

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**CONSERVACIÓN DE CALAMAR GIGANTE
(*Dosidicus gigas* Orbigny 1835) POR
TRATAMIENTO COMBINADO DE NISINA Y
ÁCIDO LÁCTICO A 6°C**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en
Biología

CAROLINA MARGARITA QUISPE HUANCAYA

Lima, Perú

2017

Dedicatoria

La vida se encuentra llena de retos y uno de ellos es la universidad. Tras verme dentro de ella, me he dado cuenta que más allá de ser un reto, es una base no solo para mi entendimiento en el campo de la biología en el que me he visto inmersa, sino para lo que concierne a la vida en sí y para mi futuro.

Dedico esta tesis a mis padres N. Walter Quispe Rojas y Guillermina N. Huancaya Tejeda, quienes me apoyaron incondicionalmente y creyeron en mí en todo momento a pesar de las adversidades de la vida, a ellos con todo el amor del mundo les digo “He aquí el fruto de su esfuerzo”.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres Walter y Norma que con el ejemplo me enseñaron más de lo que ellos mismos pensaron inculcarme y por acompañarme durante todo este camino.

A mi hermano Juanca quién me tuvo paciencia y comprensión en casa.

A mi asesor Mg. Juan Carlos Ramos por sus críticas y sus consejos.

A mis profesores Dr. Tomás Agurto, Mg. Enzo Foy y Mg. César Puicón quienes se tomaron el tiempo de leer y corregir mi tesis.

A mis amigas Bach. Gloria Varillas y Bach. Cindy Herrera quienes fueron un apoyo constante durante el tiempo que demandó el desarrollo de esta tesis.

A todos ellos desde lo más profundo de mi corazón, muchas gracias.

Resumen

La conservación del Calamar gigante (*Dosidicus gigas*, Orbigny 1835) por tratamiento combinado de nisina y ácido láctico a 6°C, se basó en tres etapas fundamentalmente: Etapa I: Preparación del material hidrobiológico, medios de cultivo (agar Mac Conkey, Plate Count y Bair Parker), tratamientos individuales y combinados al 0.2, 0.5, 0.8% de nisina y ácido láctico y control. Etapa II: Observación, cuantificación de la inhibición bacteriana de *Staphylococcus aureus*, coliformes totales y aerobios mesófilos totales en *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante) cada 24 horas transcurrida la incubación (0, 24, 48 y 72 Horas) y medición del pH. Etapa III: Procesamiento de los resultados usando el software estadístico SPSS versión 24 para el experimento bifactorial 4x4. Para lo cual, se utilizó el manto de un solo individuo obtenido del terminal pesquero de Villa María del Triunfo. Dicho estudio se desarrolló en un lapso de 5 meses (Julio - Noviembre del 2016), en las instalaciones de los laboratorios de microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma Lima – Perú. Se tomó como variables dependientes al recuento de *Staphylococcus aureus*, recuento de coliformes totales, recuento de aerobios mesófilos totales y como variables independientes a la concentración de nisina, ácido láctico, nisina más ácido láctico, tiempo y pH. Se obtuvo como resultados que el tratamiento combinado de nisina más ácido láctico a concentración de 0.8% y evaluación a 72 horas, fue aquel con mayor eficacia resultando para el recuento de aerobios mesófilos totales 202×10^4 (UFC/ml) (Gráfico N° 6.) y para Coliformes Totales 228×10^4 (UFC/ml) (Gráfico N°12.) a diferencia de su respectivo control que presentó 1968×10^4 UFC/ml para el recuento de aerobios mesófilos totales y 1716×10^4 UFC/ml para el recuento de coliformes totales.

De los cuales se concluye que hubo mayor actividad antimicrobiana cuando se sometió a tratamiento combinado de nisina más ácido láctico a diferencia de los tratamientos individuales de nisina o ácido láctico, lo cual resulta una barrera efectiva para conservación de *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante) como alimento seguro e inocuo en la calidad alimentaria.

PALABRAS CLAVE: Bacteriocinas, Nisina, Ácido láctico, Actividad antimicrobiana, inocuidad alimentaria, Unidades formadoras de colonia (UFC), Alimentos Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS).

Summary

The conservation of giant squid (*Dosidicus gigas*, Orbigny 1835) by combined treatment of nisin and lactic acid at 6°C, was based on three stages: Stage I: Preparation of hydrobiological material, culture media (Mac Conkey agar, Plate Count and Bair Parker), single and combined treatments at 0.2, 0.5, 0.8% nisin and lactic acid and control. Stage II: Observation, quantification of bacterial inhibition of *Staphylococcus aureus*, total and aerobic total, mesophilic coliforms in *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Giant Squid) every 24 hours after incubation (0, 24, 48 and 72 hours) and pH measurement. Stage III: Processing of results using SPSS software version 24 for bifactorial experiment 4x4. For that, the mantle of a single individual obtained from the fishing terminal of Villa María del Triunfo was used. This study was carried out over a period of 5 months (July - November 2016) at the facilities of the microbiology laboratories of the Faculty of Biological Sciences, Universidad Ricardo Palma Lima - Peru. *Staphylococcus aureus*, Total Coliforms count, total mesophilic aerobes counts and as independent variables to the concentration of nisin, lactic acid, nisin plus lactic acid, time and pH were used as dependent variables. It was obtained as results that the combined treatment of nisin plus lactic acid at concentration of 0.8% and evaluation at 72 hours was the one with the highest efficiency resulting in the count of total mesophil aerobes 202x10⁴ CFU / ml (Graphic N° 6) and Total Coliforms 228x10⁴ CFU / ml (Graphic N° 12), in contrast to their respective control, which presented 1968x10⁴ CFU / ml for the count of total mesophilic aerobes and 1716x10⁴ CFU / ml for the total coliform count.

Of these, it is concluded that there was more antimicrobial activity when it was submitted to a combined treatment of nisin plus lactic acid as opposed to the individual treatments of nisin or lactic acid, which is an effective barrier for the conservation of *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835) As safe and safe food in food quality.

KEYWORDS: Bacteriocins, Nisin, Lactic acid, Antimicrobial activity, food safety, colony forming units (CFU), Food Generally Recognized as Safe (GRAS).

ÍNDICE

Agradecimientos	3
Resumen	4
Summary.....	6
ÍNDICE.....	8
Índice de figuras.....	10
Índice de tablas.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	16
1.1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
1.1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	17
1.1.3. PROBLEMAS ESPECÍFICOS	17
1.1.4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	17
1.1.5. OBJETIVO GENERAL	19
1.1.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
II. MARCO TEÓRICO	20
2.1. <i>Dosidicus gigas</i> , Orbigny 1835 (Calamar gigante).....	20
2.2. Bacteriocinas, clasificación y modo de acción.....	21
2.3. Nisina	22
2.4. Ácido láctico.....	24
2.5. Acción de la bacteriocina en los alimentos.....	25
2.6. Conservación	25
2.7. Aseguramiento de la inocuidad alimentaria	25
2.8. Unidades formadoras de colonia (UFC)	26
2.9. Alimento Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS)	26
2.10. Aditivo Alimentario	27
III. ANTECEDENTES	28
IV. HIPÓTESIS	34
4.1. Hipótesis principal.....	34
4.2. Hipótesis específicas	34
V. MATERIALES Y MÉTODOS	35

5.1.	Lugar de ejecución	35
5.2.	Tipo y diseño de investigación	35
5.2.1.	Tipo de investigación.....	35
5.2.2.	Diseño de la investigación.....	35
5.3.	Variables	36
5.3.1.	Variables independientes	36
5.3.2.	Variables dependientes	36
5.4.	Operacionalización de las variables	37
5.5.	Muestreo	37
5.6.	Procedimientos y análisis de datos	37
5.6.1.	Procedimientos	37
5.6.2.	Análisis de datos	38
5.7.	Aspecto ético	39
VI.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	40
6.1.	VI.1. RESULTADOS.....	40
6.1.1.	Recuento de Aerobios mesófilos totales, según tratamientos de nisina, ácido láctico, nisina más ácido láctico y tiempos de observación.....	40
6.1.2.	Recuento de Coliformes Totales, según tratamientos de nisina, ácido láctico, nisina más ácido láctico y tiempos de observación.....	41
6.1.3.	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> , según tratamientos de nisina, ácido láctico, nisina más ácido láctico y tiempos de observación.....	42
6.1.4.	Medidas del pH	43
6.2.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	43
6.2.1.	Análisis de los resultados para aerobios mesófilos totales.....	43
6.2.1.2.	Efecto del ácido láctico sobre el recuento de aerobios mesófilos totales, según tiempos de observación.....	46
6.2.2.	Análisis de los resultados para Coliformes totales	50
6.3.	Interpretación de resultados	56
VII.	DISCUSIONES	59
VIII.	CONCLUSIONES.....	61
IX.	RECOMENDACIONES	63
X.	REFERENCIAS CITADAS	64
XI.	ANEXOS	67

Índice de figuras

<i>Figura N° 1. Modo de acción de las bacteriocinas ácido lácticas</i>	21
<i>Figura N° 2. Estructura molecular de nisina.</i>	24
<i>Figura N° 3. Estructura molecular del ácido láctico de grado alimentario</i>	25
<i>Figura N°4. Diseño general del proceso experimental de inicio a fin de la tesis.</i>	36
<i>Gráfico N°1. Medias marginales estimadas del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8% y tiempos de observación a las 0H, 24H, 48H, 72H.</i>	45
<i>Gráfico N°2. Medias marginales estimadas del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tiempos de observación de 0H, 24H, 48H, 72H y tratamientos de nisina al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8%.</i>	45
<i>Gráfico N°3. Medias marginales estimadas del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8% y tiempos de observación a las 0H, 24H, 48H, 72H.</i>	47
<i>Gráfico N°4. Medias marginales estimadas del recuento de aerobios Mesófilos Totales (UFC/ml), según tiempos de observación de 0H, 24H, 48H, 72H y tratamientos de nisina al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8%.</i>	47
<i>Gráfico N°5. Medias marginales estimadas del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8% y tiempos de observación a las 0H, 24H, 48H, 72H.</i>	49
<i>Gráfico N°6. Medias marginales estimadas del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tiempos de observación de 0H, 24H, 48H, 72H y tratamientos de nisina más ácido láctico al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8%.</i>	49
<i>Gráfico N°7. Medias marginales estimadas del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8% y tiempos de observación a las 0H, 24H, 48H, 72H.</i>	51
<i>Gráfico N°8. Medias marginales estimadas del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tiempos de observación de 0H, 24H, 48H, 72H y tratamientos de nisina al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8%.</i>	51
<i>Gráfico N°9. Medias marginales estimadas del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de ácido láctico al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8% y tiempos de observación a las 0H, 24H, 48H, 72H.</i>	53
<i>Gráfico N°10. Medias marginales estimadas del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tiempos de observación de 0H, 24H, 48H, 72H y tratamientos de ácido láctico al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8%.</i>	53

*Gráfico N°11. Medias marginales estimadas del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8% y tiempos de observación a las 0H, 24H, 48H, 72H.*_____ 55

*Gráfico N°12. Medias marginales estimadas del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tiempos de observación de 0H, 24H, 48H, 72H y tratamientos de nisina más ácido láctico al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8%.*_____ 55

Índice de tablas

<i>Tabla Nº 1. Tabla de clasificación taxonómica de <i>Dosidicus gigas</i> (Orbigny, 1835).</i>	20
<i>Tabla Nº 2. Tabla de clasificación de las bacteriocinas</i>	22
<i>Tabla Nº3. Tabla de Operacionalización de variables</i>	37
<i>Tabla Nº 4. Tabla de recuento de Aerobios mesófilos totales, según tratamientos de nisina, ácido láctico, nisina más ácido láctico y tiempos de observación en horas.</i>	41
<i>Tabla Nº 5. Tabla de recuento de Coliformes totales, según tratamientos de nisina, ácido láctico, nisina más ácido láctico y tiempos de observación.</i>	42
<i>Tabla Nº 6. Tabla de medidas del pH realizadas al calamar gigante (<i>Dosidicus</i>)</i>	43
<i>Tabla Nº 7. Tabla de estadísticos descriptivos del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina y tiempos de observación.</i>	44
<i>Tabla Nº 8. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina y tiempos de observación.</i>	44
<i>Tabla Nº 9. Tabla de estadísticos descriptivos del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de ácido láctico y tiempos de observación.</i>	46
<i>Tabla Nº 10. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de ácido láctico y tiempos de observación.</i>	46
<i>Tabla Nº 11. Tabla de estadísticos descriptivos del recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico y tiempos de observación.</i>	48
<i>Tabla Nº 12. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico y tiempos de observación.</i>	48
<i>Tabla Nº 13. Tabla de estadísticos descriptivos del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina y tiempos de observación.</i>	50
<i>Tabla Nº 14. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina y tiempos de observación.</i>	50
<i>Tabla Nº15. Tabla de estadísticos descriptivos del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de ácido láctico y tiempos de observación.</i>	52
<i>Tabla Nº16. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Coliformes Totales (UFC/ml), según tratamientos de ácido láctico y tiempos de observación.</i>	52
<i>Tabla Nº 17. Tabla de estadísticos descriptivos del recuento de Coliformes Totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico y tiempos de observación.</i>	54
<i>Tabla Nº 18. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico y tiempos de observación.</i>	54

Tabla N° 19. Características nutricionales de productos cárnicos y pesqueros (Fuente: FAO y Latinfoods, 2002).

