

ESTADO DEL ARTE DE LA OBTENCIÓN DE BACTERIOCINAS A PARTIR DE
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

NATALIA AGUDELO LONDOÑO

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

MEDELLÍN

2013

ESTADO DEL ARTE DE LA OBTENCIÓN DE BACTERIOCINAS A PARTIR DE
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

NATALIA AGUDELO LONDOÑO

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Agroindustrial

Directora

LINA MARÍA VÉLEZ ACOSTA

Ingeniera de Alimentos

Magíster en Desarrollo

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

MEDELLÍN

2013

Nota de aceptación

Firma
Nombre
Presidente del jurado

Firma
Nombre
Jurado

Firma
Nombre
Jurado

Medellín, Noviembre de 2013

DEDICATORIA

A mis padres y a mi hermano.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiar mis pasos y permitirme estudiar Ingeniería Agroindustrial, carrera de la cual me siento muy orgullosa. Agradezco a mis padres y a mi hermano por su amor, comprensión, apoyo y sabios consejos, por no haberme dejado renunciar cuando me sentí desfallecer, han estado siempre a mi lado enseñándome que no debo rendirme ante las adversidades, lo que soy se lo debo a ellos, son mi mayor inspiración.

A Lina Vélez Acosta, la directora de éste trabajo, por todas sus enseñanzas, su buena disposición siempre para atender mis dudas, por su comprensión y sus consejos oportunos; gracias a ella hoy doy este paso tan importante para obtener mi título como ingeniera.

A Juan Carlos Palacio por creer en mí, por su apoyo, por su acompañamiento en todo el proceso de mi formación como ingeniera y por su incansable lucha por la mejora continua de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial.

Gracias a todos los profesores que tuve a lo largo de mi carrera porque gracias a la experiencia y al conocimiento que me transmitió cada uno de ellos hoy soy una profesional integra y eficiente.

A Juan Camilo Arteaga por su apoyo incondicional, por contagiarme de su disciplina y su amor por el estudio.

Agradezco a la Universidad y a la facultad por brindarnos todos los medios para nuestra formación como Ingenieros Agroindustriales y a todos mis amigos por su apoyo incondicional.

CONTENIDO

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
ALCANCE	12
1. JUSTIFICACIÓN	13
2. CAPITULO 1.....	15
LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y LAS BACTERIOCINAS	15
2.1 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	15
2.2 BACTERIOCINAS	16
2.3 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS BACTERIOCINAS.	18
3. CAPITULO 2.....	19
PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN DE LAS BACTERIOCINAS	19
3.1 TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS	21
3.1.1 Pruebas biológicas	21
3.1.2 Pruebas genéticas.....	21
3.2 PURIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS	22
4. CAPITULO 3.....	24
BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	24
4.1 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	27
4.2 ESPECTRO DE INHIBICIÓN	31
4.3 MODO DE ACCIÓN	33
4.4 BACTERIOCINAS REPRESENTATIVAS.....	34
4.4.1. Nisina	34
4.4.2 Pediocina.....	36
4.4.3 Plantaricinas.....	37

4.4.4 Divergicina.....	37
4.4.5. Helveticina j.	38
5. CAPÍTULO 4.....	39
USO DE LAS BACTERIOCINAS COMO CONSERVANTE EN ALIMENTOS	39
5.1 ADITIVOS ALIMENTARIOS	39
5.2 CONSERVANTES.....	40
5.3 IMPORTANCIA DEL USO DE BACTERIOCINAS EN LOS ALIMENTOS	41
5.4 APLICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS EN ALIMENTOS	41
5.4.1 Productos lácteos	41
5.4.2 Productos cárnicos	43
5.4.3 Productos de la pesca	44
5.4.4 Productos enlatados y conservas	45
5.4.5 Cerveza y vino.....	45
5.4.6 Otras aplicaciones de las bacteriocinas en alimentos	46
5.5 MÉTODOS DE BIOPRESERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS.....	47
6. CAPITULO 5.....	49
AVANCES CIENTIFICOS Y APLICACIONES COMERCIALES DE BACTERIOCINAS EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS	49
6.1. AVANCES CIENTÍFICOS.....	49
6.2. EMPRESAS PRODUCTORAS Y COMERCIALIZADORAS DE BACTERIOCINAS	53
7. CONCLUSIONES.....	55
8. DISCUSIÓN	57
9. BIBLIOGRAFÍA	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas.....	26
Tabla 2 Clasificación de las bacteriocinas y microorganismos productores.	¡Error!
Marcador no definido.	
Tabla 3. Espectro inhibitorio frente a microorganismos no lácticos de bacteriocinas de bacterias ácido lácticas.	32
Tabla 4. Disposición del Codex Alimentarius para la Nisina.....	35
Tabla 5. Ejemplos de bacteriocinas como conservantes en alimentos.	46
Tabla 6. Algunas patentes relacionadas con la obtención, producción y aplicación de bacteriocinas.....	50

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo hacer una revisión bibliográfica sobre las bacteriocinas obtenidas a partir de bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos, debido al creciente interés de los consumidores por productos naturales y benéficos para la salud. Las bacteriocinas son sustancias peptídicas con actividad antimicrobiana, producidas por diferentes cepas bacterianas, las bacteriocinas obtenidas a partir de bacterias ácido lácticas son las más investigadas debido a la larga e importante trayectoria que éstas tienen en la conservación de los alimentos ya que se ha comprobado que no son nocivas para la salud de los consumidores, no alteran las características organolépticas y alargan la vida útil de los alimentos.

Las bacteriocinas purificadas o semipurificadas pueden ser utilizadas como biopreservantes en alimentos para la reducción o eliminación de ciertos microorganismos responsables del deterioro y algunos microorganismos patógenos como la *Listeria monocytogenes*. Estas bacteriocinas se pueden adicionar a los alimentos por medio de bacterias productoras de la bacteriocina como un componente de la flora natural, añadiéndola como cultivo iniciador o adicionándola pura.

La aplicación más importante de las bacteriocinas es como conservante en la industria de alimentos, principalmente en los productos lácteos, cárnicos, productos del mar y conservas de vegetales. Aunque también se han desarrollado productos con bacteriocinas utilizados en la desinfección de utensilios y mesas de trabajo para plantas de producción de alimentos.

