

## EFECTO ANTAGÓNICO DE CEPAS LÁCTICAS AISLADAS DE QUESO FERMENTADO CONTRA MICROORGANISMOS DE INTERÉS EN ALIMENTOS

Tatiana Beldarraín\*, Eva Sevillano, Anabel González, Danae K. Rodríguez, Marlén Calderón, Ibis D. Flores, Isaac López y Rosa L. González

Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria  
Carretera al Guatao km 3½. La Habana, CP 19200, Cuba.

E-mail: tatiana@iiaa.edu.cu

### RESUMEN

Para evaluar el efecto antagónico de cepas usadas como cultivo iniciador en queso fermentado frente a microorganismos patógenos y del deterioro de alimentos, se elaboraron dos variantes con *Lactococcus lactis* (var 1) y *Pediococcus acidilactici* (var 2). Al finalizar el tiempo de fermentación se tomaron muestras de cada variante de queso, se hicieron determinaciones de bacterias ácido lácticas (en MRS, 32 °C, 24 h) y se evaluó su capacidad antagónica contra *Listeria innocua* LMG 13568, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Bacillus subtilis* ATCC 10707, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Lactobacillus plantarum* IIIA y *Lactobacillus acidophilus* IIIA. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Pediococcus acidilactici* mostraron capacidad antagónica frente a los microorganismos patógenos y del deterioro por la producción de ácido orgánico.

**Palabras clave:** capacidad antagónica, bacterias ácido lácticas, queso fermentado.

### ABSTRACT

**Antagonistic effect of lactic acid bacteria strain isolated from fermented cheese against microorganisms of interest in food**

Fermented cheese starter antagonistic effect against pathogens and spoilage microorganisms was evaluated. Two variants of the product using *Lactococcus lactis* (var 1) and *Pediococcus acidilactici* (var 2) were elaborated. After fermentation time, cheese samples of each variant were taken and lactic acid bacteria determinations were done (MRS, 32 °C, 24h). The antagonistic effect against *Listeria innocua* LMG 13568, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Bacillus subtilis* ATCC 10707, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Lactobacillus plantarum* IIIA and *Lactobacillus acidophilus* IIIA was evaluated. Antagonistic effect of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Pediococcus acidilactici* against pathogens and spoilage microorganism was showed by organic acid production.

**Keywords:** antagonistic activity, lactic acid bacteria, fermented cheese.

### INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son, probablemente, el grupo bacteriano más ligado al hombre. Están presentes de forma natural en el ambiente y en una gran cantidad de alimentos, tanto de origen animal como vegetal, además, se encuentran habitualmente asociadas a las mucosas de los vertebrados. Recientemente su papel clásico como microorganismos involucrados en la producción de una amplia variedad de alimentos

\*Tatiana Beldarraín Iznaga: Licenciada en Microbiología (UH, 1996). Especialista en Carne y Productos Cárnicos (IIIA, 1999). Investigadora Auxiliar y Máster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

e ingredientes alimentarios se ha ampliado e incluye el de mantener la salud de los consumidores (1). El rasgo común que caracteriza a estas bacterias es una propiedad metabólica: la producción de ácido láctico como único o principal producto final de la fermentación de una gran variedad de sustratos (2). En la actualidad, las principales bacterias lácticas relacionadas con los alimentos y que poseen interés industrial pertenecen a los géneros *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* (1,3).

Las bacterias ácido lácticas se encuentran en ambientes muy variados, pero generalmente están asociadas con sustratos ricos en nutrientes. En estos, la acidificación y la producción de compuestos antimicrobianos, exopolisacáridos y diversas enzimas que acompañan su crecimiento, contribuyen al aroma, textura, conservación y valor nutritivo de una gran variedad de productos fermentados (3,4).

El interés industrial de estas bacterias es por su capacidad de conservar alimentos perecederos debido a la producción de metabolitos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (5-8). En el IIIA existe un banco de cepas lácticas que se emplean en la fermentación controlada de quesos y leches fermentadas, por esa razón se decidió evaluar la capacidad antagonista de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Pediococcus acidilactici*, usadas como cultivo iniciador en queso fermentado frente a microorganismos indicadores en alimentos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se trabajó con el queso madurado elaborado en la Planta Piloto de Lácteos del IIIA (9) que fue elaborado a partir de leche de buena calidad microbiológica mediante la tecnología tradicional. Se produjeron dos variantes cuya diferencia era el cultivo iniciador empleado: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (var 1) y *Pediococcus acidilactici* (var 2). Se eligieron estas cepas debido a sus propiedades tecnológicas y a que se han reportado como productoras de bacteriocinas de importancia (1).