I. INTRODUCCIÓN

Dosidicus gigas, Orbigny 1835 (Calamar gigante) se encuentra ubicado a lo largo de la costa occidental de América del Sur, abarcando México, Perú y norte de Chile principalmente. Según la información de seguimiento de la pesquería artesanal, así como la distribución y estructura por tallas registradas durante la evaluación del calamar gigante en el 2015 representan altas perspectivas para una mayor explotación (Gamarra & Yamashiro, 2015) y exportación. El volumen de exportación peruana de Calamar gigante se ha incrementado notablemente, es por ello que, en éstos últimos años debido a los bajos precios y la gran variedad de presentaciones (Filetes, Tubos, Tiras, Dados, Aletas y Tentáculos, tanto fresca y congelada como cocida y congelada) surge una demanda internacional cada vez mayor. Es así que el principal destino extranjero de *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante) fue China, país que adquirió el producto entre enero y noviembre del 2014 por un monto de US\$ 166.3 millones, valor que generó un incremento de +53.4% en comparación al mismo tramo del 2013, siguiendo luego España con compras por US\$ 73.5 millones (+22.9%), Corea del Sur con demandas por US\$ 62.9 millones (+65.7%) y Tailandia destino importante pese a presentar un descenso en sus pedidos de -18.3% (facturación de 40.1 millones). En conjunto sólo estos países concentraron el 78% del total de exportaciones de Calamar gigante peruano (Sistema de Inteligencia Comercial ADEX Data Trade, 2015). Destacando como empresas peruanas exportadoras de calamar gigante figuran CNC S.A.C., Productora Andina de Congelados S.C.R.L., Seafrost S.A.C., Pacific Freezing Company S.A.C., Costa Mira S.A.C., Pesquera Exalmar S.A.A., Corporación De Ingeniería De Refrigeración S.R.L. y Perupez S.A.C. El Perú al igual que muchos países de América y del mundo reconoció en su momento la necesidad de controlar la producción de alimentos en todas sus etapas hasta el consumo, por ello, existen Autoridades Sanitarias en el país como (DIGESA, SANIPES y SENASA), responsables de la inocuidad de los alimentos y que a su vez

conforman la Comisión Multisectorial Permanente de Inocuidad Alimentaria (COMPIAL) que a pesar de brindar las garantía y seguridad durante el proceso de inocuidad alimentaria a los consumidores y productores de industrias alimentarias, no brindan la suficiente garantía para controlar el uso de colorantes artificiales, conservantes y aditivos especialmente de origen sintético como son el glutamato monosódico, grasas *trans*, nitrato sódico, nitrito de sodio y sulfatos, usados frecuentemente en los alimentos de origen cárnico (pollo, carne, pescado y Calamar), por lo que es alarmante, ya que se ha registrado un número de casos de infección por alimentos contaminados especialmente con *Staphylococcus aureus*, Coliformes Totales, Aerobios Mesófilos Totales causados por la inadecuada manipulación durante el proceso de envasado y/o almacenaje y por la acumulación de éstos conservantes de origen sintético químico en el organismo de las personas resultando así un fuerte impacto en la salud pública que resulta perjudicial tanto en niños como en adultos, presentando así enfermedades a mediano plazo (disentería, problemas respiratorios, de circulación sanguínea, cáncer al sistema digestivo, tumores en la glándula suprarrenal, daños al sistema nervioso, enfermedades cardiovasculares, espasmos musculares, disminución del sistema inmune, obesidad, insuficiencias cardíacas, disminución de calcio en los huesos, disminución en la concentración, alergias a la piel, etc). Es así que como alternativa se propone reemplazarlos por conservantes de origen natural, como es el caso de las bacteriocinas como la nisina que ha sido aprobada legalmente para su uso en alimentos por la Food and Drug Administration (FDA) y categorizada como Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS) (Berisnstain, *et al* 2012). La inocuidad de la nisina y el ácido láctico para organismos vivos y su rápida destrucción por enzimas del tracto gástrico e intestinal estimularon su amplio uso en muchos países, incluyendo los más estrictos en materia de regulaciones para aditivos alimenticios como los países de la unión Europea y los EUA, es así que actualmente se elabora nisina en China, Rusia, Polonia y Reino Unido y su empleo está permitido en unos 20 países (Calderón, 2009). Por lo que éste proyecto de investigación busca utilizar la efectividad de las bacteriocinas (nisina y ácido láctico) como conservantes naturales en el calamar gigante, para lograr

prolongar la vida útil de éste, logrando la disminución de microorganismos patógenos importantes involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos, como es el caso de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli*, *Salmonella* y provocar a su vez una menor afección en la salud de las personas, proporcionando así una barrera más de protección orgánica al producto (Calamar gigante).

1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento poblacional que viene experimentando el mundo, exige la planificación de estrategias que garanticen una mayor producción y calidad de alimentos disponibles (OMS, 2002). Así mismo, el consumo de pescado y/o productos marinos en el Perú creció 33% en los últimos cinco años, al pasar de un consumo promedio de 11.6kg en el 2010 a 15.4kg en 2014 al año por persona (ENAH0, 2015) así como el avance experimentado por la ciencia y la tecnología de los alimentos a lo largo de la historia de la humanidad, ha consolidado un espacio productivo sólido y heterogéneo que moviliza enormes cantidades de divisas a través de los intercambios comerciales, muchas veces entre países o regiones extremadamente distantes (CEPAL, 2008 y FAO, 2012). Es por ello que el conjunto de condiciones y medidas necesarias durante la adquisición de las materias primas como la producción, elaboración, almacenamiento, pueden sufrir interrupciones accidentales de la cadena de frío, lo cual indicaría un aumento en riesgos en cuanto a proliferaciones bacterianas en alimentos refrigerados (Frizzo, *et al.* 2013) y distribución de los alimentos para asegurar que una vez ingeridos no representen un problema apreciable para la salud en niños y adultos, provocando intolerancias, alergias en la piel, problemas a nivel del sistema nervioso, vascular, cardíaco, neuronal y/o sistema inmune u otras enfermedades provocadas por la ingesta y posterior acumulación de preservantes sintéticos en el organismo. En la industria de *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante) existe un alto

riesgo de contaminación microbiana que causa pérdidas económicas que repercuten en las exportaciones y sobretodo puede llegar a dañar la salud del consumidor por la acumulación de conservantes sintéticos por ingesta del producto y/o la carencia de mayores medidas de seguridad e inocuidad alimentaria.

1.1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Provocará la nisina, el ácido láctico y la combinación de nisina más ácido láctico una reducción en la carga bacteriana de Aerobios Mesófilos Totales, Coliformes Totales y *Staphylococcus aureus* en *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante)?

1.1.3. PROBLEMAS ESPECÍFICOS

- ¿Provocará la nisina una reducción en la carga bacteriana de Aerobios Mesófilos Totales, Coliformes Totales y *Staphylococcus aureus* en *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante)?
- ¿Provocará el ácido láctico una reducción en la carga bacteriana de Aerobios Mesófilos Totales, Coliformes Totales y *Staphylococcus aureus* en *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante)?
- ¿Provocará la combinación de nisina más ácido láctico una reducción en la carga bacteriana de Aerobios Mesófilos Totales, Coliformes Totales y *Staphylococcus aureus* en *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante)?

1.1.4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Dosidicus gigas, Orbigny 1835 (Calamar gigante) es un producto hidrobiológico muy apreciado en el mercado internacional, además de su alto valor nutritivo, bajo en calorías, bajo en grasas, de fácil preparación y

además de ser la segunda especie más abundante del mar peruano, hace que las exportaciones generen altas divisas al país. En el 2012, las exportaciones del calamar gigante congelado alcanzaron US\$367 millones y en el 2013 las exportaciones aumentaron en casi 9% (Chirinos, *et al.* 2015) por ello, la demanda del mercado exterior e interior es cada vez más creciente y exigente respecto al desarrollo de nuevos sistemas de protección sobre los alimentos conservados, lo cual incita a nuevos retos de investigación. Es así que la aplicación de la tecnología en conservación de alimentos cárnicos y alimentos en general, debe considerarse sólo como una medida adicional para las buenas prácticas de fabricación, procesamiento y distribución de los alimentos (Hugas, 1998). Actualmente existe una tendencia por el consumo de los alimentos cuyos conservantes sean naturales y menos químicos o procesados, es decir menos perjudiciales para la salud y que a su vez cumplan con los estándares de calidad e inocuidad exigidas por las normas para la utilización de agentes microbianos con alto espectro de efectividad contra microorganismos, por ende, la incorporación de bacteriocinas como la nisina y ácido láctico en alimentos refrigerados como es *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante) puede proporcionar una protección extra frente a la proliferación de diversos tipos de microorganismos sobre todo patógenos. Las Enfermedades transmitidas a través de los alimentos (ETAS) son comúnmente diarreas, hepatitis B, Tifoidea, Fiebre Malta, etc. (Grande, *et al* 2011). Todas ellas solo provienen de alimentos contaminados es así que los peligros que tienen estos alimentos, pueden ser de tipo físicos (moscas, pelos, trazas de metal, etc.), químicos (detergentes, lubricantes, etc.) pero sobre todo biológicos (bacterias, virus, etc.) por ello, se necesita realizar la reducción de la carga microbiana que representa un efecto positivo en la seguridad alimentaria de los consumidores de productos cárnicos, es así que en el caso de *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante) por ser un alimento altamente perecedero (Moreno, 2012) resulta ser un medio óptimo para el desarrollo de microorganismos. Al reemplazar los conservantes sintéticos por conservantes de origen natural como son las bacteriocinas y utilizándolas a bajas concentraciones en los alimentos, resultan ser inhibidores de la carga microbiana (Beshkova & Fregaba, 2012)

y ello mejora las condiciones para su conservación; y por ende alargará el tiempo de vida útil del producto, mediante el uso de conservantes naturales como son la nisina y el ácido láctico.

1.1.5. OBJETIVO GENERAL

- Conservar Calamar gigante (*Dosidicus gigas*, Orbigny 1835) por tratamiento combinado de nisina y ácido láctico a 6°C.

1.1.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la acción antibacteriana de nisina a concentraciones de 0%, 0.2%, 0.5% y 0.8% frente a Aerobios Mesófilos Totales, Coliformes Totales y *Staphylococcus aureus* a intervalos de 0, 24, 48 y 72 horas a 6°C.
- Evaluar la acción antibacteriana del ácido láctico a concentraciones de 0%, 0.2%, 0.5% y 0.8% frente a Aerobios Mesófilos Totales, Coliformes Totales y *Staphylococcus aureus* a intervalos de 0, 24, 48 y 72 horas a 6°C.
- Evaluar la acción antibacteriana de la combinación de nisina más ácido láctico a concentraciones de 0%, 0.2%, 0.5% y 0.8% frente a Aerobios Mesófilos Totales, Coliformes Totales y *Staphylococcus aureus* a intervalos de 0, 24, 48 y 72 horas a 6°C.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante)

El calamar de Humboldt, calamar gigante, jibia gigante, pota o potón del Pacífico es un molusco cefalópodo de gran tamaño y abundante en las costas peruanas y mexicanas. En estos países se practica la pesca industrial de este recurso y actualmente ha ganado importancia gracias a una fuerte demanda internacional. Es un invertebrado de crecimiento rápido con un sistema nervioso complejo y un sistema visual bien desarrollado. El cuerpo del calamar tiene dos regiones. La cabeza, que está unida a los brazos (de ahí se deriva el término cefalópodo) y el manto que se caracteriza por ser en forma cilíndrica, el cual envuelve a los órganos internos. Es un organismo pelágico que se distribuye en el Océano Pacífico Oriental desde la frontera de Estados Unidos y México recorriendo el Perú hasta Chile. A pesar de su gran tamaño y peso (puede alcanzar 2 metros y pesar 45 kg aproximadamente), es capaz de dar grandes saltos fuera del agua. *Dosidicus gigas* (Calamar gigante) es considerado un depredador activo y voraz, lo cual sumado a su corto ciclo de vida y amplia plasticidad ecológica lo convierten en un organismo oportunista que se adapta rápidamente a los cambios según las condiciones ambientales (Salinas *et al.* 2007).

Tabla N° 1. Tabla de clasificación taxonómica de *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835).

Reino	Animalia
Filo	Mollusca
Clase	Cephalopoda
Orden	Teuthida
Familia	Ommastrephidae
Subfamilia	Ommastrephinae
Género	<i>Dosidicus</i> (Steenstrup, 1857)
Especie	<i>Dosidicus gigas</i> (Orbigny, 1835)

2.2. Bacteriocinas, clasificación y modo de acción

Las bacteriocinas son sustancias peptídicas con actividad antimicrobiana, producidas por diferentes cepas bacterianas, estos péptidos inhiben el crecimiento de cepas bacterianas (aunque de reducido espectro, ya que solo actúa sobre cepas similares a las bacterias que las producen relacionadas filogenéticamente, aunque también se ha observado que inhiben a otras bacterias, además de hongos y algunos parásitos). Son termoresistentes, e hidrolizadas por las proteinasas gástricas, activas a pH bajo, inocuas para los consumidores y estables en los alimentos, son utilizados como conservantes naturales en la industria alimentaria. El empleo de productos biológicos como las bacteriocinas inhiben microorganismos patógenos y es de gran interés en la industria alimentaria que tiene como objetivo final la obtención de alimentos más seguros para el consumidor.

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas son las más abundantes, poseen mayor diversidad estructural, poseen un espectro de acción amplio, pueden inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos, virus e incluso de células provenientes de humanos y bovinos.

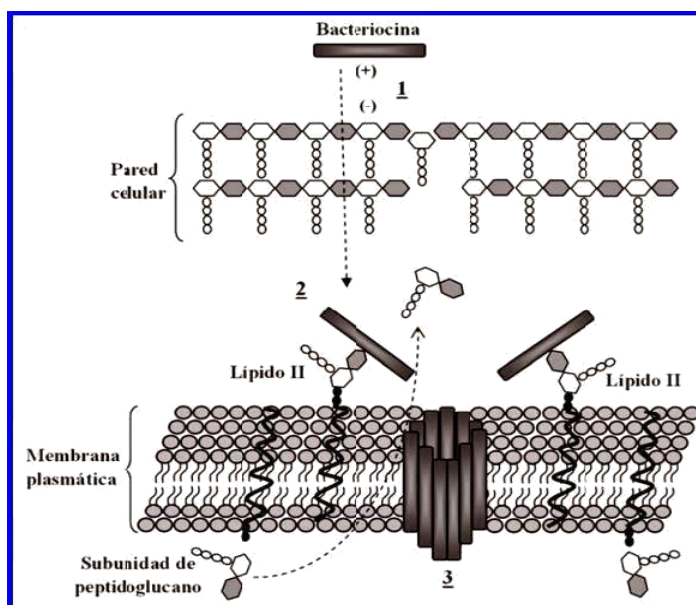


Figura N° 1. Modo de acción de las bacteriocinas ácido lácticas

La mayoría de las bacteriocinas corresponde a las producidas por las bacterias ácido lácticas (BAL), por ello, se clasifican a estas bacteriocinas en clase I o Lantibióticos (para las que contienen lantionina) y Clase II, para las demás bacteriocinas (Márquez, J & García, C. 2007).