Se concluye que la bioconservación por medio de bacteriocinas representa una gran alternativa para la industria de alimentos, permitiendo la obtención de productos libres de aditivos artificiales, pero que a la vez sean inocuos y con prolongada vida comercial. Todo ello genera beneficios tanto para la industria como para los consumidores.

PALABRAS CLAVE: Bacteriocinas, Bioconservación, Biopreservación

INTRODUCCIÓN

Los alimentos comienzan a deteriorarse después de la recolección de los vegetales, del sacrificio de los animales o de la elaboración de los productos derivados, por lo tanto la industria se ha preocupado por buscar alternativas que posibiliten aumentar la vida útil de esos alimentos. Gran parte de los métodos de conservación están basados en la aplicación de conservantes químicos, que permiten disponer de alimentos en todo el mundo y en cualquier época del año. Sin embargo los consumidores cada vez tienen más conciencia sobre el consumo de productos libres de sustancias químicas, se preocupan cada vez más por su salud y por alimentarse sanamente; además tienen mayor acceso a la información y conocen más acerca del tema, lo cual los llevó a plantear la necesidad de investigar y desarrollar nuevas alternativas de conservación, que unidas a las ya existentes, permitan la obtención de productos más “naturales” y menos procesados, que además garanticen la inocuidad y mayor vida útil de los alimentos sin alterar sus características organolépticas.

Hace miles de años se utilizan las bacterias ácido lácticas como conservantes, ya que producen otras sustancias antimicrobianas como el ácido láctico, el etanol, el dióxido de carbono, el benzoato y sustancias proteicas denominadas bacteriocinas. En la década de los 80's surge el uso de las bacteriocinas como bioconservantes para la industria alimentaria, ya que se ha evidenciado que contribuyen favorablemente en la conservación de los alimentos por su capacidad para inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos patógenos y/o alterantes presentes en las materias primas o que llegan al producto por una mala manipulación (Casaus, 1998), por lo tanto permiten reducir el uso de conservantes químicos y suavizar los tratamientos a los que se someten los alimentos procesados, sin que esto afecte su calidad y seguridad. Por lo anterior, las bacteriocinas son el metabolito sobre el cual ha aumentado el interés en los últimos 30 años, tanto de la comunidad científica como de los sectores industriales y en la cual han centrado la mayor parte de sus estudios, desarrollándose diversas investigaciones en torno a su detección, producción, purificación, forma de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas, microorganismos inhibidos o sensibles y aplicación con éxito en la bioconservación de alimentos (Vásquez M., Suárez M., & Zapata B., 2009).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar un estado del arte de la obtención de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de los alimentos

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Compilar información científica sobre las bacterias ácido lácticas, las bacteriocinas y sus propiedades bioquímicas

Describir la producción, secreción y purificación de bacteriocinas según diferentes autores.

Identificar las bacteriocinas más representativas obtenidas a partir de bacterias ácido lácticas.

Relacionar los alimentos para consumo humano en los que se utilizan bacteriocinas de origen ácido láctico para su procesamiento y conservación.

Referir empresas nacionales e internacionales que comercializan bacteriocinas ácido lácticas para ser utilizadas en la elaboración de alimentos.

ALCANCE

Este trabajo tiene como finalidad hacer una revisión bibliográfica sobre el tema de las bacteriocinas producidas a partir de bacterias lácticas y su aplicación en la industria de alimentos; para ello se consultaron fuentes como: artículos científicos, trabajos de grado, documentos, patentes, libros y bases de datos como Science Direct, Scopus, Scielo, entre otras, con el fin de compilar la información más relevante sobre el tema y así crear una herramienta de apoyo que beneficie a los estudiantes, profesores y toda la comunidad académica en general.

La monografía está organizada por capítulos, así, en el primero se relaciona información general acerca de las bacterias ácido lácticas como introducción al tema de las bacteriocinas, las cuales son uno de los productos de su metabolismo, y así abordar el tema de sus características y sus propiedades bioquímicas. El capítulo dos, trata la producción y purificación de las bacteriocinas. El capítulo tres profundiza sobre las bacteriocinas obtenidas por bacterias ácido lácticas, su clasificación, espectro de inhibición y modo de acción para finalizar con el capítulo cuatro en el que se encuentran las aplicaciones, patentes y comercialización de las bacteriocinas.

1. JUSTIFICACIÓN

El hombre a lo largo de la historia, se ha preocupado por conservar los alimentos ya sea por medio de métodos físicos, como el calentamiento, la deshidratación, la irradiación, la congelación, o por métodos químicos como la adición sustancias tales como ácido sórbico, sorbato sódico, sorbato de potasio, entre otros; con el fin de causar la muerte de los microorganismos o inhibir su crecimiento (Madrid, 1992). Por esta razón la industria de alimentos utiliza conservantes químicos con capacidades bactericidas como los sulfatos y los nitritos; sin embargo, estos bactericidas presentan ciertos riesgos, ya que al estar presentes en la mayoría de los alimentos puede sobrepasar el límite de ingesta diaria y entrar a ser tóxicos, ocasionando enfermedades degenerativas en el sistema metabólico como el cáncer (Herrera, 2009).

Actualmente las personas están siendo más conscientes de la alimentación y sus implicaciones para la salud, de allí que se haya asociado a los aditivos químicos como factores que pueden desencadenar problemas en el organismo del ser humano. Por esto y otros factores, la tendencia se está inclinando a consumir alimentos sin aditivos o que contengan aditivos naturales, eliminando el empleo de conservantes químicos en determinados alimentos y utilizando solo refrigeración como mecanismo primario de conservación, esto supone un riesgo potencial para el consumidor, especialmente si se considera la posibilidad de que se rompa la cadena de frío durante el proceso, la manipulación, la distribución y el almacenamiento de este tipo de productos (Casaus, 1998). Se calcula que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de los microorganismos que los estropean y los convierte en foco de enfermedades.

Por lo tanto, la creciente demanda de productos minimamente procesados y listos para el consumo, los cuales son obtenidos generalmente sin el uso de aditivos, plantea un importante reto para la seguridad alimentaria ya que se requiere inhibir el crecimiento microbiano propio de productos crudos, manteniendo la calidad y la frescura de los alimentos. Por ello está adquiriendo mas importancia el uso combinado de barreras contra el crecimiento de microorganismos que permitan obtener alimentos seguros sin afectar las propiedades organolépticas (Marcos, 2007).