Al final del tiempo de fermentación se tomaron, en condiciones estériles, 10 g de cada variante de queso y se diluyeron en una solución estéril de sacarosa (10 %

w/v) durante 7 min para estimular el crecimiento de las BAL (5,10). Después se homogenizó en 90 mL de agua destilada estéril mediante el empleo de un agitador magnético (Speedsafe TM a 500 min<sup>-1</sup>), se hicieron diluciones seriadas hasta 10<sup>7</sup>. Se sembraron por duplicado en medio selectivo para lactobacilos agar MRS (Oxoid, Unipath Ltd., Basingstoke, UK) en placas estériles de 90 mm de diámetro, se incubaron en condiciones restrictivas de oxígeno a 30 ± 1 °C durante 18 a 24 h y se realizaron las lecturas correspondientes (se tomaron en consideración las placas que tuvieran entre 20 y 300 UFC para evitar conteos erróneos). A las cepas aisladas se les hicieron las siguientes pruebas para comprobar que eran los microorganismos inoculados: morfología celular y pureza mediante tinción de Levine y Black (sin ácido ni agua) (11) y observación al microscopio, capacidad acidificante por inoculación en caldo glucosado (Oxoid) e incubación a 30 °C por 16 h (5) para evaluar el pH por potenciometría, tiempo de coagulación y viabilidad (11)

Se decidió incluir, además, pruebas bioquímicas de API 50 CH (API Systems, Biomerieux, France, [www.apiweb.biomerieux.com](http://www.apiweb.biomerieux.com)) y las pruebas complementarias necesarias para la identificación de lactobacilos para evitar tener en el estudio cepas que no eran de interés (12).

Después de la identificación, los lactobacilos aislados se inocularon en tubos de caldo MRS y se incubaron por 24 h, a 32 °C. Cada cultivo, por separado, se centrifugó a 4000 min<sup>-1</sup> por 15 min (13); el sobrenadante obtenido se pasó, en condiciones asépticas, a través de un filtro de membrana estéril de 0,22 µm, se dispuso en alícuotas de 1 mL y se almacenó a 8 °C para su uso posterior.

Para este trabajo se eligieron como diana, microorganismos sustitutos de cepas implicadas en enfermedades transmitidas por los alimentos: *Listeria innocua* LMG 13568, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 14579 y se incluyó, además, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Bacillus subtilis* ATCC 10707 y *Lactobacillus plantarum* IIIA que se han aislado e identificado como causantes del deterioro de carne, mayonesa y embutidos, así como *Lactobacillus acidophilus* IIIA. Para la conservación de los microorganismos diana, se em-

plearon tubos de agar inclinado cerebro corazón (Biocen, La Habana). En todos los casos se realizó la tinción de Gram y observación al microscopio para asegurar que no existieran contaminaciones no deseadas.

Para la determinación del antagonismo de las BAL se utilizó la técnica de difusión en pocillos (5,14). La naturaleza química del compuesto con capacidad antagónica se determinó de forma indirecta, y para ello se eligió el sobrenadante que presentara actividad antagónica contra alguno de los microorganismos diana. Estos ensayos se hicieron por duplicado, con la técnica de los pocillos y comprendió la determinación de inhibición por ácidos orgánicos, por peróxido de hidrógeno o por compuestos de naturaleza proteica.

Este experimento se realizó por triplicado y se utilizó como control positivo de producción de bacteriocina la cepa *Lactobacillus curvatus* 705 del Centro de Referencia de Lactobacilos (CERELA, Argentina) que ha presentado actividad contra *Listeria innocua* (3).

Para determinar si la inhibición era sólo por producción del ácido orgánico, se tomaron 5 mL del sobrenadante que se neutralizaron con NaOH 1 N hasta pH 7 y se ensayó la actividad antagónica contra cada microorganismo diana (15). A las 24 h de incubación examinaron las placas, el efecto antagónico se determinó midiendo el diámetro de los halos de inhibición alrededor del pocillo, expresados en mm y se calculó la diferencia con el diámetro de los halos de inhibición obtenidos en la determinación de la actividad antagónica. Si no existía halo alrededor del pocillo se concluía que la inhibición era por la presencia de ácido orgánico.

