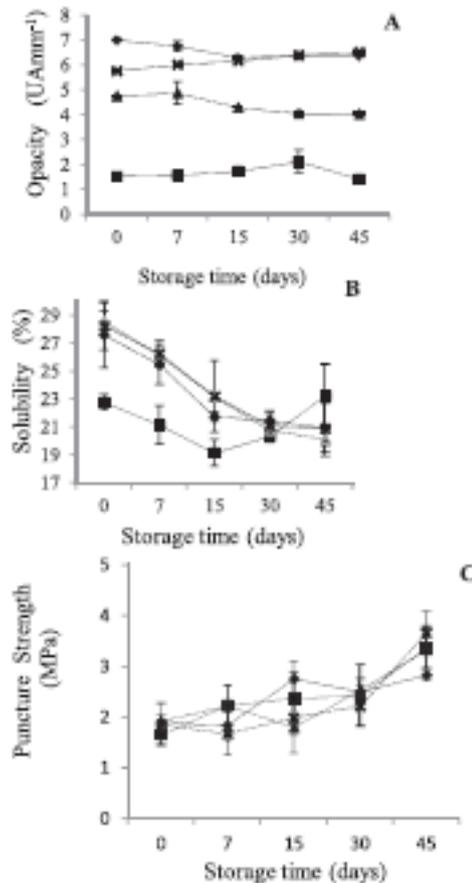


Fig. 2. Opacity (A) and solubility (B) and puncture strength (C) of control and activated (with CFS, E1 and E2) critical flour films as a function of storage time. ■ Control film, ▲ CFS film, × E1 film and ♦ E2 film.

(Serrano-Saenz et al., 2016).

On the other hand, during the storage, there was no significant change in the density, moisture content, water vapor permeability and color between control and activated films (results not shown). Similar behavior was observed when bacteriocins were added to gelatin based films (Sargan et al., 2015). There was a significant decrease in the opacity of CFS and E2 films (from 4.77 to 4.05 and 7.02 to 6.4

Table 3  
Values of a, b, c coefficients and  $R^2$  for Eq. (2) of critical flour films. X is time (days).

Film	Model	Equation	$R^2$
Control	Polynomial	$PS = 0.0002x^2 + 0.022x + 1.9617$	0.9722
CFS	Polynomial	$PS = 0.001x^2 - 0.033x + 2.0128$	0.9130
E1	Polynomial	$PS = 0.0011x^2 - 0.026x + 1.9655$	0.9718
E2	Polynomial	$PS = 0.0003x^2 + 0.044x + 1.8008$	0.9965

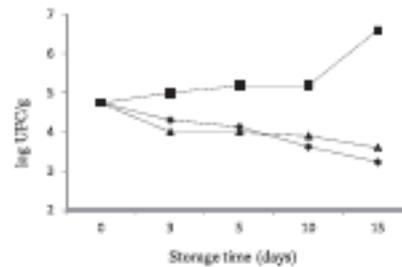


Fig. 3. Growth kinetics of *Listeria innocua* in cheese samples during storage at 4 °C. ■ sample in control (BLS-free) pouches; ▲ sample in pouches made with CFS film; ♦ sample in pouches made with E2 film.

$\text{UA mm}^{-1}$ , respectively) and an increase in E1 films (from 5.78 to 6.41  $\text{UA mm}^{-1}$ ) when storage time increased, while no significant change in the control films was observed (Fig. 2.A).

The solubility in water of active films became progressively reduced with the storage (Fig. 2.B), showing an increased resistance to water with the time. The solubility of CFS, E1 and E2 films decrease significantly with the time, from 20.58 to 20.16%, from 28.24 to 20.92% and from 27.6 to 20.96% respectively. However, no significant change was observed in the solubility of control films during the storage time.