Tabla N° 2. Tabla de clasificación de las bacteriocinas

CLASE	SUBCLASE	CARACTERÍSTICAS	EJEMPLOS
I: Lantibióticos Contienen aminoácidos poco comunes como lantionina, metil-lantionina, dehidrobutirina y dehidroalanina	Ia	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Péptidos pequeños, catiónicos en forma de espiral 	<ul style="list-style-type: none"> • Nisina A y Z • Epidermina
	Ib	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Péptidos aniónicos o neutros de forma globular 	<ul style="list-style-type: none"> • Mesardicina • Mutacina A • Cinamicina
II: No lantibióticos Son péptidos termoestables (110°-121°C) con masas moleculares de 10 kDa. No contiene aminoácidos modificados.	II a	<ul style="list-style-type: none"> • Péptidos activos contra <i>Listeria</i> • Tienen la secuencia en la región N-terminal TGNGVXC 	<ul style="list-style-type: none"> • Pediocina PA-1 • Sakacina P
	II b	<ul style="list-style-type: none"> • Requieren de dos péptidos diferente para una mejor actividad antimicrobiana 	<ul style="list-style-type: none"> • Lactococcina G • Plantaricinas EF y JK.
	II c	<ul style="list-style-type: none"> • Se transportan mediante péptidos líder • Algunos son sec-dependientes • Pueden ser de dos tipos: Antibióticos sin cisteína y con 1 ó 2 residuos de cisteína 	<ul style="list-style-type: none"> • Divergicina A • Acidocina B • Enterocina B
III Péptidos grandes termolábiles		<ul style="list-style-type: none"> • Poseen una masa molecular mayor de 30 kDa • La mayoría son producidos por el genero <i>Lactobacillus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Helveticina J • Acidofilicina A • Lactacinas A y B
IV Bacteriocinas complejas		<ul style="list-style-type: none"> • Son proteínas con lípidos y/o carbohidratos para ser activos 	<ul style="list-style-type: none"> • Lactocina 27 • Pediocina SJ-1

2.3. Nisina

Es una bacteriosina codificada como E 234, la nisina es un antibiótico peptídico policíclico, usado como bioconservante y es sintetizada de forma natural por la bacteria *Lactococcus lactis*, se conoce las propiedades

conservantes desde la década de los años cuarenta (Gálvez et al. 2007). La molécula contiene diversos aminoácidos (como la lantionina y el B-metil lantionina), principalmente en la industria alimentaria es empleada en la elaboración de productos lácteos, quesos, aderezos para ensaladas, verduras, e incluso cerveza. La molécula de nisina posee una treintena de aminoácidos, algunos de ellos poco comunes como son: la lantionina, la metilantionina, la dehidroalanina y el ácido dehidroaminobutírico. Es un antibiótico (lantibiótico) muy efectivo contra las bacterias gram-positivas relacionadas con enfermedades transmitidas por alimentos. Su efecto sobre estas bacterias es el de bloquear sus membranas. Se emplea igualmente para combatir las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus*, y *Listeria*.

La nisina es bastante resistente a los tratamientos térmicos, especialmente en aquellos que se realizan en medio ácido (por regla general con pH menor de 3.5). En la industria alimentaria es empleada como conservante en especial en la prevención de las posibles alteraciones del queso. Así también se ha empleado la nisina en la protección de diversas carnes (tanto crudas como pre-cocinadas) mostrando alguna efectividad en la protección contra la listeria (debido a la aparición de cepas de *L. monocytogenes*). Se sabe que la nisina actúa como un compuesto despolarizante en membranas bacterianas energizadas y crea poros en la membrana lipídica. Las bacterias lácticas también poseen efectos antimicrobianos frente a microorganismos patógenos, lo que permitirá hipotetizar acerca de los diversos modelos teóricos y experimentales de antagonismo microbiano mediado por las bacterias lácticas (Hernández et al. 1993).

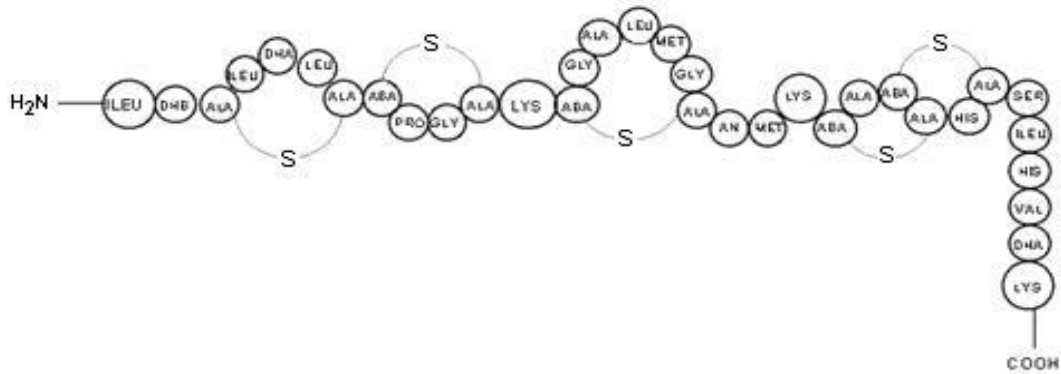


Figura N° 2. Estructura molecular de nisina.

2.4. Ácido láctico

El ácido láctico tiene un amplio rango de aplicaciones en la industria alimenticia, química, farmacéutica, cosmética y entre otras. Recientemente se ha acelerado la investigación biotecnológica en ácido láctico L (+) y D (-) debido a su posibilidad de transformación en poli-láctico biodegradable (PLA). Los esfuerzos en la investigación del ácido láctico, están enfocados a disminuir los costes de producción a través de nuevos sustratos, nuevas tecnologías de fermentación y separación, y nuevos microorganismos capaces de alcanzar altas concentraciones de ácido láctico, altos rendimientos y altas productividades. El ácido láctico fue descubierto en 1780 por el químico sueco Scheele, quien lo aisló de leche agria, fue reconocido como producto de fermentación por Blonodeaur en 1847 y tan solo en 1881, Littlelon inicia la fermentación a escala industrial. Es un compuesto muy versátil utilizado en la industria química, farmacéutica, de alimentos y de plásticos. Existen dos isómeros ópticos, el D (-) láctico y el L (+) láctico y una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas D (-) y L (+). A diferencia del isómero D (-), la configuración L (+) es metabolizada por el organismo humano. Ambas formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizadas y se pueden producir polímeros con diferentes propiedades dependiendo de la composición.

El ácido láctico puede ser obtenido por vía química o biotecnológica. La producción química está basada en la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) para dar lactonitrilo, el cual puede ser hidrolizado a ácido

láctico; otro tipo de reacción se basa en la reacción a alta presión de acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador.

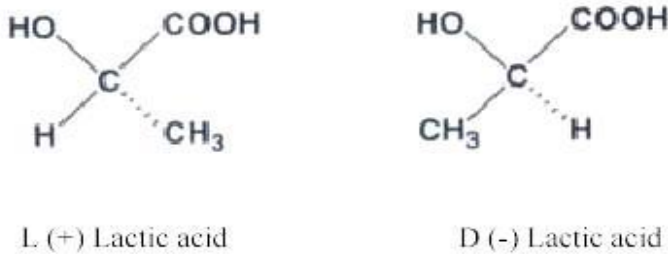


Figura N° 3. Estructura molecular del ácido láctico de grado alimentario

2.5. Acción de la bacteriocina en los alimentos

La carga positiva de la bacteriocina, incrementa la interacción con las cargas negativas de los componentes de la pared celular, luego se une al Lípido II, que es un transportador de las unidades de peptidoglucano, del citoplasma a la pared, interfiriendo así la síntesis de péptido glucano y posteriormente produciendo la muerte de la bacteria. Finalmente varias moléculas de bacteriosinas se unen al Lípido II para anclarse a la membrana y empezar la formación de poros, provocando una rápida muerte celular.

2.6. Conservación

También llamado como biopreservación o preservación, el cual hace referencia a la utilización de aditivos de grado alimentario de origen natural (no sintético), que en éste caso es aplicado únicamente a los alimentos con el propósito de prolongar la vida útil del alimento.

2.7. Aseguramiento de la inocuidad alimentaria

Debe de basarse en tres soportes fundamentales como son:

- La implementación de las BPM (Buenas Practicas de manipulación).

- Implementación de los POES o Programas de Higiene y Saneamiento.
- Implementación de un plan de calidad como el HACCP (Análisis de los puntos críticos de control).

También debe considerarse el orden en las instalaciones, en el proceso y en la elaboración del producto alimentario.

2.8. Unidades formadoras de colonia (UFC)

Se denomina unidad formadora de colonia (UFC) a una célula viva y aislada que se encuentra en un substrato y que en condiciones ambientales adecuadas producen una colonia en un breve lapso de tiempo (Antonio G 2003). UFC es el número mínimo de células separables sobre la superficie o dentro de un medio de agar semisólido que da lugar al desarrollo de una colonia visible del orden de decenas de millones de células descendientes (Trevlean A 2010). Las UFC indican el grado de contaminación microbiológica de un ambiente o muestra.

2.9. Alimento Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS)

La *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) tiene un sistema mediante el cual los productores de alimentos pueden obtener la aprobación de los aditivos que emplean en sus productos. Este sistema se basa en el listado de ingredientes o alimentos GRAS (Generally Recognized As Safe o generalmente reconocidos como seguros) que conforme a los artículos 201 (s) y 409 de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (la Ley), cualquier sustancia que se agrega intencionalmente a los alimentos es

un aditivo alimentario, que está sujeto a revisión y aprobación previa de la FDA, a menos que la sustancia haya sido reconocida, por expertos cualificados, como es el caso del ácido láctico.

2.10. Aditivo Alimentario

Se entiende por aditivo alimentario cualquier sustancia que como tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos que tengan o no valor nutritivo y cuya adición intencionada al alimento es con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características (Codex alimentario 1995).

III. ANTECEDENTES

Ramos (2015) realizó un estudio basado en bacteriocinas empleando tratamientos combinados de nisina y ácido láctico para el aseguramiento de la calidad microbiológica en conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*, L. 1819) donde evaluó la acción antibacteriana de acuerdo al recuento de las unidades formadoras de colonia por mililitro de *Echerichia coli*, Coliformes totales, Aerobios mesófilos totales y usando para dicho fin placas Petrifilm 3M sometidas a evaluación en tiempos de 0,24,48,72 horas y a diferentes concentraciones $\geq 0.5\%$. Donde obtuvo mayor eficacia con la combinación del tratamiento de nisina más ácido para Aerobios mesófilos totales obteniendo así 16×10^4 UFC/ml, con ácido láctico para Coliformes totales y con nisina para la inhibición bacteriana de *Staphylococcus sp.*

Gamarra & Yamashiro (2015) realizaron un reporte sobre el calamar gigante en aguas peruanas durante el 2014 con estimaciones favorables para el 2015, ellos indican que desde el año 2000 *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 “Calamar gigante” ha mostrado un cambio importante respecto a su abundancia y estructura poblacional e indican también que es debido a cambios en el ambiente, aseguran que dicha abundancia se ve incrementada en el 2014, respecto a los años anteriores, ellos reportaron un aumento de tamaño corporal, alta abundancia y alta disponibilidad de reclutas, así como de la significativa presencia de ejemplares adultos de grandes tamaños, por ello estiman que para el 2015, ésta disponibilidad aumentará en gran medida y ello será favorable para el mayor aprovechamiento de éste recurso hidrobiológico de manera sostenible.

Chirinos *et al.* (2015) evaluaron la factibilidad económica de un Plan de Negocio orientado a la exportación de *Dosidicus gigas* (Calamar gigante o pota peruana) en la provincia de Paita a través del procesamiento y la exportación de sus derivados. Ellos analizaron la viabilidad del producto (abundancia, valor nutritivo y variedad de usos), el mercado objetivo para la exportación de derivados de la pota (China, Singapur, España) e

identificaron aquellos derivados con mayor potencial de demanda y factibilidad de producirse en Paita, así mismo, determinaron las características de la cadena productiva de derivados de la pota en el puerto de Paita y los problemas y oportunidades que muestra el sector. Ellos concluyeron que la exportación de pota es económicamente rentable, según los análisis de riesgos, inclusive frente a variaciones de los precios de compra de la materia prima y venta del producto final.

Moreno, P (2012) estudió la reducción de la carga microbiana en la carne de pollo mediante el uso de bactericidas orgánicos para atacar grupos generales de microorganismos utilizando para dicho estudio ácido láctico que afecta principalmente a microorganismos Gram negativos y Nisina que afecta a microorganismos Gram positivos, para lo cual utilizó soluciones de ácido láctico al 1%, 2% y soluciones de Nisina con 300 y 500 ppm, aplicando el método de inmersión con tiempos de 5 y 10 minutos y temperaturas de almacenamiento de 4 y 18 °C, para la cuantificación de microorganismos analizados utilizó el método de película seca rehidratante (*Petrifilm*) resultando la eliminación de Aerobios en un 99.25% y Coliformes totales en un 99.30%.

Beshkova, & Frengova (2012) mencionan su interés en la investigación de la bacteriocina y su importancia biotecnológica para la industria láctea, dicen que las bacteriocinas son péptido bioactivos o proteínas que muestran actividad antimicrobiana frente a otras bacterias y que durante las dos últimas décadas ha habido un gran interés de investigación sobre bacterias de ácido láctico (LAB) bacteriocinas, principalmente debido a su potencial aplicación como bioconservantes en alimentos y productos alimenticios para inhibir el crecimiento bacteriano. Debido a la complejidad de la matriz del alimento y la dificultad de cuantificar bacteriocina en los alimentos, en los estudios *in vitro* se puede realizar el estudio de la funcionalidad *situ* de entrantes bacteriocinogénicas. La producción de bacteriocinas es más prometedor para un uso rápido, generalizado, y legal de bacteriocinas para lograr la fermentación deseable y un producto final seguro.

Beristain & Palou *et al.* (2012) explican la acción de la bacteriocina en la industria alimentaria y su utilización en alimentos cárnicos, lácteos, productos enlatados, productos marinos (pescados), vegetales, jugo de frutas, bebidas como cerveza y vino. Así como también explica de sus características y la compatibilidad en dichos productos, indican el modo de acción según el tipo de bacteriocina que resulta muy atractiva para la industria alimentaria y que también puede llegar a sustituir a otros preservantes químicos de origen sintético. Así mismo refieren que las bacteriocinas debido a su naturaleza proteica son inactivadas por proteasas incluyendo las de origen pancreático y gástrico por ello debido a su paso por el tracto gastrointestinal son inactivadas sin ser absorbidas como compuestos activos resultando finalmente inocuas para el consumidor.