La inocuidad, como factor imprescindible de la calidad de los alimentos y por ende de la seguridad alimentaria, comprende el conocimiento y manejo de las causas de su

deterioro. Una de las causas principales se da por el ataque microbiano (bacterias, levaduras y mohos), lo cual tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, etc.) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo); también teniendo implicaciones desde la imagen, la confianza de los consumidores, etc.

La aparición de microorganismos patógenos emergentes, como por ejemplo la *Listeria monocytogenes*, que se desarrolla a temperaturas habituales de refrigeración de los alimentos y es causante de listeriosis en los seres humanos (Joerger, 2003), ahonda el interés y la preocupación por mantener el control durante el proceso y manejo de los alimentos con el fin de garantizar su inocuidad.

Las investigaciones a través de los años han llevado a descubrir sustancias naturales capaces de inhibir o controlar el crecimiento y el desarrollo microbiano en los alimentos. Uno de estos descubrimientos son las bacteriocinas, las cuales poseen actividad antimicrobiana, letal o inhibidora, frente a grupos bacterianos estrechamente relacionados con los que las producen. Su naturaleza química permite que puedan ser consideradas conservantes naturales (Tecnología y Alimentos, 2008). Aunque las bacteriocinas se pueden sintetizar por levaduras, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, son las producidas por las bacterias ácido lácticas las que han recibido mayor atención porque, además de conservar alimentos, provienen de un grupo bacteriano, por excelencia, saludable (Madrid, 1992).

Aunque actualmente el tema de las bacteriocinas es de mucho interés tanto para el sector industrial como para el sector académico, la información disponible se encuentra aún muy fragmentada y poco profunda, lo cual hace dispendioso el proceso de aprendizaje y de investigación. La información se encuentra desarticulada principalmente en fuentes como: artículos científicos y tesis doctorales.

El alcance de este trabajo es generar un documento que compile información relevante sobre las bacteriocinas, su producción y las aplicaciones en alimentos, con el fin de obtener un documento que permita a estudiantes, docentes de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial, carreras afines y a la comunidad académica en general a encontrar información relevante sobre los temas anteriormente enunciados, la cual podrá ser de gran apoyo en futuras investigaciones.

2. CAPITULO 1 LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y LAS BACTERIOCINAS

2.1 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo filogenéticamente diverso de bacterias Gram positivas caracterizado por algunos rasgos comunes, ya sean morfológicos, metabólicos o fisiológicos (Suárez, 1997). Se caracterizan por la producción de ácido láctico como producto metabólico final de la fermentación de carbohidratos (Monroy Dosta, Castro Barrera, Fernández Perrino, & Mayorga Reyes, 2009). Tienen forma de cocos o bacilos, la mayoría son aerotolerantes anaerobios, catalasa y oxidasa negativas y sintetizan ATP en la fermentación láctica de los glúcidos, carecen de citocromos y no forman esporas. Según sus características bioquímicas, estas bacterias se clasifican en homofermentativas; cuyo único producto final de fermentación es el ácido láctico y en heterofermentativas, aquellas que producen además del ácido láctico, etanol, acetato y CO₂. El grupo de las BAL comprende microorganismos de los géneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulun*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Monroy et al., 2009).

Las especies más usadas para retardar el deterioro y preservar los alimentos en forma natural son las de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. Los cuales se han aislado a partir de granos, plantas verdes, productos lácteos y productos cárnicos, fermentación de verduras y las especies mucosas de los animales (Jami, Kneifel, & Domig, 2013). Estos microorganismos producen diferentes sustancias con características antimicrobianas. La capacidad de producir grandes cantidades de ácido acético y ácido láctico por fermentación de los carbohidratos presentes y la consecuente caída del pH son los factores primarios en los que se basa la actividad antimicrobiana de las BAL (Martínez Fernández, 1996).

Asimismo, los productos del metabolismo de algunas BAL, como el peróxido de hidrógeno y el diacetilo producido por bacterias fermentadoras del citrato, pueden contribuir también a la conservación de los productos alimenticios. La acción bactericida del peróxido de hidrógeno se atribuye a su efecto altamente oxidante, mediante peroxidación de los lípidos de la membrana y la destrucción de la estructura molecular básica de proteínas celulares. El diacetilo en cambio actúa desactivando enzimas microbianas por bloqueo o por modificación de la zona catalítica (Martin

Katusic, 2002). Este efecto es muy importante ya que los hábitats de estas bacterias, en especial los alimentos crudos, poseen alta actividad de agua y son muy ricos en nutrientes, por lo que la proliferación bacteriana se ve muy favorecida (Martínez Fernández, 1996).

La mayoría de las BAL sólo pueden obtener energía a partir de azúcares y otros compuestos relacionados. Debido a su limitada capacidad biosintética son muy exigentes nutricionalmente y requieren factores de crecimiento complejos como aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Martínez Fernández, 1996) por lo tanto se localizan frecuentemente en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno como por ejemplo, la leche y productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, ensilados, pescado y derivados de la pesca. Además, algunas bacterias lácticas son habitantes comunes del tracto gastrointestinal y mucosas del hombre y animales, del estiércol y de aguas residuales urbanas e industriales (Monroy et al., 2009).

Las BAL son microorganismos importantes, industrialmente reconocidas por su capacidad de conservación así como por sus beneficios de salud y nutrición, han sido utilizadas hace más de 4 mil años en la elaboración de una gran variedad de alimentos fermentados y elaborados de forma artesanal. Inicialmente se utilizaron para retardar el deterioro y preservar los alimentos a través de fermentaciones naturales, posteriormente se fueron encontrando aplicaciones comerciales como cultivos iniciadores para la industria lechera, cárnica, de elaborados vegetales y de bebidas alcohólicas (Rattanachaiakunsopon & Phumkhachorn, 2010).

Uno de los rasgos fisiológicos más característicos de las bacterias lácticas es su tolerancia al ácido como consecuencia obligada de su metabolismo, lo cual les ofrece una gran ventaja selectiva para desarrollarse en los hábitats donde se encuentran (Martínez Fernández, 1996).

El grupo de las BAL es probablemente sea el más abundante y difundido en la naturaleza, debido a la capacidad que poseen de crecer en una variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas. Dentro de las bacterias lácticas, el grupo *Lactobacillus* es el más importante y heterogéneo, incluyendo especies con propiedades bioquímicas y fisiológicas muy diferentes (Vásquez et al., 2009).