Para determinar si el compuesto inhibidor era de naturaleza proteica o era peróxido de hidrógeno, se tomaron dos alícuotas de 3 mL de cada sobrenadante que

mostró actividad antagónica luego de ser neutralizado con NaOH. Una de ellas se neutralizó con catalasa (65 UI/mL) (7,14) durante 5 min. Se tomó 1 mL de cada una de las suspensiones de las bacterias diana por separado y se adicionaron a tubos que contenían 10 mL del agar blando a  $43 \pm 1$  °C (pH 6), operación que se realizó por duplicado. Inmediatamente se mezcló vigorosamente mediante agitador de tubos, se inculó como césped sobre el medio agar-agua duro y se dejó secar en flujo laminar (3). Se tomaron 100 µL de cada suspensión de BAL y se colocó en cada una de las placas Petri de agar-agua duro con las suspensiones inóculo. Se dejó incubar a 37 °C por  $18 \pm 2$  h y se midió el halo alrededor de los pocillos. Si existía halo alrededor del pocillo neutralizado con catalasa se concluyó que la inhibición fue por presencia de metabolito de naturaleza proteica y si no se asumió que fue por presencia de peróxido de hidrógeno.

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación doble con un nivel de confianza del 95 %. Al registrarse diferencia significativa entre las distintas cepas se aplicó la prueba de comparación y rangos múltiples de Duncan. Los factores evaluados fueron variantes de BAL y microorganismos indicadores y la variable respuesta fue el tamaño del halo de inhibición. Se empleó el programa estadístico SPSS 11,5 de Windows para el procesamiento de los resultados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis macroscópico de las BAL (Tabla 1) mostró que en la variante 1 de queso se encontraron viabilidades de entre siete y ocho unidades log de colonias punteadas, convexas, de color blanco, típicas de *L. lactis* subsp. *lactis* mientras que los análisis microscópicos mostraron cocos en duplas, con buena definición y mor-

**Tabla 1. Resultados de la caracterización de las cepas aisladas de quesos (n=3)**

Var.	Análisis microscópico	pH	Tiempo de coagulación (h)	Viabilidad ( $\log_{10}$ UFC/g)
1	Cocos en diplos (muy buen crecimiento)	4,8 (0,2)	24	7,81
2	Cocos en duplas, con buen tamaño y bien poblado	4,5 (0,3)	24	8,22

Var. 1: colonia aislada de queso elaborado con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, Var. 2: colonia aislada de queso elaborado con *Pediococcus acidilactici*.

**Tabla 2. Identificación hasta género de las bacterias aisladas**

Var.	GRAM	OXI	CATA	O/F	GLU	O <sub>2</sub>	Grupo
1	cocos +	Neg.	Neg.	F	Pos.	Fac.	<i>Lactococcus, Enterococcus,</i>
2	cocos +	Neg.	Neg.	F	Pos.	Fac.	<i>Streptococcus, Pediococcus</i>

Neg.: negativo; Pos.: positivo; F: Fermenta la glucosa, O: Oxida la glucosa; O<sub>2</sub>: relación con el oxígeno, Fac.: anaerobio facultativo.

fología. La variante 2 mostró concentraciones de ocho unidades log de colonias blancas, convexas y de mayor tamaño mientras que en la microscopía se observaron células en forma de cocos en pares y tétradas, características de este género (10,12,16).

En cuanto al pH, se obtuvieron valores de 4,8 para *L. lactis* subsp. *lactis* y de 4,5 para *P. acidilactici*. Los cultivos que producen un decrecimiento drástico del pH en caldo glucosado, entre el primero y el cuarto día de fermentación, con valores por debajo de cinco, son beneficiosos desde el punto de vista higiénico ya que provocan la inhibición de la microbiota contaminante e indeseable, incluyendo patógenos (3).

El tiempo de coagulación de la leche fue el esperado para cada cultivo en estudio, esta propiedad es muy importante ya que evidencia que las cepas cumplen con las propiedades fisiológicas y tecnológicas requeridas para su empleo en un estudio de antagonismo contra patógenos de alimentos (16).