Ramos (2011) realizó una investigación sobre la biopreservación de conchas de Abanico con Ácido Láctico y Yogurt Natural, analizó la acción antimicrobiana frente a los microorganismos presentes en las conchas de abanico, utilizando el método de Incorporación, diseminación y la determinación de Presencia y Ausencia para los microorganismos de importancia sanitaria (*E.coli*, *V. cholerae*, *Salmonella sp.* y *S. aureus*) por administración de ácido láctico y yogurt natural. Donde a concentraciones de 0,8% de ácido láctico logró la inhibición del crecimiento bacteriano sin alterar las características organolépticas de la concha de abanico mientras que la acción del yogurt natural sobre las muestras procesadas produjo una inhibición parcial para las enterobacterias, vibrios y salmonellas, pero con mayor eficacia para mesófilos aerobios sin modificar sus características organolépticas (resequedad, pérdida de color).

Grande *et al.* (2011) realizaron una *revisión* respecto a las bacteriocinas y a las cepas bacterianas que las producen, así como su aplicación para la *conservación* de los alimentos por métodos naturales (Bioconservación). Indican los productos cárnicos desde la materia prima hasta productos elaborados se han empleado bacteriocinas como nisina, pediocinas y otras individualmente o aplicadas con otros antimicrobianos (como ácidos orgánicos o agentes quelantes) o tratamientos (como el calor, *las altas*

presiones o la luz pulsada) para la inactivación de bacterias patógenas o alterantes. También indican que las cepas de bacterias lácticas seleccionadas por su capacidad productora de bacteriocinas ofrecen buenas perspectivas como cultivos protectores, pero sobre todo como cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos fermentados, mejorando la seguridad microbiológica de los mismos.

Salinas y Bazzino *et al.* (2007) observaron la presencia de *Dosidicus gigas* “Calamar gigante” en toda el área que concierne las Investigaciones Mexicanas de la *Corriente de California* - IMECOCAL durante el periodo 2004–2007, predominantemente en las zonas de Punta Baja y Punta Eugenia. Ellos realizaron marcaje satelital de 4 calamares *adultos* frente a Bahía Mailo, estos mostraron desplazamiento con dirección sur y un patrón de migraciones verticales diarias con una clara preferencia por aguas profundas, frías e hipóxicas durante el día, y aguas superficiales, más cálidas y oxigenadas durante la noche. *Dosidicus gigas* es considerado un depredador activo y voraz, lo cual sumado a su corto ciclo de vida y amplia plasticidad ecológica lo convierten en un organismo oportunista que se adapta rápidamente a los cambios en las condiciones ambientales. Ellos resaltan el comportamiento del calamar frente a El Niño de 1997, 1998, 2005 y cuyo desplazamiento es hacia las afueras del Golfo de California concentrándose en el océano pacífico frente a Bahía Magdalena.

Gálvez *et al.* (2007) realizaron una recopilación sobre la importancia de las bacteriocinas, sus orígenes y modo de acción. Indican que muchas bacteriocinas actúan en células sensibles, desestabilizan y permeabilizan la membrana citoplasmática por medio de la formación de poros transitorios o canales iónicos que causan la reducción de la fuerza motriz de la célula debido a la interacción con polímeros aniónicos que constituyen la pared celular. La composición y distribución de los fosfolípidos de la membrana celular influye en la eficiencia de la asociación de la bacteriocina con el citoplasma, su inserción y la formación del poro, es por este fenómeno que se debe la resistencia de los microorganismos a las bacteriocinas. La actividad antibacteriana se desarrolla en la fase logarítmica temprana y en

la fase estacionaria por lo que, a la hora de aplicar las bacteriocinas a un alimento a partir de un cultivo iniciador o para su purificación aumenta la efectividad del proceso de acción de estos compuestos ante microorganismos patógenos, es decir mayor eficacia en la conservación de alimentos.

Caplice y Fitzgerald (1999) indica que la conservación o preservación de los alimentos por fermentación asegura la vida útil del alimento incrementando la seguridad microbiológica pero que a su vez puede hacer que algunos alimentos sean más digeribles. Las bacterias ácido lácticas debido a sus únicas características metabólicas intervienen en muchos procesos de fermentación de leches, carnes, cereales y verduras, aunque muchas fermentaciones son dependientes de la inoculación de un cultivo protector está disponible para muchos procesos comerciales como la fabricación de queso que asegure consistencia de proceso y calidad del producto, mencionan que la contribución de las investigaciones respecto a los adelantos en las bacterias ácido lácticas proporcionará mejorías en los alimentos y que esto beneficiará al consumidor y al productor.

Ennahar *et al.* (1999) señalaron que a partir de una variedad de péptidos antimicrobianos sintetizados a nivel del ribosoma o bacteriocinas producidas por las bacterias ácidas lácticas, se han podido identificar y caracterizar, por ello, las bacteriocinas son usadas como aditivos útiles en los alimentos con efecto antimicrobianos, dicho estudio resalta la clasificación de las bacteriocinas y el empleo de las mismas para la seguridad alimentaria con la finalidad de prolongar la vida útil del alimento.

Montville (1995) indica que los reportes de estudio de las bacteriocinas en genética, purificación, y propiedades, sobre la acción antimicrobiana es poco conocida, así como de la fisicoquímica de la interacción de la bacteriocina-patógeno y de las variables que influencien la eficacia de las bacteriocinas en los alimentos. El conocimiento más amplio es el requisito previo a las aplicaciones de las bacteriocinas para aumentar su eficacia por la ingeniería genética, estudios mecánicos que usan las esporas como los blancos de las bacteriocinas son relativamente pocos, a su vez mencionan

que algunos alimentos con proteína creciente o fosfolípida disminuyen la efectividad de nisina contra el crecimiento *Clostridium botulinum*.

Cleveland (2001) indica los diferentes usos de las bacteriocinas, realizó una comparación de la síntesis, el modo de la acción, resistencia y seguridad en los alimentos, explica la existencia de proteínas antibacterianas producidas por bacterias que bloquea el crecimiento de otras bacterias. Muchas bacterias ácido lácticas producen una diversidad alta de bacteriocinas diferentes producidas por alimentos fermentados y no fermentados, como es el caso de la nisina que es actualmente la única bacteriocina usada ampliamente como un conservador de alimento, se han caracterizado muchas bacteriocinas bioquímicamente y genéticamente, aunque hay un conocimiento básico de su estructura, función, biosíntesis y modo de acción, aún existen muchos aspectos desconocidos de estos compuestos.

IV. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis principal

- El tratamiento combinado de Nisina y Ácido láctico a 6°C conserva el Calamar gigante (*Dosidicus gigas*, Orbigny 1835).

4.2. Hipótesis específicas

- La nisina a concentraciones de 0.2%, 0.5%, 0.8%, a intervalos de 0, 24, 48, 72 horas y a 6°C puede ejercer una acción antibacteriana frente a aerobios mesófilos totales, Coliformes totales y *Staphylococcus aureus*.
- El ácido láctico a concentraciones de 0.2%, 0.5%, 0.8% a intervalos de 0, 24, 48, 72 horas y a 6°C puede ejercer una acción antibacteriana frente a aerobios mesófilos totales, Coliformes totales y *Staphylococcus aureus*.
- La combinación de nisina más ácido láctico a concentraciones de 0.2%, 0.5%, 0.8%, a intervalos de 0, 24, 48, 72 horas y a 6°C puede ejercer una acción antibacteriana frente a aerobios mesófilos totales, Coliformes totales y *Staphylococcus aureus*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar de ejecución

La realización de la tesis se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Biología y Genética Molecular, así como también el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Ricardo Palma ubicado en la Av. Benavides 5440, distrito de Santiago de Surco, Provincia de Lima - Perú.

5.2. Tipo y diseño de investigación

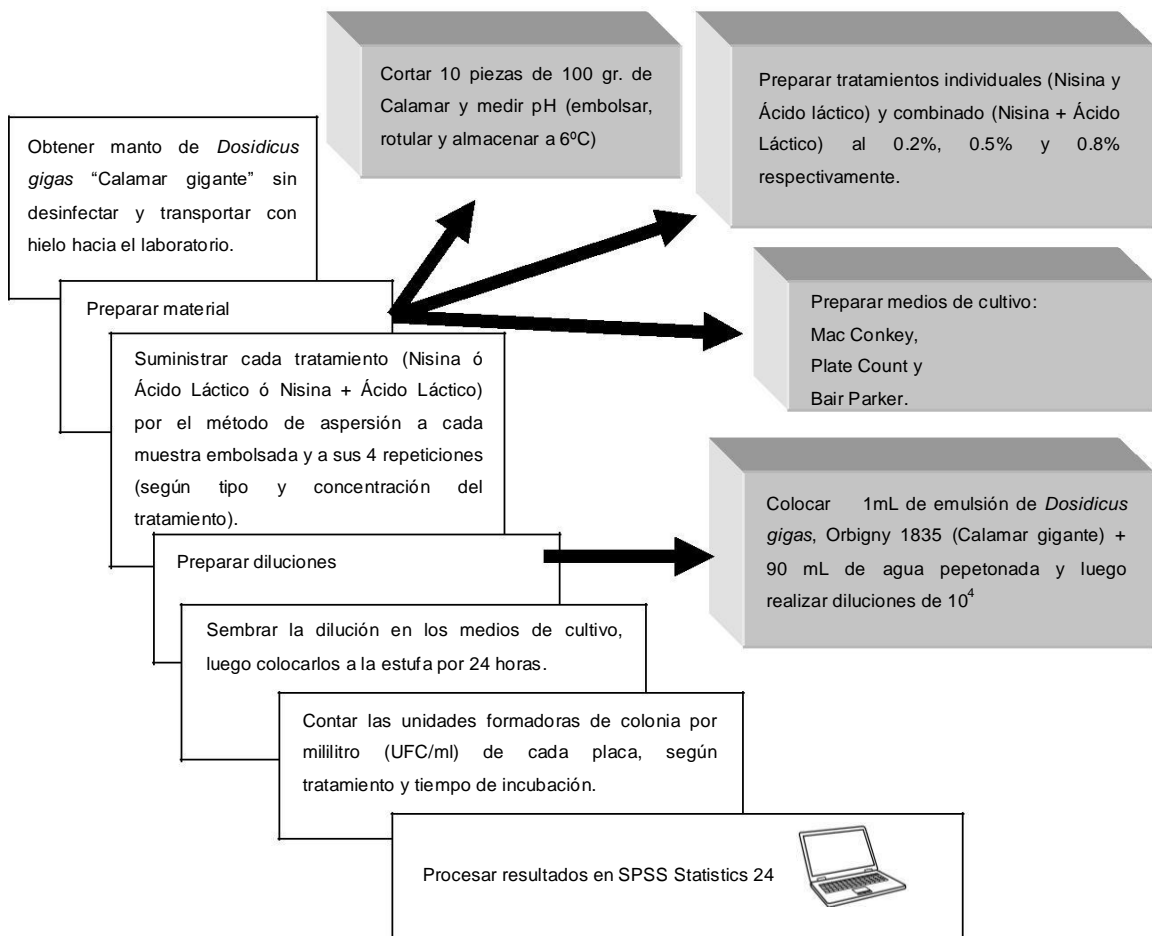
5.2.1. Tipo de investigación

El tipo de Investigación es aplicada y experimental referente a la calidad e inocuidad de los alimentos.

5.2.2. Diseño de la investigación

El diseño de investigación constó de 3 etapas fundamentalmente:

Figura N°4. Diseño general del proceso experimental de inicio a fin de la tesis.



5.3. Variables

5.3.1. Variables independientes

- Concentración de Nisina (%).
- Concentración de Ácido láctico (%).
- Concentración de nisina más ácido láctico (%).
- Tiempo.

5.3.2. Variables dependientes

- Aerobios mesófilos totales.

- Coliformes totales.
- *Staphylococcus aureus*.

5.4. Operacionalización de las variables

Tabla N°3. Tabla de Operacionalización de variables

VARIABLES	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN
Concentración de nisina	Cuantitativo	Porcentaje (%)	Ordinal
Concentración de ácido láctico	Cuantitativo	Porcentaje (%)	Ordinal
Concentración de nisina más ácido láctico	Cuantitativo	Porcentaje (%)	Ordinal
Tiempo	Cuantitativo	Horas (H)	Ordinal
Aerobios mesófilos totales	Cuantitativo	UFC/ml	Ordinal
Coliformes totales	Cuantitativo	UFC/ml	Ordinal
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cuantitativo	UFC/ml	Ordinal

5.5. Muestreo

Se utilizó únicamente el manto de un sólo espécimen de *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante) que contó con un peso de 7.5 kg. Aproximadamente.

5.6. Procedimientos y análisis de datos

5.6.1. Procedimientos

ETAPA I: Se midió el pH, se realizó cortes de 10 gr. únicamente del manto de *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante) sin lavar, se suministró 2 ml de cada tratamiento previamente diluido a 10^4 (10 gr de *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 “Calamar gigante” en 90 ml de agua peptonada) y se refrigeró cada pieza de 100 gr. en bolsas ziploc independientemente. Se preparó medios de cultivo Agar Bair Parker, Agar Mac Conkey y Plate

Count, se autoclavó, se sirvió de 15 ml de medio en placas Petri 90 x 15 mm y se incubó a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en la estufa. Para la preparación del tratamiento de nisina, ácido láctico y tratamiento combinado de nisina más ácido láctico, se realizó a concentraciones de 0.2%, 0.5%, 0.8% respectivamente para cada caso.

ETAPA II: Por el método de aspersión se suministró el tratamiento de Nisina a concentraciones de 0.2, 0.5, 0.8% así mismo se aplicó el mismo método para la suministración del tratamiento de ácido láctico y el tratamiento combinado de nisina más ácido láctico.

ETAPA III: se midió el pH, luego se realizó la evaluación después de cada 24 horas de incubación (37°C y en tiempos de 0, 24, 48 y 72 horas respectivamente) teniendo en cuenta la concentración individual de los tratamientos de Nisina, Ácido láctico y la del tratamiento combinado de Nisina más Ácido láctico (0.2%, 0.5% y 0.8% respectivamente) para todos los casos y con 4 repeticiones por cada tratamiento para la evaluación de aerobios mesófilos totales, coliformes totales y *Staphylococcus aureus* respectivamente.

5.6.2. Análisis de datos

Se realizó un análisis bifactorial 4x4 con ayuda del programa estadístico IBM SPSS Statistics 24 para determinar los estadísticos descriptivos, el análisis de varianza (ANOVA) y los gráficos respectivos de los tratamientos de acuerdo al tiempo sobre el recuento de bacterias (aerobios mesófilos totales, coliformes totales y *Staphylococcus aureus*) cuantificando las UFC/ml de cada placa sembrada pasada las 24 horas de incubación, según concentración de los tratamientos (0.3, 0.5 y 0.8% de Nisina, Ácido láctico y Nisina más Ácido láctico).