2.2 BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por un gran número de bacterias, incluyendo bacterias ácido lácticas. Normalmente actúan contra microorganismos no deseados o patógenos, estrechamente relacionados o responsables del deterioro y causantes de enfermedades. Por esta razón, se utilizan en varias aplicaciones, entre las que se encuentran la biopreservación, la extensión de la vida útil, la acción antimicrobiana clínica y el control de la fermentación de la

microflora (Marcos Balciunas, Castillo Martinez, Dimitrov, Gombossy de Melo Franco, & De Souza Oliveira, 2013).

Las bacteriocinas comprenden un grupo grande y diverso de proteínas o péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente, algunos de los cuales se someten a modificaciones post-traduccionales, que tienen un efecto bacteriocida o bacteriostático en otras bacterias ya sea de la misma especie (espectro estrecho) o de otros géneros (Espectro amplio) (Marcos et al., 2013). La célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Vázquez et al., 2009).

Su síntesis se produce, generalmente, cuando las bacterias que las sintetizan se encuentran en situaciones de estrés. Como es habitual en las rutas metabólicas de los microorganismos, la síntesis de las bacteriocinas también depende del ecosistema, pH, potencial de óxido-reducción, cantidad de nutrientes, fase de crecimiento, temperatura y oxígeno disponible (Tecnología y Alimentos, 2008).

Las bacteriocinas son producidas por varias especies bacterianas, pero de particular interés son aquellas producidas por bacterias ácido lácticas. Actualmente, la bioconservación en la industria alimentaria se basa en las bacteriocinas producidas especialmente por el género *Lactobacillus*. El potencial de estos péptidos se basa en la adición al alimento del microorganismo productor de bacteriocina o una preparación de ésta, como una barrera adicional cuando se pretende la preservación por métodos combinados (Hill, 1999).

Aunque las bacteriocinas se pueden encontrar en numerosas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, los producidos por las BAL son las más utilizadas en la industria de alimentos. Esta tendencia refleja la creciente conciencia de los consumidores de los riesgos que se derivan no sólo de los agentes patógenos transmitidos por los alimentos, sino también de los conservantes químicos usados para controlarlos. Por el contrario, el uso de BAL y/o sus metabolitos para la conservación de alimentos es generalmente aceptado por los consumidores como algo natural y benéfico para la salud (Parra Huertas, 2010).

La primera bacteriocina fue identificada por Gratia en 1925 como una proteína antimicrobiana producida por *Escherichia coli* y nombrada Colicina (Marcos et al., 2013). El término "bacteriocinas" fue propuesto por primera vez por Jacob y colaboradores en 1953 para referirse a las sustancias proteicas con actividad antimicrobiana de origen bacteriano, luego Tagg et al. (1976) las definieron como un grupo de sustancias antimicrobianas de origen bacteriano, caracterizadas por poseer un componente proteico biológicamente activo y por ejercer un modo de acción bactericida (Cristóbal Delgado, 2008).

En los últimos años se han identificado y caracterizado diversos péptidos antimicrobianos, este interés marcado sobre las bacteriocinas se debe a un conjunto de hechos, como la aprobación de la nisina para su aplicación comercial en 1969, en 1988 como sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS, por sus siglas en

inglés) por la Administración de Alimentos y Drogas de EE. UU. (FDA, por sus siglas en inglés) en ciertos alimentos y el hecho de que la mayoría de enfermedades asociadas al consumo de alimentos pueden ser atribuidas directamente a infecciones o intoxicaciones microbianas (Cristóbal Delgado, 2008).

Las bacteriocinas son inactivadas por enzimas tales como la tripsina y la pepsina, las cuales se encuentran en el tracto gastrointestinal y por lo tanto, no alteran la microbiota del tracto digestivo (Marcos et al., 2013).

2.3 PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LAS BACTERIOCINAS.

Debido a su naturaleza proteica, todas las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y α -quimotripsina) y algunas de origen gástrico, como la pepsina. Esta característica permite la utilización de bacteriocinas en productos alimentarios, puesto que son inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidos como compuestos activos y sin causar los riesgos relacionados con el uso de antibióticos (Martin Katusic, 2002) por lo tanto su ingesta resulta inocua para el consumidor y no altera la microbiota intestinal normal (Suarez Gea, 1997).

La mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL son generalmente estables a pH ácido o neutro, lo que indica probablemente una adaptación de estas sustancias al entorno natural de las bacterias que las producen. La nisina y la lactoestreptocina son, sin embargo la excepción, ya que su actividad antimicrobiana es extremadamente dependiente de este parámetro. La nisina tiene su máxima solubilidad y estabilidad a pH 2,0, disminuyendo en la medida que aumenta el pH siendo irreversiblemente inactiva a pH 7,0, mientras que las lactoestreptocinas son estables y activas entre un rango de pH de 4,2 a 5,0 y reversiblemente inactivas entre un de pH 7,0 y 8,0. Por el contrario, muchas de las bacteriocinas producidas por BAL, resisten la exposición a un amplio rango de pH entre 3,0 y 9,0. La tolerancia a valores de pH extremos entre 1,0 a 2,0 y 10,0 a 11,0 han sido reportadas para la acidocina B y bavaracina A (Martin Katusic, 2002).

En la mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL se ha demostrado cierta resistencia al calentamiento, pudiendo resistir tratamientos equivalentes al de pasteurización, pero la sensibilidad a la temperatura depende del estado de purificación de la bacteriocina, decreciendo en bacteriocinas purificadas y parcialmente purificadas (Martin Katusic, 2002). Sin embargo, la nisina purificada permanece activa después de un calentamiento a 100°C por 10 min a pH 2,0. La característica de termorresistencia que presentan algunas de las bacteriocinas parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria (Martin Katusic, 2002).

3. CAPITULO 2 PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

La producción de bacteriocinas depende del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora. De hecho, la mayoría de las bacteriocinas que se han estudiado hasta el momento presentan una cinética de metabolito primario y, en consecuencia, su producción está correlacionada con el aumento de la biomasa. Por otro lado, el control del pH a lo largo de la fermentación puede resultar en valores más altos de actividad (Martínez Fernández, 1996).