Storage time significantly increased puncture strength (PS) of control and activated films (Fig. 2.C). New chain-chain associations can be formed during storage and change the mechanical properties of critical films (Serrano et al., 2016). In general, the puncture properties of polymeric films are related to toughness. Puncture strength is a measure of toughness and is directly proportional to resistance to break or fracture. The experimental points of the increase of PS during the storage time studied can be adjusted by Eq. (2), based on our previous study (Serrano et al., 2016).

The coefficients of determination for the models used in this study ( $R^2$ ) are reported in Table 3. The coefficient  $R^2$  shows how much of the variability of the data is explained by the model. The higher the values of  $R^2$ , much better is the model to explain variability. For puncture force, the polynomial model explains better the variability with higher  $R^2$  values (Serrano et al., 2016). When considering all the films

evaluated and the model, the higher effect of storage time on E1 and CFS films (Fig. 2.C) is reflected through the higher  $\lambda$  values in comparison with the  $\lambda$  values of the other films (Table 3).

### 3.3. Food assays

During storage, cheese samples packaged with control films without bacteriocin reached levels of  $1 \times 10^8$  CFU/g of *Listeria* after 3 days and  $4 \times 10^6$  CFU/g at day 15. Nevertheless, triticale active films were able to reduce the CFU/g of *Listeria* in the food assay. CFS films significantly reduced the number of *Listeria* in cheese to almost  $1 \times 10^5$  CFU/g at day 3 and continue a slight decrease to  $4 \times 10^3$  CFU/g at day 15. E2 films also reach the minor levels of *Listeria* after 15 days of storage (Fig. 3). After 5 days of storage, both active films decrease the counts of *Listeria* in 1  $\log_{10}$  comparing to control. The bacterial counts in control samples increased to  $1.5 \times 10^8$  CFU/g after 5 days and it remains stable until day 10. Then, it sharply increases to  $4 \times 10^8$  CFU/g (day 15). At this point, the reduction in *Listeria* counts in cheese samples packaged with active films reached  $4 \times 10^7$  CFU/g and  $1.7 \times 10^7$  CFU/g for CFS and E2 films respectively, which represents a decrease of 3 log units comparing to control.

These results imply an efficient inactivation of the microorganism as compared to previous reports. Cao-Huang, Chaina, Geigina, and Waché, 2010 reported a reduction in 1.1  $\log_{10}$  of the pathogen using films with 1000 IU/cm<sup>2</sup> of nisin. The same levels of inhibition of *Listeria* were observed with antimicrobial packages using enterocin 416K1 (Juppé et al., 2008). Marques et al. (2017) observed a similar decrease of about 1  $\log_{10}$  at day 4 in cheese with active packages adding BLIS from *Lactobacillus curvatus* P99. However, in that work *Listeria* reached similar levels than control at day 10. Dalzini et al. (2016) reported a significant decrease of *L. monocytogenes* counts in cheese packed with films (400 IU/cm<sup>2</sup> of BLIS produced by *Lactococcus lactis* strain) reaching after 15 days of storage an average decrease of 2.12 log colony-forming unit per gram.

The reduction of counts of *Listeria* observed in our work showed a powerful inhibitory activity of active films. Our microbial analysis in cheese confirmed the efficacy obtained in the in vitro diffusion assays with triticale films.

### 4. Conclusions

In this study active packaging of triticale flour films were prepared by the addition of bacteriocin-like substances (BLIS) produced by *E. faecium* as active compound. Films exhibit suitable physicochemical, optical barrier and mechanical properties and resulted in a suitable matrix to support the incorporation of bacteriocins. The bioactive packages developed here shown strong antimicrobial activity that lasted over 45 days of storage. In the food assay with cheese samples, the active film maintained its antimicrobial activity along 15 days of the assay. The triticale active film developed has shown to be an effective package that inhibit *Listeria* and reduce the counts of the microorganism during the evaluation period. Active triticale flour films incorporating BLIS produced by *E. faecium* IS216 can be used to control and inhibit *Listeria* and is a promising method to overcome problems associated with post-processing contamination, thereby extending the shelf life and possibly enhancing the microbial safety of other foods with similar characteristics to cheese.

### Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Secretaría de Ciencia y Tecnología from Universidad Nacional de Córdoba, Argentina and CONICET, Agenda Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) (Grant Práctico BID PICT 2012-1020) for the economical supports.

### References

- Abousoff, M. D., Megalitis, P. J., & Rao, S. J. (2014). Image processing with ImageJ. [WWW Document]. Biophotonics. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/bsph.1004> (Accessed 4 November 2017).
- Aguirre, A., Ibarra, R., & Lobo, A. R. (2011). Properties of triticale flour protein-based films. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 1869–1880. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.011>.
- Araki, L., De Jada, C., Talon, P., & Chiralt, A. (2010). Characterization of SB-based edible films incorporated with citric acid or glycerol succinic acid. *Journal of Food Engineering*, 99, 384–390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.03.014>.
- Bali, V., Prasad, P. S., Jena, M. R., & Kennedy, J. R. (2014). Bacteriocins: Recent trends and potential applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(10), <http://dx.doi.org/10.1080/10407170.2013.778221>.
- Barbosa, M. S., Todorov, S. D., Veljovic, V., Chohan, V., Kabanova, K., Ivanova, I. V., et al. (2014). Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* M 916-1 isolated from fermented wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 1195–1208. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12488>.
- Bertrán-Rodríguez, S. C., Muñoz-López, R., Palou, R., & López-Bellido, A. (2016). Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with oil-free emulsions of lactobacillus bacteriocins. *Food Control*, 62, 44–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcon.2015.10.029>.
- Bijl, R. B., Nishimura, C. N., Mohan, C. G., & Sathyanarayana, T. K. (2010). Smart packaging systems for food applications: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 32, 6120–6130. <http://dx.doi.org/10.1007/s11390-010-1966-7>.
- Blanco-Hernández, M., Ibarra, A., Sánchez, R., & Vignolo, G. (2013). Development of an active whey protein film with *Lactobacillus curvatus* C02705 bacteriocin and a study of its antimicrobial performance during aging. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31, 164–171. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2013.808998>.
- Bonzo, R., Alba, N., & Aguirre, A. (2016). New films based on triticale flour protein and effects of storage time. *Journal of Food Science*, 66, 82–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfs.2016.01.001>.
- Cao-Huang, L., Chaina, A., Geigina, L., & Waché, Y. (2010). Control of nisin incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food Microbiology*, 27, 940–944. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.028>.
- Dalzini, R., Galipati, R., Merigo, D., Rufino, P. R., Leite, M. W., Bertini, R., et al. (2016). Anti-*Listeria* activity of bioactive food packaging on artificially contaminated sliced cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40, 269–276. <http://dx.doi.org/10.1111/jfp.12262>.
- Di Rienzo, J. A., Casanova, R., Holmstedt, M. G., González, L., Taliaferro, M., & Ribicello, C. W. (2016). *Lactobacillus* 2016. *Grupo de Infección y Clínica*. Universidad Nacional de Córdoba. <http://infoform.com.ar>.
- Roberson, L., Hensberg, P., & Murt, A. N. (2014). Nanocomposite film based on soy protein and nanocellulose prepared by casting. *Journal of Materials Science*, 49, 15–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jm.2013.08.008>.
- Hendrik, C., Guitara, D., & Mariani, R. (2015). Identification of multiple bacteriocins in *Listeria* spp. using an *enterococcus*-specific bacteriocin PCR assay. *Microorganisms*, 3, 1–16. <http://dx.doi.org/10.3390/micro303011001>.
- Burguero, C., Colla, G., Utrilla, A. S., Bertini, M. A., Díaz, M., & Aullón, M. C. (2013). Gelatin-based films added with bacteriocins and a flavonoid: new active against foodborne pathogens. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 23, 66–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.01.007>.
- Keppel, R., Pflanz, P., Mehl, M., Tacke, M., de Nédélec, S., Gieret, R., et al. (2008). Anti-*Listeria* activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with nisinolide 43681 for use in active food packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 201–207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.016>.
- Makroto, M., Markov, S., Grigori, G., Mijaković, L., Kostić-Brajković, S., Vukelićević, M., et al. (2014). Microcins as a pre-treatment of triticale for bioethanol fermentation and utilization of the stillage for lactic acid fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 80, 122–130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.01.011>.
- Marques, J. B., de L., Hasek, G. D., Grossberg, G., da S., Cruzes, C. R., et al. (2015). Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: Characterization and application to biodegradable films for control of *Listeria monocytogenes* in cheese. *Food Microbiology*, 63, 169–176. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.008>.
- Martinez, R. C. R., Saldaña, C. D., Vieira, A. D. S., Vilaverde, M. L. M., Todorov, S. D., Seed, S. M. L., et al. (2015). Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* in a potentially synthetic cheese spread. *Food Microbiology*, 48, 146–152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.010>.
- Peña, D., Mojović, L. J., Vujanović, V., Peña, J., Benčić, S., & Baldo, M. (2009). Identification of wheat and triticale hydrolysates: A comparative study. *Food*, 38, 1625–1638. <http://dx.doi.org/10.1016/j.food.2009.01.011>.
- Romero, V., Romero, R., Rosalindoz, N., & Aguirre, A. (2016). Biodegradable film obtained from triticale (*Triticosecale Wittmack*) flour activated with ozone for cheese packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 10, 54–59.
- Sibaud, R., Wilhoit, J. G., & Pérez, G. (2016). Technological properties of lactic acid bacteria isolated from cow corral material. *LWT – Food Science and Technology*, 70, 186–191.
- Sibaud, R., Saavedra, L., Wilhoit, R. M., Hain, C., & Sousa, R. (2012). Nisinolide C0236 inhibits *Listeria monocytogenes* in a murine model. *Food Science Pathogens and Immunity*, 9, 68–76.
- Waché-González, L., Quintero Saavedra, J. L., & Chiralt, A. (2013). Physical properties and antimicrobial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*.