5.7. Aspecto ético

Se cumplen con los criterios éticos en la utilización de *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante).

VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

6.1. VI.1. RESULTADOS

Como resultado de la administración de los tratamientos individuales de nisina, ácido láctico y el tratamiento combinado de nisina más ácido láctico, se conservó el calamar gigante (*Dosidicus gigas*, Orbigny 1835) debido a la acción antibacteriana mostrada frente a aerobios mesófilos totales y coliformes totales de acuerdo a la concentración de cada tratamiento (0%, 0.2%, 0.5% y 0.8%), al tiempo de observación (0, 24, 48 y 72 horas) y a temperatura de 6°C.

Para ello se realizó un recuento de aerobios mesófilos totales, coliformes totales y *Staphylococcus aureus* (UFC/ml), dando como resultado del estudio los siguientes datos mostrados a continuación mediante tablas.

*La cuantificación de las UFC/ml se encuentran a una dilución de 10^4 .

6.1.1. Recuento de Aerobios mesófilos totales, según tratamientos de nisina, ácido láctico, nisina más ácido láctico y tiempos de observación.

Tabla N° 4. Tabla de recuento de Aerobios mesófilos totales, según tratamientos de nisina, ácido láctico, nisina más ácido láctico y tiempos de observación en horas.

TIEMPO DE OBSERVA	TRATAMIENTOS									
	Nisina			Ácido láctico			Nisina más Ácido láctico			Control
	0,20%	0,50%	0,80%	0,20%	0,50%	0,80%	0,20%	0,50%	0,80%	H2O
0 H	406	327	256	486	404	259	418	187	91	483
	350	288	204	400	369	282	320	195	80	429
	342	291	242	451	388	258	356	179	79	477
	369	330	270	423	371	192	378	177	99	454
24 H	1380	852	594	1080	1184	960	1046	478	104	1691
	1358	798	480	1220	912	708	1152	466	176	1750
	1296	840	528	1112	768	594	1066	492	112	1733
	1406	912	432	1272	798	654	1136	516	152	1685
48 H	1928	1640	984	2068	1796	960	1116	638	209	2252
	1916	1698	1072	2064	1850	936	1195	594	202	2260
	1900	1672	1096	2036	1796	972	1001	554	242	2216
	2019	1736	1076	2188	1728	996	1030	590	267	2308
72 H	1696	1448	894	1640	1432	592	1160	644	276	1892
	1756	1406	904	1636	1264	588	1256	528	256	1968
	1740	1328	888	1776	1304	660	1240	650	238	1856
	1750	1384	976	1772	1088	435	1156	604	268	1928

La tabla N° 4 muestra el recuento de Aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina, ácido láctico y nisina más ácido láctico y tiempos de observación a las 0, 24, 48, 72 horas.

6.1.2. Recuento de Coliformes Totales, según tratamientos de nisina, ácido láctico, nisina más ácido láctico y tiempos de observación.

Tabla N° 5. Tabla de recuento de Coliformes totales, según tratamientos de nisina, ácido láctico, nisina más ácido láctico y tiempos de observación.

TIEMPO DE OBSERVACIÓN	TRATAMIENTOS									
	Nisina			Ácido láctico			Nisina más Ácido láctico			Control
	0,20%	0,50%	0,80%	0,20%	0,50%	0,80%	0,20%	0,50%	0,80%	H2O
0 H	373	205	166	410	257	152	358	118	75	449
	397	212	151	473	209	124	339	152	72	495
	359	271	168	451	248	122	352	123	69	458
	423	249	175	392	262	121	379	181	77	501
24 H	1320	944	586	1345	872	566	1220	448	164	1652
	1400	918	604	1301	898	575	1108	508	202	1896
	1388	930	514	1287	944	558	1240	562	214	1708
	1328	999	562	1313	840	560	1136	576	188	1784
48 H	1540	856	516	1360	872	664	1400	548	204	2052
	1516	888	524	1364	928	584	1388	608	282	2096
	1576	1024	504	1320	944	648	1380	612	224	2168
	1588	928	452	1384	940	520	1436	576	228	2084
72 H	1366	740	448	1256	916	488	1056	856	436	1620
	1420	856	376	1308	828	532	1168	960	400	1716
	1301	852	436	1182	948	520	1056	896	428	1680
	1456	796	330	1288	876	424	1184	888	464	1654

La tabla N° 5 muestra el recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina, ácido láctico y nisina más ácido láctico y tiempos de observación a las 0, 24, 48, 72 horas respectivamente.

6.1.3. Recuento de *Staphylococcus aureus*, según tratamientos de nisina, ácido láctico, nisina más ácido láctico y tiempos de observación

Para el recuento de *Staphylococcus aureus*, No se obtuvo ningún crecimiento bacteriano, por ende no hubo inhibición de *Staphylococcus aureus*, según tratamientos de nisina, ácido láctico, nisina más ácido láctico y tiempos de observación de 0, 24, 48 y 72 horas.

6.1.4. Medidas del pH

Tabla N° 6. Tabla de medidas del pH realizadas al calamar gigante (*Dosidicus*)

	Nisina %				Ácido láctico				Nisina más ácido láctico %			
	0	0.2	0.5	0.8	0	0.2	0.5	0.8	0	0.2	0.5	0.8
0 Horas	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
24 Horas	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
48 Horas	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
72 Horas	6	7	7	8	6	7	7	8	6	7	7	7

La tabla N° 6 muestra las medidas del pH obtenidas de las muestras de calamar gigante (*Dosidicus gigas*, Orbigny 1835) sometidas a tratamientos, donde las medidas se mantienen casi constantes a diferencia del pH de la muestra con tratamiento control (0% de nisina más ácido láctico), el cual ligeramente se acidificó.

6.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

6.2.1. Análisis de los resultados para aerobios mesófilos totales

6.2.1.1. Efecto de la nisina sobre el recuento de aerobios mesófilos totales, según tiempos de observación.

Tabla N° 7. Tabla de estadísticos descriptivos del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina y tiempos de observación.

Tiempos de observación (Horas)	Tratamiento de Nisina	Media	Desviación estándar	N
0 H	Nisina al 0,2%	366,7500	28,51169	4
	Nisina al 0,5%	309,0000	22,58318	4
	Nisina al 0,8%	243,0000	28,40188	4
	Nisina al 0%	460,7500	24,58150	4
	Total	344,8750	85,82375	16
24 H	Nisina al 0,2%	1360,0000	46,96098	4
	Nisina al 0,5%	850,5000	47,08503	4
	Nisina al 0,8%	508,5000	69,17369	4
	Nisina al 0%	1714,7500	31,75295	4
	Total	1108,4375	480,28241	16
48 H	Nisina al 0,2%	1940,7500	53,41270	4
	Nisina al 0,5%	1686,5000	40,64070	4
	Nisina al 0,8%	1057,0000	49,78621	4
	Nisina al 0%	2259,0000	37,85939	4
	Total	1735,8125	457,60394	16
72 H	Nisina al 0,2%	1735,5000	27,14774	4
	Nisina al 0,5%	1391,5000	49,96999	4
	Nisina al 0,8%	915,5000	40,86971	4
	Nisina al 0%	1911,0000	48,04165	4
	Total	1488,3750	394,17845	16
Total	Nisina al 0,2%	1350,7500	625,97769	16
	Nisina al 0,5%	1059,3750	545,39061	16
	Nisina al 0,8%	681,0000	336,75788	16
	Nisina al 0%	1586,3750	701,49040	16
	Total	1169,3750	651,49695	64

Tabla N° 8. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina y tiempos de observación.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
TiempoS	17698017,130	3	5899339,042	3302,832	,000
TratamientoN	7318336,500	3	2439445,500	1365,759	,000
TiempoS * TratamientoN	1638152,375	9	182016,931	101,905	,000
Error	85735,000	48	1786,146		
Total corregido	26740241,000	63			
a. R al cuadrado = ,997 (R al cuadrado ajustada = ,996)					

Gráfico N°1. Medias marginales estimadas del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8% y tiempos de observación a las 0H, 24H, 48H, 72H.

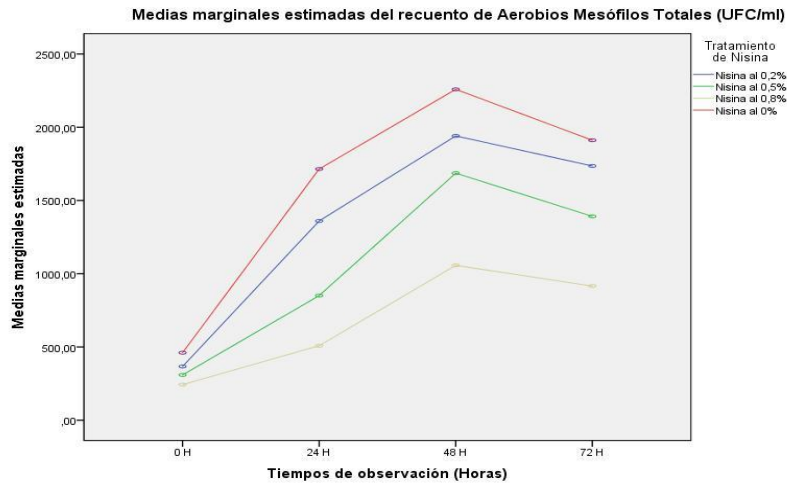
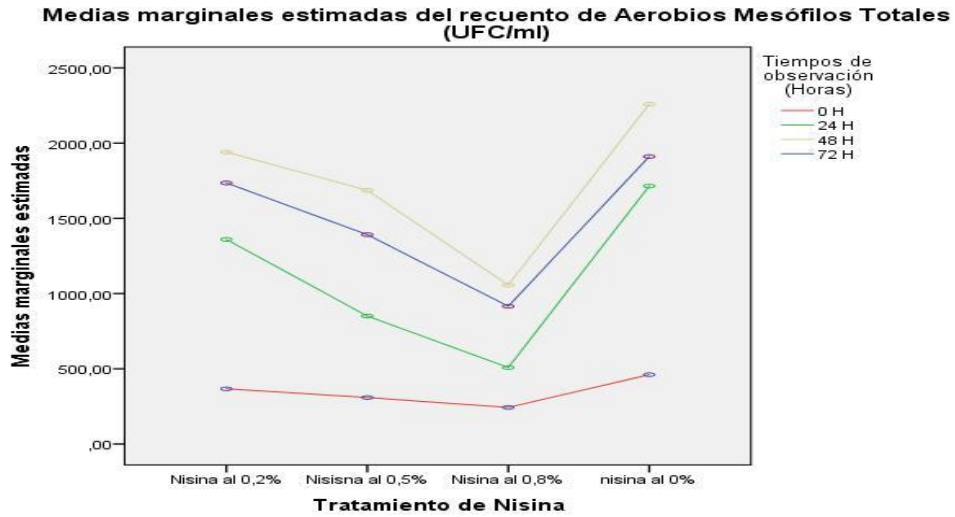


Gráfico N°2. Medias marginales estimadas del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tiempos de observación de 0H, 24H, 48H, 72H y tratamientos de nisina al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8%.



6.2.1.2. Efecto del ácido láctico sobre el recuento de aerobios mesófilos totales, según tiempos de observación.

Tabla N° 9. Tabla de estadísticos descriptivos del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de ácido láctico y tiempos de observación.

Tiempos de observación (Horas)	Tratamiento de ácido láctico	Media	Desviación estándar	N
0 H	Ácido láctico al 0,2%	440,0000	37,08549	4
	Ácido láctico al 0,5%	383,0000	16,39105	4
	Ácido láctico al 0,8%	247,7500	38,78466	4
	Ácido láctico al 0%	460,7500	24,58150	4
	Total	382,8750	90,03842	16
24 H	Ácido láctico al 0,2%	1171,0000	90,11844	4
	Ácido láctico al 0,5%	915,5000	189,44392	4
	Ácido láctico al 0,8%	729,0000	160,88505	4
	Ácido láctico al 0%	1714,7500	31,75295	4
	Total	1132,5625	401,19006	16
48 H	Ácido láctico al 0,2%	2089,0000	67,51790	4
	Ácido láctico al 0,5%	1792,5000	49,96999	4
	Ácido láctico al 0,8%	966,0000	24,97999	4
	Ácido láctico al 0%	2259,0000	37,85939	4
	Total	1776,6250	514,96626	16
72 H	Ácido láctico al 0,2%	1706,0000	78,55359	4
	Ácido láctico al 0,5%	1272,0000	142,06102	4
	Ácido láctico al 0,8%	568,7500	95,09075	4
	Ácido láctico al 0%	1911,0000	48,04165	4
	Total	1364,4375	537,98029	16
Total	Ácido láctico al 0,2%	1351,5000	642,52803	16
	Ácido láctico al 0,5%	1090,7500	541,86204	16
	Ácido láctico al 0,8%	627,8750	283,00127	16
	Ácido láctico al 0%	1586,3750	701,49040	16
	Total	1164,1250	658,05349	64

Tabla N° 10. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de ácido láctico y tiempos de observación.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempos	16426065,630	3	5475355,208	721,211	,000
TratamientoA	8101638,500	3	2700546,167	355,714	,000
Tiempos * TratamientoA	2389051,875	9	265450,208	34,965	,000
Error	364411,000	48	7591,896		
Total corregido	27281167,000	63			

a. R al cuadrado = ,987 (R al cuadrado ajustada = ,982)

Gráfico N°3. Medias marginales estimadas del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8% y tiempos de observación a las 0H, 24H, 48H, 72H.