La secreción de las bacteriocinas a través de la membrana citoplasmática se produce por la actividad de transportadores específicos de tipo ABC. Estos complejos proteicos presentan dos dominios claramente diferenciados: a) un dominio de unión a ATP en el extremo carboxilo, donde se genera la energía necesaria para el transporte mediante la hidrólisis de ATP y, b) una región hidrofóbica e integrada en la membrana en el extremo amino que reconoce y transporta el sustrato. Los transportadores ABC de las bacteriocinas de la clase II contienen, además, un dominio con actividad proteolítica en su región amino que reconoce específicamente la secuencia consenso Gly-2-Gly-1. Por lo tanto, estos transportadores tienen una doble función: translocar la bacteriocina al exterior y actuar como peptidasas específicas (Martínez Fernández, 1996).

La producción de las bacteriocinas depende del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora, estando correlacionada la biomasa obtenida con la cantidad de bacteriocina producida. Consecuentemente, la naturaleza de la cepa productora, la composición del medio de cultivo (relación entre carbono, nitrógeno y fósforo), las condiciones de fermentación (temperatura, tiempo de crecimiento, pH inicial y final, generalmente entre 5.5 a 6.0, agitación, aireación, etc) son factores muy importantes que influyen en la producción de las bacteriocinas. Hay BAL que producen más de una bacteriocina, y en este caso el pH y temperatura del medio juegan un papel muy importante en dicha producción (Yin, Wu , & Jiang, 2004).

La producción de bacteriocinas de BAL está usualmente asociada con la fase de crecimiento de la cepa, y dicha producción cesa al final de la fase exponencial (algunas veces antes de que termine el crecimiento). Esto puede ser atribuido a la adsorción de la bacteriocina a las células productoras o a la degradación de las mismas por proteasas (Alquicira Paez, 2006).

En diferentes estudios se ha concluido que la glucosa es mejor fuente de carbono que la sacarosa o la fructosa para la producción de nisina y pediocina AcH (4000 UI/mL), disminuyendo hasta 2 veces con estas fuentes de carbono la producción de la misma bacteriocina. La adición de fosfato de amonio y de potasio suprimió la producción de nisina en un medio sintético. También se observó que algunos aniones como el fosfato y cationes como el magnesio y el calcio afectan la producción de bacteriocinas, aunque esto depende de la cepa (Alquicira Paez, 2006).

La detección de cepas productoras de bacteriocinas permite hacer estudios posteriores que puedan establecer su potencial en el manejo y control de los procesos en la industria alimenticia, sin embargo, se requiere de varios pasos metodológicos para identificar, producir y purificar dichas sustancias.

La producción de algunas bacteriocinas puede ser favorecida bajo ciertas condiciones de crecimiento. Por ejemplo las condiciones de incubación, como son la temperatura y el pH. Por lo que las condiciones de producción deben ser específicas para cada organismo productor (Rojas Muñoz, 2010).

La composición del medio de crecimiento también afecta a la producción de estas sustancias. En general los medios complejos que contienen una fuente rica en nitrógeno son óptimos para el aumento de producción de bacteriocinas (Rojas Muñoz, 2010). Es importante elegir un medio de crecimiento correcto ya que este puede interferir o aumentar la producción y purificación de bacteriocinas, por ejemplo, se ha reportado que el Tween 80, interfiere en la purificación de estas sustancias además de que disminuye la actividad antimicrobiana de pediocina A y lactocina S (Monroy et al., 2009).

El método más común utilizado es la precipitación con sulfato de amonio seguido de una cromatografía HPLC (Rojas & Vargas, 2008). Consiste en que una vez conseguida la producción necesaria de la cepa de interés, se remueven las células por centrifugación y se precipita la proteína con la adición de sulfato de amonio, seguido de varios pasos de cromatografía. Se han desarrollado otros métodos con separaciones por cromatografía y de acuerdo al pH del medio donde logran una total liberación o absorción de las bacteriocinas dentro de la célula (Andrés Bello, 2012).

Para comprobar las características bioquímicas de la bacteriocina producida se tratan las muestras obtenidas con diferentes proteasas (aquimiotripsina, tripsina, proteinasa K, y pronasa E), o con otras enzimas (α -amilasa, lipasa A, lisozima, aminopeptidasa, mutanolisina, DNAsa, y RNAsa); después se determina el tamaño del compuesto producido mediante ultrafiltración o se detecta la actividad en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 15% (Tiwari & Srivastava, 2008).

También se determina el campo de acción inhibitorio de la bacteriocina haciendo diferentes pruebas de inhibición *in vitro*, María Monroy et al., en 2009 describieron dos técnicas ampliamente utilizadas: antagonismo directo e indirecto. La primera consiste en hacer crecer la cepa productora de la sustancia inhibidora junto a una cepa indicadora o sensible y, observar, luego de la incubación la formación de halos de inhibición. El segundo tipo de antagonismo consiste en hacer crecer en primer lugar la cepa productora de la sustancia inhibidora, de esta forma se permite que libere la sustancia y solo entonces se siembra la cepa contra la cual se desea observar el efecto antagónico (Monroy et al., 2009).

3.1 TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

Según José Martínez Corbacho (2000), las técnicas empleadas en la identificación, detección y cuantificación de las bacteriocinas pueden dividirse en tres grandes grupos:

3.1.1 Pruebas biológicas

Las pruebas biológicas constituyen, habitualmente, el punto de partida en la búsqueda de bacterias productoras de bacteriocinas. Los bioensayos más empleados son la prueba de difusión en agar y los métodos turbidométricos, basados en la inhibición del desarrollo de un microorganismo indicador inoculado en una placa microtituladora.

La cuantificación de la actividad antimicrobiana se realiza empleando “unidades arbitrarias” (UA), en la prueba de difusión en placas de agar, ó “unidades de bacteriocina” (UB), cuando el bioensayo utilizado es la prueba turbidométrica. Ambos parámetros se definen como la recíproca de la dilución más alta de una muestra que produce en el agar inhibición del indicador (UA) o que inhibe en las placas microtituladoras un 50% el crecimiento del indicador (UB). No obstante, a pesar de su utilidad, sensibilidad y sencillez, ambas pruebas presentan inconvenientes que las convierten en poco reproducibles y fiables. La cuantificación de la actividad antimicrobiana es subjetiva y depende de la sensibilidad de la cepa indicadora y son pruebas inespecíficas, pues no permiten discriminar otros posibles compuestos o componentes con actividad antimicrobiana. (Martínez, 2000).