Con relación a los resultados obtenidos en las pruebas de identificación hasta género (Tabla 2), se observa que es difícil hacerlo por las pruebas tradicionales ya que ambos géneros presentan las mismas características, y se ubican en el grupo de las BAL: cocos grampositivos, que producen ácido a partir de la glucosa, catalasa negativos, oxidasa negativos, lo que comprueba que son las cepas inoculadas, además, pertenecen a la misma familia *Lactobacillaceae* (12).

La identificación genotípica hasta especie (Tabla 3) mostró que las cepas aisladas fueron las inoculadas: *L. lactis* subsp. *lactis* y *P. acidilactici*. Ambas emplearon la glucosa y eran homofermentativas ya que no se observó producción de gas a partir de la glucosa (17-19).

El uso de determinados carbohidratos como fuente de carbono, es otra de las pruebas bioquímicas que permiten la diferenciación entre géneros y especies de la familia *Lactobacillaceae*. Como se puede observar, *L. lactis* subsp. *lactis* no produjo ácido a partir del manitol y la rafinosa, lo que lo diferencia de *P. acidilactici*. Ambos cultivos, sin embargo resultaron positivos a la prueba de rojo de metilo, negativos a la hidrólisis de la gelatina y no reducen el nitrato a nitrito. Respecto a la producción de amoníaco de la arginina, *L. lactis* subsp. *lactis* es capaz de hacerlo mientras que *P. acidilactici* no.

Los resultados de la prueba de antagonismo indirecto mostraron que las dos BAL analizadas inhiben las cepas indicadoras ensayadas, aunque varía el grado en que lo hacen (Tabla 4). Se obtuvo que tuvieron mayor efecto antagonístico contra las bacterias grampositivas (*L. innocua*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *St. aureus*) que contra las gramnegativas (*E. coli*, *Ps. aeruginosa* y *Pr. vulgaris*). Esto está dado, entre otros factores, por las diferencias en la composición de la pared celular, lo que trae consigo que los mecanismos adaptativos para las diferentes condiciones de estrés son más complejos para las bacterias gramnegativas. La mayoría de los ácidos débiles deben penetrar en la célula para tener un efecto letal o inhibitorio. En el caso de los organismos gramnegativos deben atravesar la membrana citoplasmática y la membrana interna antes de ejercer su acción en la célula. Esta barrera juega un importante rol de controlar el acceso de preservantes y otros compuestos al interior de la célula (5).

Los diámetros de los halos de inhibición (mm) presentados por los microorganismos indicadores frente a las BAL (Tabla 5) mostraron que el mayor antagonismo lo presentaron contra *L. innocua* al obtenerse halos de

**Tabla 3. Pruebas bioquímicas de identificación según API CH50**

Prueba realizada	Cepa 1	Cepa 2
Acido a partir de:		
Arabinosa	+	+
Lactosa	+	+
Manitol	-	+
Rafinosa	-	+
Sorbitol	+	-
Sacarosa	+	D
Dextrina	+	D
Maltosa	+	+
Melibiosa	+	+
Ramnosa	+	+
Xilosa	+	-
Trealosa	+	-
Melizitosa	+	-
Salicina	+	D
Fructuosa	+	D
Galactosa	+	+
Manosa	+	D
Ribosa	+	D
Metabolismo	Homofermentativo	Homofermentativo
Crecimiento a 4 % NaCl	+	+
Crecimiento a 6.5 % NaCl	-	+
Crecimiento a 15 °C	+	+
Crecimiento a 37 °C	+	+
Crecimiento a 45 °C	-	-
Prueba de rojo de metilo	+	+
Hidrólisis de la gelatina	-	-
Reducción de nitrato a nitrito	-	-
Producción de NH <sub>3</sub> de la arginina	+	-
Microorganismo identificado	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	<i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i>

“+” = reacción positiva, “-“= reacción negativa, “D” = reacción débil.

**Tabla 4. Resultados cualitativos de las pruebas de antagonismo indirecto entre las BAL aisladas y los microorganismos indicadores ensayados (n=3)**

Microorganismo indicador	Cepa	
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i>
<i>Listeria innocua</i> LMG 13568	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	++	++
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	+	+
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10707	++	++
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	++	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> IIIA	++	++
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IIIA	++	++

+++; halo mayor de 4 mm, ++: halo mayor de 2,9 mm; +: halo entre 0,5 y 2,9 mm.