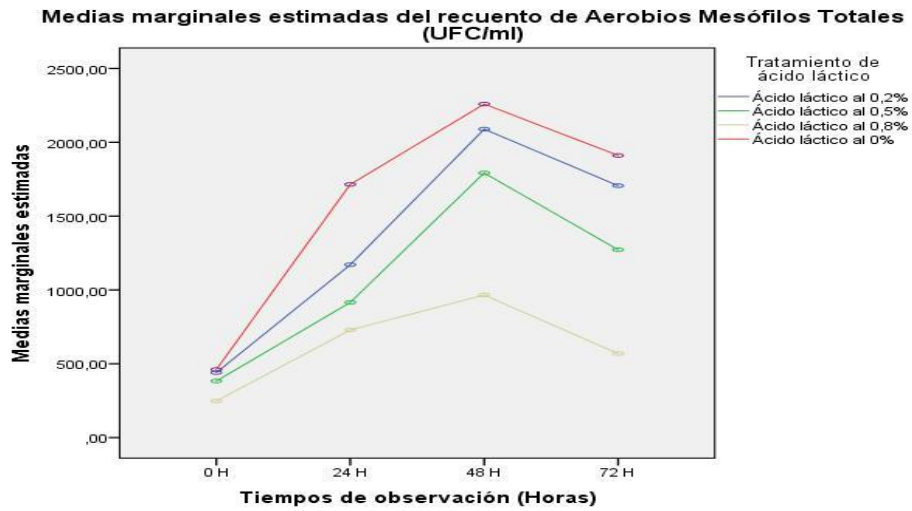
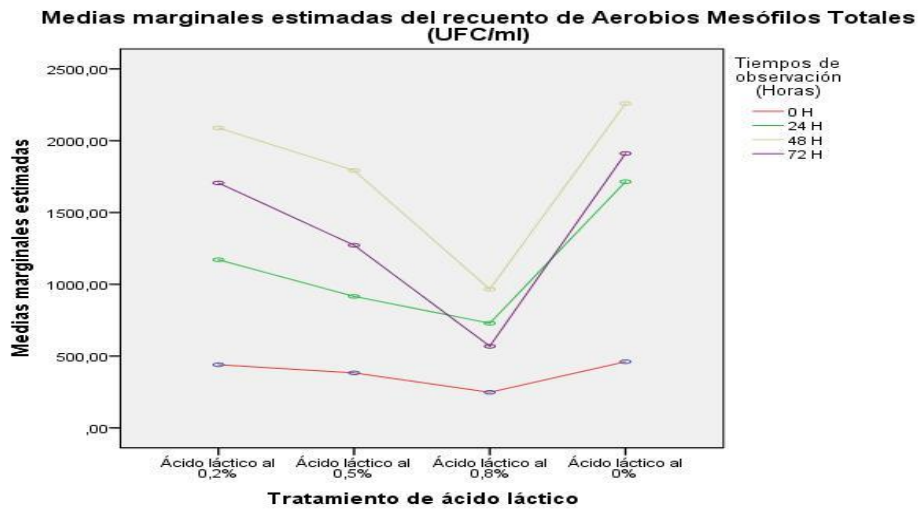


Gráfico N°4. Medias marginales estimadas del recuento de aerobios Mesófilos Totales (UFC/ml), según tiempos de observación de 0H, 24H, 48H, 72H y tratamientos de nisina al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8%.



6.2.1.3. Efecto de la nisina más ácido láctico sobre el recuento de aerobios mesófilos totales, según tiempos de observación.

Tabla N° 11. Tabla de estadísticos descriptivos del recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico y tiempos de observación.

Tiempos de observación (Horas)	Tratamiento de nisina más ácido láctico	Media	Desviación estándar	N
0 H	Nisina más Ácido láctico al 0,2%	368,0000	41,02032	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,5%	184,5000	8,22598	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,8%	87,2500	9,53502	4
	Nisina más Ácido láctico al 0%	460,7500	24,58150	4
	Total	275,1250	153,55905	16
24 H	Nisina más Ácido láctico al 0,2%	1100,0000	51,87164	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,5%	488,0000	21,47867	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,8%	136,0000	33,94113	4
	Nisina más Ácido láctico al 0%	1714,7500	31,75295	4
	Total	859,6875	622,84109	16
48 H	Nisina más Ácido láctico al 0,2%	1085,5000	87,82748	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,5%	594,0000	34,40930	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,8%	230,0000	30,21037	4
	Nisina más Ácido láctico al 0%	2259,0000	37,85939	4
	Total	1042,1250	791,86900	16
72 H	Nisina más Ácido láctico al 0,2%	1203,0000	52,39593	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,5%	606,5000	56,17532	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,8%	259,5000	16,52271	4
	Nisina más Ácido láctico al 0%	1911,0000	48,04165	4
	Total	995,0000	649,21984	16
Total	Nisina más Ácido láctico al 0,2%	939,1250	348,04001	16
	Nisina más Ácido láctico al 0,5%	468,2500	178,49874	16
	Nisina más Ácido láctico al 0,8%	178,1875	75,13030	16
	Nisina más Ácido láctico al 0%	1586,3750	701,49040	16
	Total	792,9844	665,58196	64

Tabla N° 12. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico y tiempos de observación.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempos	6008144,047	3	2002714,682	1165,919	,000
TratamientoNA	18148054,050	3	6049351,349	3521,746	,000
Tiempos TratamientoNA *	3670310,641	9	407812,293	237,416	,000
Error	82450,250	48	1717,714		

Total corregido	27908958,980	63			
-----------------	--------------	----	--	--	--

a. R al cuadrado = ,997 (R al cuadrado ajustada = ,996)

Gráfico N°5. Medias marginales estimadas del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8% y tiempos de observación a las 0H, 24H, 48H, 72H.

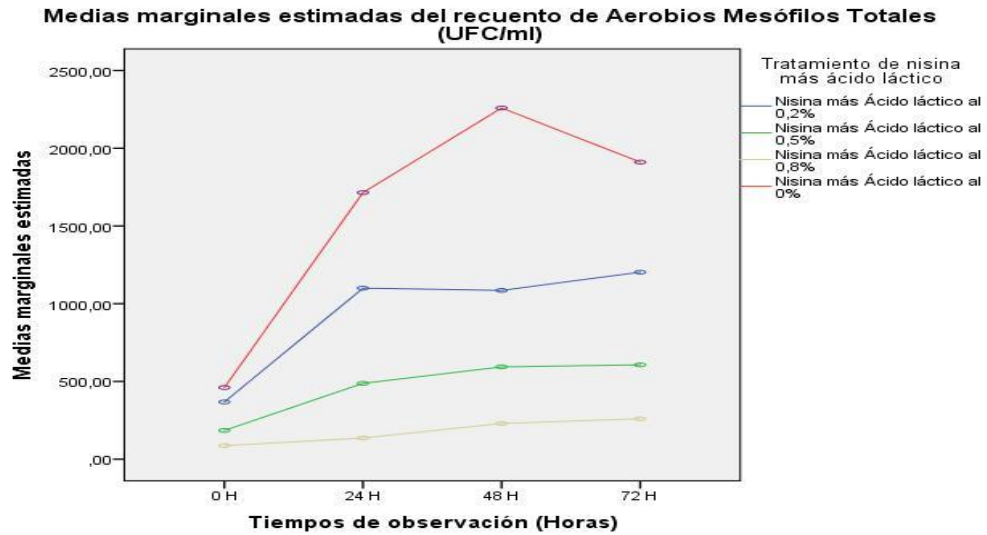
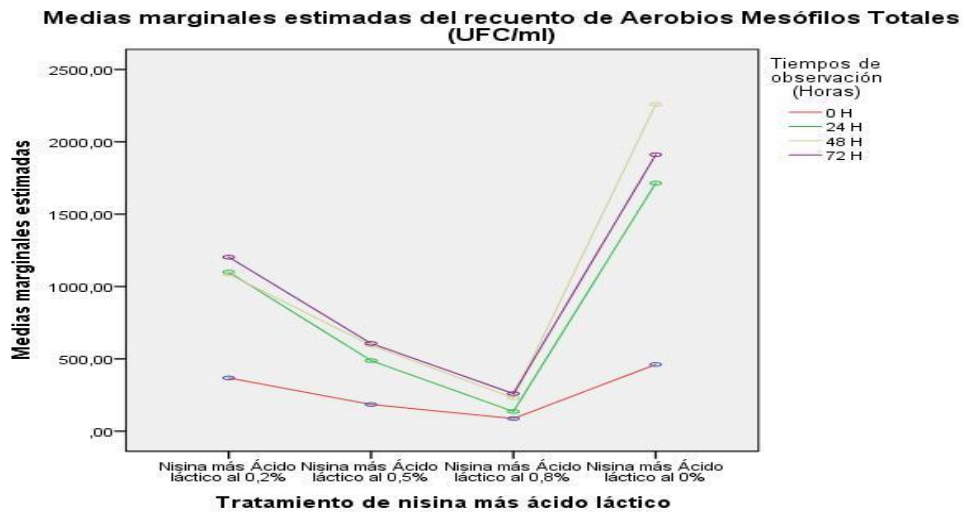


Gráfico N°6. Medias marginales estimadas del recuento de aerobios mesófilos totales (UFC/ml), según tiempos de observación de 0H, 24H, 48H, 72H y tratamientos de nisina más ácido láctico al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8%.



6.2.2. Análisis de los resultados para Coliformes totales

6.2.2.1. Efecto de la nisina sobre el recuento de Coliformes Totales, según tiempos de observación

Tabla N° 13. Tabla de estadísticos descriptivos del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina y tiempos de observación.

Tiempos de observación (Horas)	Tratamiento de nisina	Media	Desviación estándar	N
0 H	Nisina al 0,2%	388,0000	28,11880	4
	Nisina al 0,5%	234,2500	31,19161	4
	Nisina al 0,8%	165,0000	10,09950	4
	Nisina al 0%	475,7500	26,06882	4
	Total	315,7500	128,68230	16
24 H	Nisina al 0,2%	1359,0000	40,84116	4
	Nisina al 0,5%	947,7500	35,78058	4
	Nisina al 0,8%	566,5000	39,00000	4
	Nisina al 0%	1760,0000	105,57778	4
	Total	1158,3125	464,35442	16
48 H	Nisina al 0,2%	1555,0000	33,04542	4
	Nisina al 0,5%	924,0000	72,88347	4
	Nisina al 0,8%	499,0000	32,39341	4
	Nisina al 0%	2100,0000	48,98979	4
	Total	1269,5000	630,69718	16
72 H	Nisina al 0,2%	1385,7500	67,52962	4
	Nisina al 0,5%	811,0000	54,68699	4
	Nisina al 0,8%	397,5000	54,92722	4
	Nisina al 0%	1667,5000	40,60788	4
	Total	1065,4375	512,54164	16
Total	Nisina al 0,2%	1171,9375	475,55897	16
	Nisina al 0,5%	729,2500	303,44456	16
	Nisina al 0,8%	407,0000	160,68644	16
	Nisina al 0%	1500,8125	635,95558	16
	Total	952,2500	595,84245	64

Tabla N° 14. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina y tiempos de observación.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempos	8976847,625	3	2992282,542	1190,031	,000
TratamientoNis	11139359,620	3	3713119,875	1476,708	,000
Tiempos*TratamientoNis	2129876,750	9	236652,972	94,117	,000
Error	120694,000	48	2514,458		
Total corregido	22366778,000	63			

a. R al cuadrado = ,995 (R al cuadrado ajustada = ,993)

Gráfico N°7. Medias marginales estimadas del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8% y tiempos de observación a las 0H, 24H, 48H, 72H.

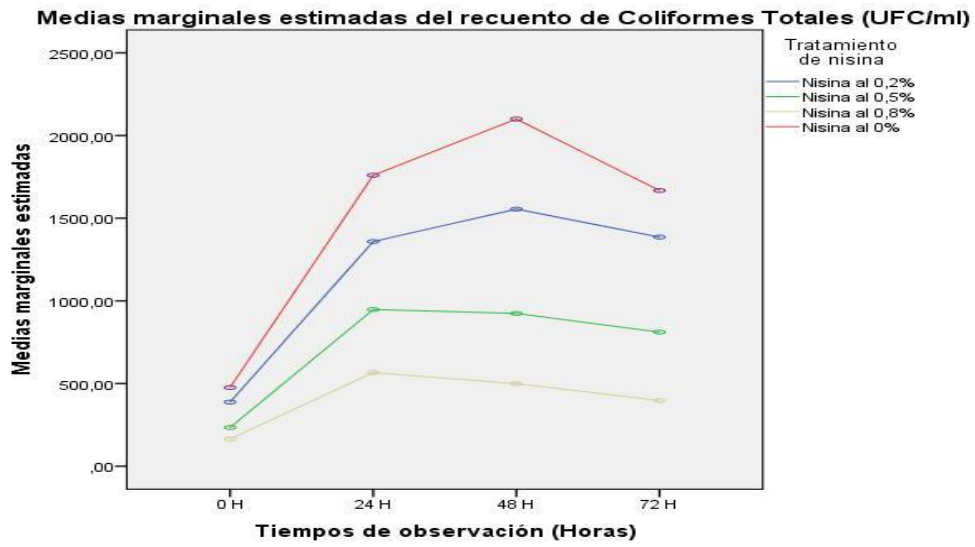
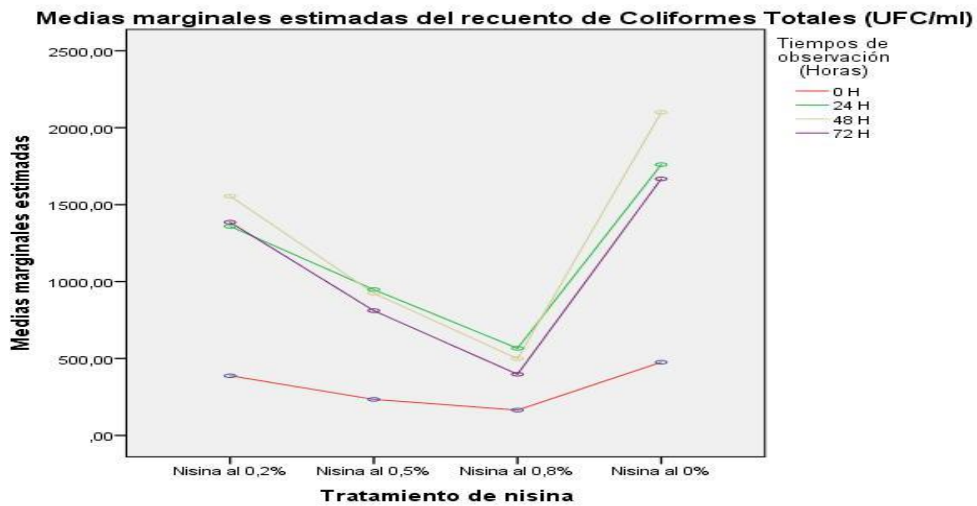


Gráfico N°8. Medias marginales estimadas del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tiempos de observación de 0H, 24H, 48H, 72H y tratamientos de nisina al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8%.



6.2.2.2. Efecto del ácido láctico sobre el recuento de Coliformes totales, según tiempos de observación.

Tabla N°15. Tabla de estadísticos descriptivos del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de ácido láctico y tiempos de observación.