3.1.2 Pruebas genéticas

Las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o de hibridación DNA-DNA, (Sout-hern blotting) son pruebas genéticas de uso rutinario que permiten determinar si una bacteria posee el potencial genético de codificar una determinada bacteriocina. Estas pruebas tienen entre sus ventajas su elevada especificidad y sensibilidad y son de utilidad para determinar la presencia del gen estructural de una bacteriocina conocida en un gran número de cepas. Sin embargo, la detección del gen estructural de una bacteriocina en un organismo hospedador no implica conocer y cuantificar su producción (Martínez, 2000).

3.1.3 Pruebas inmunológicas

Las pruebas inmunológicas constituyen métodos útiles para la detección y cuantificación de bacteriocinas. La mayoría de estas pruebas se basan en la transferencia del antígeno a una superficie inerte para que, una vez fijado a la superficie, pueda ser reconocido por un anticuerpo específico; el complejo antígeno-anticuerpo formado se detectará enzimáticamente. En general, los ensayos inmunoenzimáticos permiten la detección y cuantificación de estas sustancias en diferentes sustratos, ya sean los sobrenadantes de los cultivos de los microorganismos productores o los alimentos en los que se encuentran.

En función del tipo de muestra utilizada para detectar el antígeno, en este caso la bacteriocina, las técnicas inmunoenzimáticas pueden dividirse en dos grandes grupos:

a) Ensayos de transferencia de células y su posterior reconocimiento inmunológico, como la prueba de “Colony immunoblotting”.

b) Ensayos basados en la transferencia de bacteriocinas semipurificadas. Dentro de este grupo, existen distintas técnicas, según la transferencia y superficie inerte utilizada para la fijación de los antígenos, como por ejemplo: “Western blotting”, basada en la transferencia electroforética de las bacteriocinas a una membrana de nitrocelulosa; el “Spot immunoblotting”, que es la transferencia directa de las bacteriocinas a una membrana de nitrocelulosa; y la técnica ELISA, que se lleva a cabo mediante la transferencia directa a placas de poliestireno.

Hasta ahora, las técnicas inmunológicas más utilizadas han sido las basadas en la detección y cuantificación directa de las bacteriocinas (Martinez, 2000).

3.2 PURIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

Entre los problemas encontrados durante la purificación se destacan los relacionados con la tendencia que tiene dichas moléculas a asociarse con otras debido a su hidrofobicidad. Las bacteriocinas pertenecen a un grupo extremadamente heterogéneo, los protocolos de purificación específicos necesitan generalmente ser diseñados para cada bacteriocina. Además, la estabilidad de los extractos de bacteriocinas decrece dramáticamente a medida que se incrementa su grado de purificación. Es necesario realizar estudios de producción y contar con grandes proporciones de cultivos antes de iniciar la purificación. Existen métodos rápidos para la purificación de las bacteriocinas, como la separación múltiple por cromatografía, incluyendo el intercambio catiónico, filtración por gel, precipitación por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, interacción hidrofóbica y cromatografía líquida en fase reversa; pero el grado de purificación es bajo (Gao, Belkum, & Stiles, 1999).

Yang et al. (2004) desarrollaron un procedimiento alternativo, basado en la propiedad de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas de ser frecuentemente adsorbidas sobre las células de las cepas productoras. Si se ajusta el pH del caldo de cultivo de una cepa productora, después de un tratamiento térmico para inactivar la función biológica de las células, a un valor al que ocurre la adsorción de la bacteriocina a la superficie celular (usualmente pH 6 a 6.5) se permite una fácil separación de las moléculas (adsorbidas en las células) del caldo de cultivo por simple centrifugación. Posteriormente, los péptidos son liberados selectivamente de las células a pH bajos (1.5 – 2.0). Este método se presenta como una técnica que produce péptidos con alta potencia y en una forma más concentrada (Yin et al., 2004).

4. CAPITULO 3

BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las primeras referencias bibliográficas sobre la producción de bacteriocinas por el género *Lactobacillus* datan de los años 60, cuando De Klerk y Coetzee en 1961 analizaron 189 cepas de lactobacilos homo y heterofermentativos y observaron que, aproximadamente, el 6% producían sustancias bactericidas frente a otros miembros de la familia *Lactobacillaceae*. Desde entonces se han identificado más de 40 bacteriocinas, producidas por especies homofermentativas obligadas (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. amylovorus*, *L. helveticus*), heterofermentativas facultativas (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* y *L. sake*) y heterofermentativas obligadas (*L. fermentum*), muchas de ellas aisladas de productos cárnicos, encurtidos y bebidas. Por ejemplo, *Lactobacillus plantarum* es la cepa más frecuentemente productora de bacteriocinas, lo cual explica su habilidad para controlar otros microorganismos, incluyendo patógenos. Una de las bacteriocinas producidas por *L. plantarum* aislada de productos lácteos es plantaricina C que mata células sensibles a nivel de membrana citoplasmática. Las plantaricinas S y T de *L. plantarum* aisladas de aceitunas verdes fermentadas tienen acción contra varias bacterias Gram positivas incluyendo clostridios y propionibacterias (Cristóbal Delgado, 2008).

En la actualidad las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son las que encierran un mayor interés ya que tienen el estatus de QPS (*qualified presumption of safety*), es decir, son consideradas como microorganismos seguros para la salud, ya que tanto ellas como sus metabolitos han sido consumidos en alimentos fermentados por innumerables generaciones sin que hubiera efectos adversos en la población (Joeger, 2003).

Existen numerosas bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada en la industria de los alimentos para utilizarlas de diversas formas. Algunas bacteriocinas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables específicas estrechamente relacionadas al productor de la bacteriocina, y en otros casos se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos como estafilococos y listerias, respectivamente (González Martínez, Gómez Treviño, & Jiménez Salas, 2003)

Las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas son un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas de origen peptídico, la mayoría no han sido bien caracterizadas aún. Por tanto, no se puede establecer propiedades en común, sin embargo, las propiedades que principalmente se tienen en cuenta son las siguientes: naturaleza,

tamaño molecular, composición aminoacídica y estructura química, termorresistencia y estabilidad frente a pH (Cristóbal Delgado, 2008). Son generalmente estables a pH ácido o neutro, indicando un entorno natural de las bacterias que las producen. Además algunos extractos de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* presentan estabilidad al calentamiento a 50 y 80°C, propiedad que es importante para asegurar el control de microorganismos en algunos procesos de la industria alimentaria (Vázquez et al., 2009).