**Tabla 5. Resultados medios de las pruebas de antagonismo indirecto entre las BAL y los microorganismos indicadores (n=3) (tamaño del halo mm)**

Microorganismo indicador	Cepa	
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Pediococcus</i> <i>acidilactici</i>
<i>Listeria innocua</i> LMG 13568	4,1 (0,2)e	4,1 (0,2)e
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3,1 (0,2)d	3,3 (0,2)d
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,67(0,2)a	0,8 (0,2)a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	1,1 (0,5)ab	1,0 (0,5)a
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	1,6 (0,2)bc	1,8 (0,2)c
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10707	3,3 (0,2)d	3,3 (0,2)d
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	3,6 (0,2)de	3,6 (0,2)de
<i>Lactobacillus plantarum</i> IIIA	3,3 (0,2)d	3,3 (0,2)d
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IIIA	3,3 (0,2)d	3,5 (0,5)d

Valor medio (desviación estándar).

Letras diferentes significan diferencias estadísticas a  $p \leq 0,05$ .

inhibición de 4,17 mm tanto *L. lactis* subsp. *lactis* como *P. acidilactici*. Este resultado no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con los resultados obtenidos contra *B. cereus* ATCC 14579, a pesar de que los halos de inhibición de este fueron de 3,67 mm. La inhibición de las BAL contra los microorganismos grampositivos ensayados (*L. innocua* LMG 13568; *St. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 10707, *B. cereus* ATCC 14579, *L. plantarum* IIIA y *L. acidophilus* IIIA) fue significativamente inferior ( $p > 0,05$ ) a la obtenida para los microorganismos gramnegativos (*E. coli* ATCC 25922, *Ps. aeruginosa* ATCC 10145 y *Pr. vulgaris* ATCC 13315).

Estos resultados se justifican debido a que los microorganismos gramnegativos poseen mecanismos diversos que les propician poder adaptarse a cualquier ambiente, entre ellos su capacidad de crecer en medios ácidos (20). Este mecanismo no está bien claro y puede estar relacionado con la formación de proteínas inducidas por la preexposición de la bacteria a condiciones ácidas. *E. coli* posee varios sistemas de resistencia a los ácidos orgánicos que pueden ser clasificados de manera general en dos categorías: respuesta ácido tolerante que funciona en un medio mínimamente suplementado y mecanismo ácido resistente en el que se requieren algunas formas de suplementación. En algunos serovares de *E. coli* se han identificado hasta tres mecanismos ácido resistentes diferentes (20). Además, poseen mecanismos de transporte que le permiten obtener nutrientes en los ambientes más diluidos.

La acción inhibitoria predominante se relacionó con la presencia de ácido láctico ya que todos los sobrenadantes perdieron la capacidad inhibitoria al ser neutralizados excepto *L. curvatus* CRL 705, que se utilizó como patrón bacteriocinogénico. La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos y del pH es complementaria. La fracción no disociada de los ácidos orgánicos es quien posee una mayor actividad inhibitoria debido a su naturaleza lipofílica, puede atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma (21).

## REFERENCIAS

1. Reviriego, C. *Lactococcus lactis* productores de pediocina PA-1 y enterococos aislados de leche materna como agentes bioconservantes en quesos. Tesis en opción al título de Doctor Europeus, Universidad Complutense de Madrid, 2009, p. 286.

El ácido láctico constituye el principal producto del catabolismo de los carbohidratos de estas cepas y contribuye al descenso del pH creando un ambiente hostil para la mayoría de los microorganismos. Su efecto inhibitorio sobre los microorganismos sensibles se resume en la alteración de la permeabilidad celular, del potencial de membrana que conlleva a alteraciones de la Fuerza Proton Motriz, así como el descenso del pH intracelular que ocasiona la alteración de funciones celulares importantes (22).

*L. innocua* mantuvo su comportamiento frente a *L. curvatus* CRL 705 aunque no se encontró sensibilidad frente a otras BAL, esto podría deberse a la susceptibilidad individual de esta cepa, se ha reportado por otros autores que una cepa que parece ser sensible puede tener células que presenten resistencia a la acción de la bacteriocina (3).

Con relación al mecanismo inhibitorio que se pone de manifiesto, es evidente que el ácido láctico juega un importante papel ya que mostró ser la razón de la inhibición de todas las bacterias indicadoras estudiadas, salvo *L. innocua* que se ve inhibida, también por *L. curvatus* CRL 705, productor de curvaricina. El efecto del peróxido de hidrógeno no se observó en ninguna de las bacterias lácticas analizadas.