Tiempos de observación (Horas)	Tratamiento de Acid	Media	Desviación estándar	N
0 H	Ácido láctico al 0,2%	431,5000	37,08099	4
	Ácido láctico al 0,5%	244,0000	24,04163	4
	Ácido láctico al 0,8%	129,7500	14,88568	4
	Ácido láctico al 0%	475,7500	26,06882	4
	Total	320,2500	146,78942	16
24 H	Ácido láctico al 0,2%	1311,5000	24,73190	4
	Ácido láctico al 0,5%	888,5000	43,95073	4
	Ácido láctico al 0,8%	564,7500	7,63217	4
	Ácido láctico al 0%	1760,0000	105,57778	4
	Total	1131,1875	467,04107	16
48 H	Ácido láctico al 0,2%	1357,0000	26,80796	4
	Ácido láctico al 0,5%	921,0000	33,36665	4
	Ácido láctico al 0,8%	604,0000	65,80780	4
	Ácido láctico al 0%	2100,0000	48,98979	4
	Total	1245,5000	580,99845	16
72 H	Ácido láctico al 0,2%	1258,5000	55,31425	4
	Ácido láctico al 0,5%	892,0000	51,84593	4
	Ácido láctico al 0,8%	491,0000	48,37355	4
	Ácido láctico al 0%	1667,5000	40,60788	4
	Total	1077,2500	452,12262	16
Total	Ácido láctico al 0,2%	1089,6250	395,53809	16
	Ácido láctico al 0,5%	736,3750	296,02430	16
	Ácido láctico al 0,8%	447,3750	197,52464	16
	Ácido láctico al 0%	1500,8125	635,95558	16
	Total	943,5469	566,93120	64

Tabla N°16. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Coliformes Totales (UFC/ml), según tratamientos de ácido láctico y tiempos de observación.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempos	8524163,422	3	2841387,807	1302,577	,000
TratamientoAcid	9935848,172	3	3311949,391	1518,296	,000
Tiempos * TratamientoAcid	1684175,016	9	187130,557	85,786	,000
Error	104705,250	48	2181,359		
Total corregido	20248891,860	63			

a. R al cuadrado = ,995 (R al cuadrado ajustada = ,993)

Gráfico N°9. Medias marginales estimadas del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de ácido láctico al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8% y tiempos de observación a las 0H, 24H, 48H, 72H.

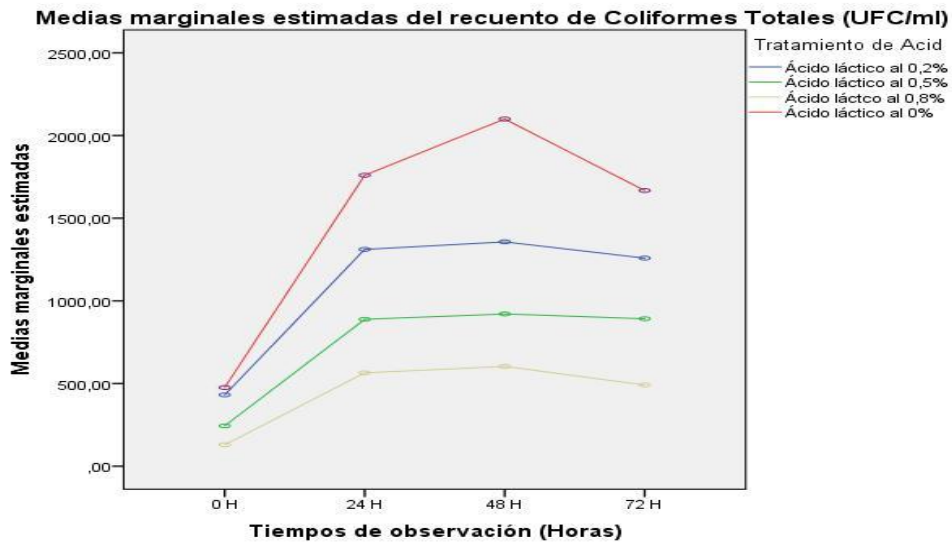
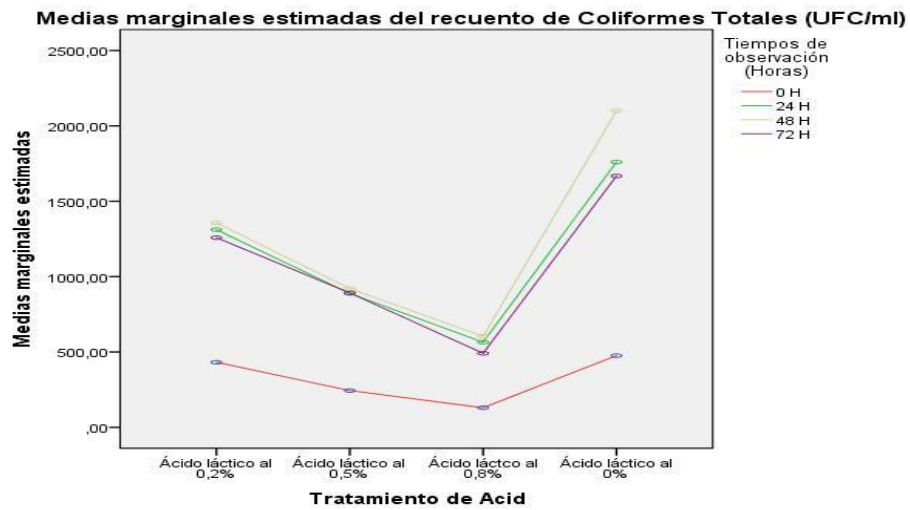


Gráfico N°10. Medias marginales estimadas del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tiempos de observación de 0H, 24H, 48H, 72H y tratamientos de ácido láctico al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8%.



6.2.2.3. Efecto de la nisina más ácido láctico sobre el recuento de Coliformes totales según tiempos de observación

Tabla N° 17. Tabla de estadísticos descriptivos del recuento de Coliformes Totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico y tiempos de observación.

Tiempos de observación (Horas)	Tratamiento de Nisina más Ácido láctico	Media	Desviación estándar	N
0 H	Nisina más Ácido láctico al 0,2%	357,0000	16,67333	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,5%	143,5000	29,14904	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,8%	73,2500	3,50000	4
	Nisina más Ácido láctico al 0%	475,7500	26,06882	4
	Total	262,3750	167,92612	16
24 H	Nisina más Ácido láctico al 0,2%	1176,0000	63,91661	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,5%	523,5000	58,24946	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,8%	192,0000	21,47867	4
	Nisina más Ácido láctico al 0%	1760,0000	105,57778	4
	Total	912,8750	626,61928	16
48 H	Nisina más Ácido láctico al 0,2%	1401,0000	24,73863	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,5%	586,0000	30,02221	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,8%	234,5000	33,36165	4
	Nisina más Ácido láctico al 0%	2100,0000	48,98979	4
	Total	1080,3750	749,42048	16
72 H	Nisina más Ácido láctico al 0,2%	1116,0000	69,58927	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,5%	900,0000	43,57369	4
	Nisina más Ácido láctico al 0,8%	432,0000	26,33122	4
	Nisina más Ácido láctico al 0%	1667,5000	40,60788	4
	Total	1028,8750	460,46757	16
Total	Nisina más Ácido láctico al 0,2%	1012,5000	408,38560	16
	Nisina más Ácido láctico al 0,5%	538,2500	280,22384	16
	Nisina más Ácido láctico al 0,8%	232,9375	135,16827	16
	Nisina más Ácido láctico al 0%	1500,8125	635,95558	16
	Total	821,1250	627,58708	64

Tabla N° 18. Tabla de Análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico y tiempos de observación.

	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Origen					
Tiempos	6895844,000	3	2298614,667	1050,320	,000
TratamientoNismasAcid	14793316,620	3	4931105,542	2253,200	,000
Tiempos *	3019320,875	9	335480,097	153,293	,000
TratamientoNismasAcid					
Error	105047,500	48	2188,490		
Total corregido	24813529,000	63			

a. R al cuadrado = ,996 (R al cuadrado ajustada = ,994)

Gráfico N°11. Medias marginales estimadas del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8% y tiempos de observación a las 0H, 24H, 48H, 72H.

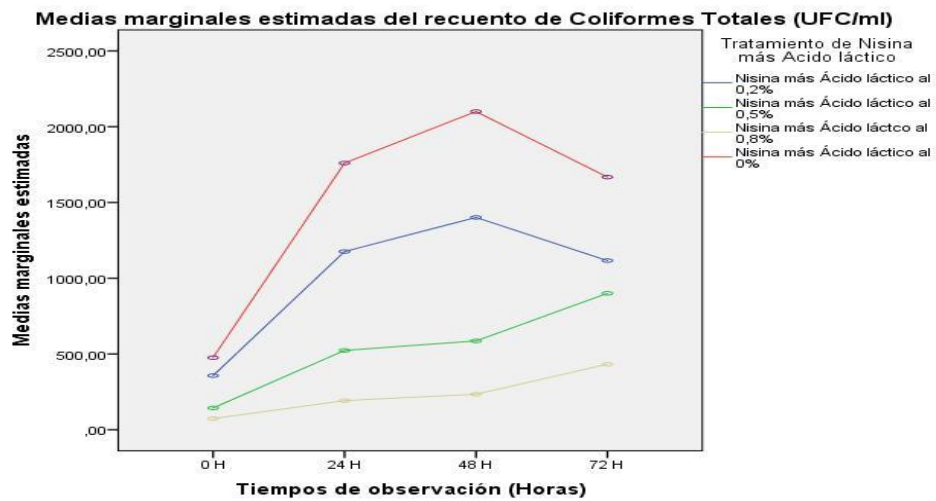
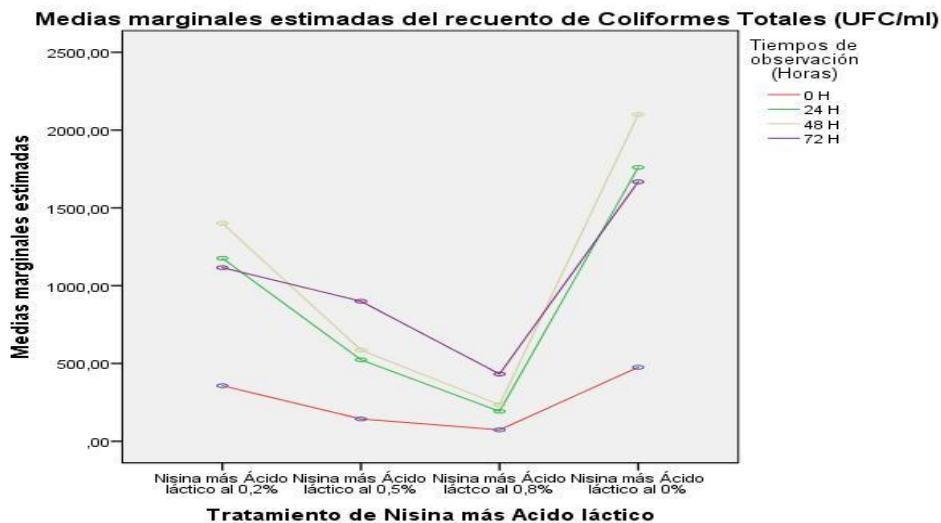


Gráfico N°12. Medias marginales estimadas del recuento de Coliformes totales (UFC/ml), según tiempos de observación de 0H, 24H, 48H, 72H y tratamientos de nisina más ácido láctico al 0%, 0,2%, 0,5%, 0,8%.



6.3. Interpretación de resultados

Tabla N° 7. Muestra los estadísticos descriptivos del recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/ml), según tratamientos suministrados de nisina y tiempos de observación a las 0, 24, 48, 72 horas.

Tabla N°8. Muestra el Análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina y tiempos de observación a las 0, 24, 48, 72 horas. Donde el recuento de UFC/ml, en promedio, no es igual a través del tiempo, es decir, las diferencias del recuento promedio son muy significativas ($F=3302,832$; $P\text{-valor}=0,000$). A su vez existe una diferencia significativa entre las cantidades medias de UFC/ml según los tratamientos ($F=1365,759$; $p\text{-valor}=0.000$), así como también existe interacción entre el tiempo y los tratamientos, es decir, el efecto de los tratamientos sobre el recuento de colonias depende del tiempo observado y viceversa.

Tabla N°9. Muestra los estadísticos descriptivos del recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/ml), según tratamientos suministrados de ácido láctico y tiempos de observación a las 0, 24, 48, 72 horas.

Tabla N°10. Muestra el análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/ml), según tratamientos de ácido láctico y tiempos de observación a las 0, 24, 48, 72 horas. Donde el recuento de UFC/ml, en promedio, no es igual a través del tiempo, es decir, las diferencias del recuento promedio son muy significativas ($F=721,211$; $P\text{-valor}=0,000$). A su vez existe una diferencia significativa entre las cantidades medias de UFC/ml según los tratamientos ($F=355,714$; $p\text{-valor}=0.000$), así como también existe interacción entre el tiempo y los tratamientos, es decir, el efecto de los tratamientos sobre el recuento de colonias depende del tiempo observado y viceversa.

Tabla N°11. Muestra los estadísticos descriptivos del recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/ml), según tratamientos suministrados de nisina más ácido láctico y tiempos de observación a las 0, 24, 48, 72 horas.

Tabla N°12. Muestra el análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Aerobios Mesófilos Totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico y tiempos de observación a las 0, 24, 48, 72 horas. Donde el recuento de UFC/ml, en promedio, no es igual a través del tiempo, es decir, las diferencias del recuento promedio son muy significativas ($F=1165,919$; $P\text{-valor}=0,000$). A su vez existe una diferencia significativa entre las cantidades medias de UFC/ml según los tratamientos ($F=3521,746$; $p\text{-valor} = 0.000$), así como también existe interacción entre el tiempo y los tratamientos, es decir, el efecto de los tratamientos sobre el recuento de colonias depende del tiempo observado y viceversa.

Tabla N°13. Muestra los estadísticos descriptivos del recuento de Coliformes Totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina y tiempos de observación a las 0, 24, 48, 72 horas.

Tabla N°14. Muestra el análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Coliformes Totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina y tiempos de observación a las 0, 24, 48, 72 horas. Donde el recuento de UFC/ml, en promedio, no es igual a través del tiempo, es decir, las diferencias del recuento promedio son muy significativas ($F=1190,031$; $P\text{-valor}=0,000$). A su vez existe una diferencia significativa entre las cantidades medias de UFC/ml según los tratamientos ($F=1476,708$; $p\text{-valor}=0.000$), así como también existe interacción entre el tiempo y los tratamientos, es decir, el efecto de los tratamientos sobre el recuento de colonias depende del tiempo observado y viceversa.