Aunque por definición las bacteriocinas son sustancias de naturaleza proteica, se han descrito algunas que presentan en su molécula componentes glucosídicos y/o lipídicos, además de una fracción proteica. Así, por ejemplo, la leucocina S y la lactocina 27 son glicoproteínas, la mesenterocina 52 es de naturaleza lipoproteica y la fermenticina es un complejo glucolipoproteico. No obstante, estas conclusiones se obtuvieron empleando bacteriocinas parcialmente purificadas por lo que se requiere la purificación completa para determinar la presencia de las fracciones glucosídicas y/o lipídicas.

Las bacteriocinas producidas por BAL ejercen un efecto inhibitorio especialmente sobre microorganismos Gram positivos, existen pocos reportes de bacteriocinas que inhiban el crecimiento de microorganismos Gram negativos, aunque se han encontrado algunas cepas como el *L. curvatis* y el *L. casei* que inhiben el crecimiento de cepas patógenas de *E. coli* y *Salmonella enterica* sin necesidad de tratamiento previo. Por lo general las bacterias Gram negativas se tratan inicialmente con agentes quelantes como el EDTA, alta presión hidrostática o alguna otra lesión que destruya la pared celular para permitir la entrada de las bacteriocinas y obtener un efecto antibacterial satisfactorio (Rodríguez Peña & Torres Lozano, 2006). En la tabla 1 se hace relación a algunas bacterias ácido lácticas y la respectiva bacteriocina producida.

Tabla 1. Ejemplos de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas.

Microorganismo productor	Bacteriocina
<i>L. lactis</i> WNC20	Nisina Z
<i>L. lactis</i>	Lactococcina
<i>L. lactis</i>	Lacticina
<i>L. johnsonii</i>	Lactacina
<i>L. sakei</i> 148	Lactocina S
<i>L. sakei</i> L45	Lactocina S
<i>L. sakei</i> LTH673	Sakacina K
<i>L. sakei</i> I151	Sakacina P
<i>L. sakei</i> LB706	Sakacina A
<i>L. sakei</i> CTC494	Sakacina K
<i>L. brevis</i> SB27	Brevicina 27
<i>L. curvatus</i> L442	Curvaticina L442
<i>L. curvatus</i> FS47	Curvaticina FS47
<i>L. curvatus</i> LTH1174	Curvacina A
<i>L. mesenteroides</i>	Mesenterocina
<i>L. plantarum</i> CTC305	Plantaricina A
<i>L. plantarum</i> C11	Plantaricina E/F
<i>L. carnosum</i> TA11a	Leucocin a
<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	Pediocina PA
<i>P. acidilactici</i> L50	Pediocina L50
<i>P. pentosaceus</i> Z102	Pediocina PA-1
<i>C. piscícola</i>	Carnocina
<i>C. piscícola</i> LV17B	Carnobacteriocina B2*
<i>C. piscícola</i> V1	Piscicocina v1a *
<i>C. piscícola</i> LV17A	Carnobacteriocina *
<i>C. piscícola</i> JG126	Piscicolina 126 I *
<i>C. piscícola</i> KLV17B	Carnobacteriocina B1/B2 *
<i>C. divergens</i> 750	Divergician 750
<i>C. divergens</i> LV13	Divergician A
<i>M. varians</i>	Variacina
<i>L. gelidum</i>	Leucocina

*: Microorganismo aislado del tracto digestivo de peces.

Fuentes: (Monroy et al., 2009; Parra Huertas, 2010).

4.1 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Diversos investigadores han buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo con sus características bioquímicas y genéticas. A continuación se presenta la clasificación de estos compuestos propuesta por Kemperman en 2003 (Monroy et al., 2009).

- **Clase I: Lantibióticos.** Son péptidos pequeños (< 5 KDa), policíclicos, estables al calor, activos a nivel de membrana, contienen algunos aminoácidos poco comunes en su composición como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman postraduccionalmente (Monroy et al., 2009). La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, lo que da lugar a la formación de dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb) (López, Ochoa Z., Anaya L., Martínez T., & Medina M., 2008). Aunque estos precursores puedan formar parte de la estructura final del lantibiótico, en muchas ocasiones sufren una condensación con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas presentes en la molécula, formándose puentes alanina-S-alanina (lantionina) o ácido aminobutírico-S-alanina (β -metil lantionina) (Martínez Fernández, 1996). Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina producida por *L. lactis*, es la bacteriocina mejor caracterizada, y se comercializa para uso como aditivo alimentario. Su aplicación en alimentos es amplia, pues actúa adecuadamente a pH ácido, lo que permite su uso en productos fermentados. Otros ejemplos de este grupo son la lacticina 481 de *L. lactis*, la carnocina U149 producida por *C. piscícola* y la lactocina S y la plantaricina C sintetizadas por *Lb. Sake* y *Lb. Plantarum* respectivamente (Vásquez et al., 2009). A su vez, en función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen en 2 grupos:

- **Clase I A: Péptidos de 2.1 a 3.4 KDa, elongados y catiónicos (2 a 7 cargas positivas)** Actúan a nivel de membrana y engloban a los lantibióticos de un sólo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total (Monroy et al., 2009).

- **Clase I B: Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.** Tiene un tamaño comprendido entre 1.9 y 2.0 KDa sin carga o cargados negativamente (Martínez Fernández, 1996).

- **Clase II: No lantibióticos: bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente en su estructura primaria.** Son péptidos pequeños (< 10 KDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática (Monroy et al., 2009). El representante más característico de este grupo es la pediocina PA-1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina (Martínez Fernández, 1996). En este grupo se pueden identificar tres subclases:

- **Clase II a:** Tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC (T: tirosina, G: glicina, N: asparagina y V: Valina), muestran una potente actividad inhibitoria frente a la *Listeria spp.* y sus representantes característicos son la

pediocina PA-1 producida por la *P. acidilactici* y la sakacina A y P producidas por *Lb. Sake* (Monroy et al., 2009).