- Food Hydrocolloids*, **20**, 93–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.011>.
- Santiago-Rivera, P., Sauer, B. R. P., Pedrosa, J. K., Hines, M. A. W., Barbosa, K. R. K., Volp, A. C. P., et al. (2009). Antimicrobial efficiency of films incorporated with pedicels (AZA\*250) on preservation of sliced ham. *Food Control*, **20**, 85–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcon.2008.02.006>.
- Suzuki, A. O. M., Hill, C., Ross, K. P., Mack, S., Hermeling, W., & Arendt, K. K. (2000). Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins lactin II<sup>+</sup> and nisin<sup>+</sup>. *International Journal of Food Microbiology: Selected Topics from Food Micro*, **96**(3/4), 241–269. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1607\(00\)00284-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1607(00)00284-7).
- Székely, L., Némethyvári, P., & Csoma, V. (2002). Soluble bioactive fatty acid colloidal derivative complexes used in food packaging applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4290–4296.
- Szosa, K. (2017). What's up, what's not with exosomes. *Food Technology*, **71**, 63–68.
- Talavera, X. D., Vaz-Velho, M., & O Ede, P. (2004). Comparison of two methods for purification of pedicels from *Staphylococcus aureus* 9311, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 9311. *Brazilian Journal of Microbiology*, **25**, 149–160. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-56622004000300026>.
- Vera-Figueroa, K., Schmitt, K., Sousa, P., & Nede-Maria, M. K. (2017). Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB): Classifying current research and discussing topics and trends in applied microbiology. *FOOD ANTIBIOTICS*, **6**, 66–76.
- Zhu, Pan. (2018). Titration Nutritional composition and food uses. *Food Chemistry*, **241**, 68–89.