Tabla N°15. Muestra los estadísticos descriptivos del recuento de Coliformes Totales (UFC/ml), según tratamientos de ácido láctico y tiempos de observación a las 0, 24, 48, 72 horas.

Tabla N°16. Muestra el análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Coliformes Totales (UFC/ml), según tratamientos de ácido láctico y tiempos

de observación a las 0, 24, 48, 72 horas. Donde el recuento de UFC/ml, en promedio, no es igual a través del tiempo, es decir, las diferencias del recuento promedio son muy significativas ($F=1302,577$; $P\text{-valor}=0,000$). A su vez existe una diferencia significativa entre las cantidades medias de UFC/ml según los tratamientos ($F=85,786$; $p\text{-valor}=0,000$), así como también existe interacción entre el tiempo y los tratamientos, es decir, el efecto de los tratamientos sobre el recuento de colonias depende del tiempo observado y viceversa.

Tabla N°17. Muestra los estadísticos descriptivos del recuento de Coliformes Totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico y tiempos de observación a las 0, 24, 48, 72 horas.

Tabla N°18. Muestra el análisis de varianza (ANOVA) para el recuento de Coliformes Totales (UFC/ml), según tratamientos de nisina más ácido láctico y tiempos de observación a las 0, 24, 48, 72 horas. Donde el recuento de UFC/ml, en promedio, no es igual a través del tiempo, es decir, las diferencias del recuento promedio son muy significativas ($F=1050,320$; $P\text{-valor}=0,000$). A su vez existe una diferencia significativa entre las cantidades medias de UFC/ml según los tratamientos ($F=2253,200$; $p\text{-valor}=0,000$), así como también existe interacción entre el tiempo y los tratamientos, es decir, el efecto de los tratamientos sobre el recuento de colonias depende del tiempo observado y viceversa.

VII. DISCUSIONES

- La aplicación de las bacteriocinas mediante tratamientos de nisina, ácido láctico, nisina más ácido láctico provocaron una reducción en la carga bacteriana (Aerobios Mesófilos totales y Coliformes Totales) en *Dosidicus gigas*, orbigny 1835 (Calamar gigante), como así también lo indica Beristain & Palou *et al.* (2012) y Moreno, P (2012) los cuales afirman que en la carne de pollo también se produjo una reducción en la carga bacteriana inducido por el uso exclusivo de bacteriocinas. Esto debido a la presencia de ácido láctico que afecta principalmente a microorganismos Gram (-), así como también de la presencia de nisina que afecta a microorganismos Gram (+).
- Las concentraciones usadas en los tratamientos es un factor que influye en la cantidad del efecto antimicrobiano que se requiera, ya que soluciones de ácido láctico al 1%, 2% y soluciones de Nisina con 300 y 500 ppm para carne de pollo según Moreno, P (2012) y concentraciones de 0.2, 0.5, 0.8 % tanto de nisina como de ácido láctico para calamar gigante. Provocaron un efecto inhibitor de aerobios mesófilos totales y coliformes totales. Así mismo, este efecto también es influenciado por el tipo de alimento cárnico con el que se trabaje, así lo indica Grande *et al* (2011), ya que en el caso del *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 (Calamar gigante) por ser un alimento marino, tiende a descomponerse más rápido y por ende es más susceptible al manipuleo, contrario a lo que ocurre cuando se utiliza carne de vacuno o pollo, los cuales tienden a descomponerse más lentamente.
- Aplicando el método de película seca rehidratante (Petrifilm) disminuye el rango de error en el experimento, resultando la eliminación de Aerobios en un 99.25% y Coliformes totales en un 99.30%, así lo indica Moreno, P (2012) y Ramos, J (2015), pero para

la conservación de calamar gigante se utilizó placas Petri de 15mm, resultando efectos positivos pero con mayor rango de error.

- La combinación de los tratamientos resultan tener mayor efectividad en la reducción de la carga bacteriana, así lo indica Gálvez *et al.* (2007) en el caso del calamar gigante también se evidenció una mayor efectividad en la reducción de Aerobio Mesófilos Totales, a diferencia de los tratamientos individuales que también ejercieron una acción antimicrobiana pero en menor proporción.
- Respecto al análisis de *Staphylococcus aureus* no se encontraron resultados positivos visto que dicha bacteria presenta un hábitat terrestre y no marina, esto no es debido a la ineficacia de las bacteriocinas, sino por el origen de la carne, que no permite proliferar dicha bacteria. Ya que casi todas las bacteriocinas poseen efectos antibacterianos, así lo indica Beshkova, & Frengova (2012).

VIII. CONCLUSIONES

- Las muestras *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835 al ser tratada con 0% nisina y ácido láctico (control) presentaron a las 0 horas un recuento de bacterias Aerobias Mesófilos Totales de 429×10^4 UFC/ml, Coliformes Totales de 449×10^4 UFC/ml y *Staphylococcus sp* 0 UFC/ml. Después de pasadas las 24 horas presentaron un recuento de bacterias aerobios mesófilos totales de 1685×10^4 UFC/ml, Coliformes totales 1652×10^4 UFC/ml y *Staphylococcus aureus* 0 UFC/m evidenciando así un aumento muy significativo ($p < 0,000$) comparado con las muestras analizadas a las 0 horas para aerobios mesófilos totales y Coliformes totales, pero no así para *Staphylococcus aureus* quien no presentó ningún crecimiento al pasar las horas.
- Se logró conservar Calamar gigante (*Dosidicus gigas*, Orbigny 1835) por tratamiento combinado de Nisina y Ácido láctico a 6°C , a las 48 horas y a concentraciones de 0.8% (máxima) del tratamiento, manteniendo lo niveles de $\text{pH}=7$ resultando para el recuento de aerobios mesófilos totales 202×10^4 (UFC/ml) y para Coliformes totales 228×10^4 (UFC/ml).
- La acción antibacteriana de nisina a concentraciones de 0.2%, 0.5%, 0.8% frente a aerobios mesófilos totales, Coliformes totales y *Staphylococcus sp* a intervalos de 0, 24, 48 y 72 horas a 6°C , concluyendo que el mejor resultado se dio a las 72 horas y a concentraciones de 0.8% del tratamiento resultando 888×10^4 (UFC/ml) para el recuento de aerobios mesófilos totales y 330×10^4 (UFC/ml) para el recuento de Coliformes Totales y 0 para el caso de *Staphylococcus aureus*.
- La acción antibacteriana del ácido láctico a concentraciones de 0.2%, 0.5%, 0.8% frente a aerobios mesófilos totales, Coliformes totales y

Staphylococcus aureus a intervalos de 0, 24, 48 y 72 horas a 6°C, concluyendo que el mejor resultado se dio a las 72 horas y a concentraciones de 0.8% del tratamiento resultando 435×10^4 (UFC/ml) para el recuento de aerobios mesófilos totales y 424×10^4 (UFC/ml) para el recuento de Coliformes totales y 0 para el caso de *Staphylococcus aureus*.

- La evaluación de la acción antibacteriana de la combinación de nisina más ácido láctico a concentraciones de iones de 0.2%, 0.5%, 0.8% frente a aerobios mesófilos totales, Coliformes totales y *Staphylococcus aureus* a intervalos de 0, 24, 48 y 72 horas a 6°C, , concluyendo que el mejor resultado se dio a las 72 horas y a concentraciones de 0.8% del tratamiento resultando 238×10^4 (UFC/ml) para el recuento de aerobios mesófilos totales y 428×10^4 (UFC/ml) para el recuento de Coliformes totales y 0 para el caso de *Staphylococcus aureus*.
- La mayor eficacia en la reducción de carga bacteriana de Aerobios Mesófilos Totales y Coliformes Totales se dio mediante la aplicación del tratamiento combinado de nisina más ácido láctico a diferencia de la aplicación de los tratamientos individuales, sin causar deterioros en los signos organolépticos y teniendo en cuenta el mantenimiento del pH que fue de 7.

IX. RECOMENDACIONES

- Al momento de la adquisición de *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835, es necesario cerciorarse que la muestra no haya pasado un proceso de desinfección rápida con hipoclorito de sodio, ya que esto podría afectar cuantitativamente los resultados en el recuento de las bacterias y confundirse con la ausencia total de la misma en la muestra.
- Realizar estudios sobre otros productos hidrobiológicos para tomar como referencia y realizar mayores contribuciones y/o valor agregado en el estudio de *Dosidicus gigas*, Orbigny 1835. Éste producto cuenta con un valor nutricional alto poco difundido pero que si es muy demandado en el exterior, por lo que se quiere que dicho producto llegue seguro al consumidor, implementando métodos de conservación de alimentos para prolongar la vida útil del mismo y no sea perjudicial para la salud humana y/o animal durante su consumo.

X. REFERENCIAS CITADAS

- Ramos Gorbeña, J.C. 2015. Tratamientos combinados de nisina y ácido láctico para el aseguramiento de la calidad microbiológica de conchas de abanico (*Argopecten purpuratus* L. 1819). Tesis. Universidad Ricardo Palma. Perú.
- Gamarra, R & Yamashiro, C. 2015. Situación del Calamar gigante durante el 2014 y perspectivas de pesca para el 2015. Dirección general de investigaciones de recursos demersales y litorales - IMARPE. 1-10. Perú.
www.imarpe.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe/inf_calmar_2014_pers2015.pdf (revisado el 5 junio del 2016).
- Chirinos, O *et al.* 2015. Industrialización y exportación de derivados de la pota. Revista Serie Gerencia global 15. Universidad Esan. 1-138. Perú
- Ko, park, et al. 2014. Analysis method for determination of nisin A and nisin Z in cow milk by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry *Journal of Dairy Science*, Korea. 98(3) , 1435 – 1442.
<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8452>
- Frizzo, L.S, Astesana, D.M, Soto, L.P, Blajman, J.E, Zbrun, M.V, Signorini, M.L, Marti, L.E, Sequeira, G.J, & Rosmini, M.R. (2013). La seguridad en la cadena agroalimentaria de la carne: problemáticas, estrategias y posibles soluciones pre-faena. Fave. Sección ciencias agrarias, *SCIELO*. 12(2), 35-54. Recuperado en 23 de julio de 2016
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1666-77192013000200004&lng=es&tlng=es.
- Moreno, C. 2012. Efecto combinado de La Nisina y Ácido Láctico en la vida útil de carne de pollo. Tesis de Licenciatura en ingeniería de alimentos – facultad de ciencia e ingeniería en alimentos -UTA. Ecuador. 1-30.

- Beristain, S.; Palou, E y López, A. 2012. Bacteriocinas: Antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. Temas selectos de ingeniería de alimentos. 6(2):64-78. México.
- Beshkova, D & Frengova, G. 2012. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Journal Engineering in Life Sciences*. 12(4):1-14. Bulgaria.
- Ramos, J. 2011. Biopreservación: Conchas de Abanico con Ácido Láctico y Yogurt Natural. Editorial Académica Española. ISBN-13:978-3-8465-6735-7.
- Grande, M & Lucas, R *et al* 2011. Bioconservación de alimentos cárnicos. *Revista Anales*. España. 24(1):111-123
- Vásquez, S *et al*. 2009. Use of antimicrobial substances produced by acid lactic bacterias on meat conservation. *Revista Chilena de Nutrición*. 36(1):64-77. Colombia.
- Muños, 2008. Normativa sanitaria de alimentos. Ministerio de salud – dirección general de salud ambiental. 1 -21. Perú.
- Salinas, C.; Bazzino, G.; Camarillo, S.; Rosas, R.; Mejía, A & Ramos, J. 2007. El calamar gigante *Dosidicus gigas*, D' Orbigny 1835 Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste – Aspectos Biológicos. 469 – 486. México.
- Márquez & García. 2007. Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo "telita" elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27(2), 108-111. Recuperado en 03 de agosto de 2016, http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562007000200010&lng=es&tlng=es.

- Galvez, A *et al.* 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Internacional Journal of food Microbiology* 120:51-70. España.
- Cleveland, J.; Montville, J.; Ness, F.; Chikindas, M. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71.
- Ennahar, S.; Sonomoto, K. y Ishizaki, A. 1999. Class IIa Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Antibacterial Activity and Food Preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87 (6): 705-716.
- Caplice, E.; Fitzgerald, F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50:131–149.
- Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the biopreservation of Meat and Meat products. *Journal Elsevier Science*. 49(1):139-150. Great Britain.
- Montville, T.; Winkowski, K. and Ludescher, R. 1995. Models and Mechanisms for Bacteriocin Action and Application. *Inf. Da & Journals*. 797- 814.
- Hernández, P.; Rodríguez, J.; Cintas, L.; Moreira, W.; Sobrino, O.; Fernández, M & Sanz, B. 1993. Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. *Revista MICROBIOLOGÍA SEM*. 9:37-48. España.

XI. ANEXOS

Tabla N° 19. Características nutricionales de productos cárnicos y pesqueros (Fuente: FAO y Latinfoods, 2002).

Componentes / productos	Calamar	Pulpo	Pollo	Res	Cerdo
Agua (gramos)	81,00	84,80	68,80	71,60	47,80
Proteínas (gramos)	16,40	12,60	20,20	20,40	13,40
Grasas (gramos)	1,10	1,00	11,10	6,30	37,80
Cenizas (gramos)	1,50	1,60	1,40	0,70	
Carbohidratos totales (gramos)	0,00	0,00		0,50	
Carbohidratos disponibles (gramos)	0,00	0,00		0,50	
Energía (kilocalorías)	76,00	59,00	167,00	140,00	180,00
Ácidos grasos saturados (gramos)	0,30		3,20	2,50	13,80
Ácidos grasos monoinsaturados (gramos)	0,20		0,60		16,20
Ácidos grasos poliinsaturados (gramos)	0,50		2,10		3,60
Colesterol (miligramos)			67,00	62,00	74,00
Sodio (miligramos)		89,00	65,00	63,00	44,00
Potasio (miligramos)		274,00	204,00	358,00	244,00
Calcio (miligramos)	12,00	39,00	11,00	6,00	5,00
Fósforo (miligramos)	119,00	109,00	196,00	179,00	
Hierro (miligramos)	0,50	2,50	0,80	2,30	0,70
Zinc (miligramos)	4,00	1,70	0,90	4,40	1,60
Vitamina A equivalente total (miligramos)			39,00	6,00	2,00
Tiamina (miligramos)	0,02	0,02	0,06	0,11	0,57
Riboflavina (miligramos)	0,12	0,07	0,09	0,19	0,21
Niacina (miligramos)		1,30	8,90	3,60	3,90
Fuente: FAO y Latinfoods, 2002.					