## CONCLUSIONES

Las cepas *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Pediococcus acidilactici* mostraron capacidad antagónica frente a *Listeria innocua* LMG 13568, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Bacillus subtilis* ATCC 10707, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Lactobacillus plantarum* IIIA y *Lactobacillus acidophilus* IIIA. El mecanismo principal por el cual inhibieron los microorganismos indicadores en estudio fue por la producción de ácido láctico y el mayor efecto fue sobre *Listeria innocua* LMG 13568.

2. Axelsson, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology, En: Lactic Acid Bacteria, S. Salminen, A. von Wright y A. Ouwehand (Eds.), Nueva York: Marcel Dekker, 2004, pp. 1-66.
3. Vignolo, G.M. Curso teórico-práctico de métodos de determinación de la capacidad bacteriocinogénica de bacterias lácticas. Instituto Cubano de Derivados de la Caña de Azúcar. 2 al 5 de Noviembre de 2010. La Habana.
4. Velázquez, E. Desarrollo de una tecnología para la conservación de albóndiga de cerdo. (Tesis en opción al título de Licenciado en Ciencias Alimentarias, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana), 2010, p 82.
5. Benítez, A. Capacidad antagonica de cepas lácticas contra microorganismos de interés en alimentos. (Tesis en opción al título de Licenciada en Biología, Universidad de La Habana), 2011, p 50.
6. León, M. Empleo de cultivos probióticos para la conservación de un producto conformado a base de carne de cerdo. (Tesis en opción al Título de Licenciado en Ciencias Alimentarias. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana), 2012, p. 76.
7. Martín del Campo, M., I. Cástulo, H. Gómez H, E. Héctor, R y Alaníz de la O. e-Gnosis 6: 1-17, 2008
8. Leroy, F. y De Vuyst, L. Trends Food Sci. Technol. 15: 67-78, 2004.
9. Díaz de la Rocha, J. Estudio de la maduración y determinación de variantes con mejoras tecnológicas del queso cubano Patagrás. (Tesis en opción al Título de Doctor en Ciencias Tecnológicas, Instituto Superior Politécnico José Antonio Echevarría, La Habana), 1991, p. 100.
10. Olaoye, O. A.; Onilude, A.A. y Dodd, Ch. E. R. Ad. in Nat. Appl. Sci. 2(3): 197-207, 2008.
11. NRIAL 065:08. Iniciadores lácticos. Métodos de ensayo. Ministerio de la Industria Alimentaria. Cuba, 2008.
12. Morata de Ambrosini, V.I.; Martín, M.C. y Merín M.G. Bacteria. Encyclopedia of Food Microbiology (2nd ed.), Academic Press: Oxford, 2014, pp. 169-173
13. Estrada, A.; L. Gutiérrez y Montoya, O. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 58: 2601-2609, 2005.
14. Bakar Diop, M.; Dubois-Dauphin, R.; Tine, E.; Ngom, A.; Destain, J. y Thonart, P. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 11 (4): 275-281, 2007.
15. Alvarado, C.C. y Díaz, C.G. Respyn 10: 1-9, 2009.
16. Kruger, M.F.; de Souza Barbosa, M.; Miranda, A.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Todorov, S.D. y de Melo Franco, B.D.G. Food Control 33: 467-473.
17. Ammor, M.S. y Mayo, B. Meat Science 76: 138-146, 2007
18. Bulut, C., H. Gunes, B. Okuklu, S. Harsa, S. Kilic, H.S. Coban y A.F. Yenidunya. Journal of Dairy Res., 72: 19-24, 2005.
19. Onilude, A.A.; Sanni, A.I.; Olaoye, O.A. y Ogunbanwo, S.T. World J. Microbiol. Biotechnol. 18: 615-619, 2002.
20. Pescumma, M. ; Hébert, E.M. ; Mozzi, F. y Font de Valdez, G. Food Microb. 25: 442-451, 2008.
21. Vásquez, S.; Suarez, H. y Zapata, S. Rev. Chil. Nutr. 36: 64-71, 2009.
22. Jaramillo, D.; Meléndez, A.P. y Sánchez Medina, O.F. Rev. Ven. Cienc. Tecn. Alim. 1 (2): 193-209, 2010.