- **Clase II b:** Formadores de complejos para la formación de poros que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana, y actúan mediante un mecanismo de formación de poros en la membrana plasmática. En este grupo se encuentran la lactococcina M y G producidas por cepas de *L. lactis*, la lactacina F producida por *Lb. Johnsonii* y las plantaricinas E/F, J/K y S sintetizadas por *Lb. Plantarum*, (Martínez Fernández, 1996).
- **Clase II c:** Péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A, lactococcina B y acidocina B (Monroy et al., 2009).
- **Clase III:** Bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina J, acidofilicina A, lactacinas A y B y la caseicina 80. Todas ellas producidas por cepas de *Lactobacillus spp* (Martínez Fernández, 1996).
- **Clase IV:** Bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52).
- **Clase V:** Bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasericina A.

En la tabla 2 se puede observar una síntesis de la clasificación de las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas relacionando las características más importantes de cada clase, las subclases en las que se dividen, el microorganismo productor y su respectiva bacteriocina.

Tabla 2 Clasificación de las bacteriocinas y microorganismos productores.

Clase	Características	Subclase	Microorganismo Productor	Bacteriocina
Clase I: Lantibióticos	Péptidos pequeños (< 5 KDa) Termoestables Activos a nivel de la membrana Péptidos que contienen β -Lantionina Modificados postraduccionalmente	I A: Péptidos lineales y catiónicos	Lactococcus lactis	Nisina A
			Lactococcus lactis	Nisina Z
			Staphylococcus epirdemidiis	Epidermina
			Lactobacillus sake	Lactocina S
		Lactococcus lactis	Lacticina 481	
		I B: Péptidos globulares e hidrófobos	Bacillus subtilis	Mersacidina
Streptomyces cinnamoneus	Cinamicina			
Clase II: No lantibióticos	Péptidos pequeños (< 10 KDa) No lineales No modificados postraduccionalmente Termoestables Actúan a nivel de la membrana	II a: Potente actividad inhibitoria frente a la Listeria	Leuconostoc gelidum	Leucocina A
			Pediococcus acidilactici	Pediocina PA-1
			Leuconostoc mesenteroides	Mesenterocina Y105
			Lactobacillus acidophilus	Acidocina A
			Enterococcus faecium	Enterocina A
			Lactobacillus sake	Sakacina A
			Lactobacillus curvatus	Curvacina A
			Lactobacillus bavaricus	Bavaricina A
			Carnobacterium piscícola	Pisicolicina 126
		II b: Compuesto por dos péptidos	Lactococcus lactis	Lactococcina G
			Lactococcus lactis	Lactococcina M
			Lactobacillus casei	Lactocina 705
			Lactobacillus johnsonii	Lactacina F
			Leuconostoc	Leucocina A
			Lactobacillus plantarum	Plantaricina A
			Lactobacillus plantarum	Plantaricina S
			Lactobacillus plantarum	Plantaricina EF
			Lactobacillus plantarum	Plantaricina JK

Clase	Características	Subclase	Microorganismo Productor	Bacteriocina
Clase II: No lantibióticos		II c: Requieren un péptido líder	Lactobacillus acidophilus	Acidocina B
			Carnobacterium piscicola	Carnobacteriocina A
			Carnobacterium divergens	Divergina A
			Enterococcus faecium	Enterocina P
Clase III	Péptidos grandes (>30 kDa) Termolábiles		Lactobacillus helveticus	Helveticina J
			Enterococcus faecalis	Enterolisina A
			lactobacillus helveticus	Helveticina V-1829
Clase IV	Bacteriocinas complejas, una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glusídicas		Clostridium beijerinckii	Circularina A
			Leuconostoc paramesenteroides	Leuconocinas S
			Lactobacillus helveticus	Lactocina 27
Clase V	De estructura circular No modificadas postraduccionalmente		Streptococcus faecalis	Enterocina AS-48
			Lactobacillus gasseri LA39	gasericina A

Fuente: (Marcos et al., 2013; Diez Aldama, 2011).

4.2 ESPECTRO DE INHIBICIÓN

El espectro de inhibición muestra que tipo de microorganismos son sensibles a ser inhibidos por las bacteriocinas. El espectro de inhibición es reducido para las bacterias ácido lácticas, generalmente es sobre microorganismos relacionados taxonómicamente, de forma que presentan actividad bactericida solamente frente a cepas sensibles. La susceptibilidad de las bacterias Gram negativas a las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas es mucho más limitada y hasta hace poco no se conocían bacteriocinas producidas por bacterias lácticas de origen alimentario activas naturalmente frente a bacterias Gram negativas (Vázquez et al., 2009), pero recientemente se han encontrado algunas cepas como el *L. curvatus* y el *L. casei* que inhiben el crecimiento de cepas patógenas de *E. coli* y *Salmonella enterica* sin necesidad de tratamiento previo y se han desarrollado también bacteriocinas que inhiben bacterias Gram negativas a partir de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* (Rodríguez Peña & Torres Lozano, 2006).

Por lo general las bacterias Gram negativas se tratan inicialmente con agentes quelantes como el EDTA, alta presión hidrostática o alguna otra lesión que destruya la pared celular para permitir la entrada de las bacteriocinas y obtener un efecto antibacterial satisfactorio. (Rodríguez Peña & Torres Lozano, 2006). La producción de bacteriocinas con un espectro de inhibición relativamente amplio, es propia de bacterias de origen alimentario (Vázquez et al., 2009). Existen numerosas bacteriocinas producidas por otras familias de bacterias con un amplio límite de acción, inhibiendo el crecimiento de especies de bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos patógenos de humanos y virus. Incluso pueden tener actividad contra diversas células eucariotas, tales como eritrocitos humanos y bovinos (López, Ochoa Z., Anaya L., Martínez T., & Medina M., 2008).

Klaenhammer (1988) clasificó las bacteriocinas según su espectro de inhibición en dos grupos: a) Bacteriocinas activas frente a cepas taxonómicamente relacionadas (lactococinas A,B,M y G, lactacina B y helveticina J) y como b) Bacteriocinas con un amplio rango de actividad frente a bacterias Gram positivas (nisina, pediocinas y lactacinas F) (Vázquez M. et al., 2009; López M. et al., 2008; Martínez Fernández, 1996).

El espectro de inhibición de las bacteriocinas o sus extractos puede verse afectado según el tratamiento al que son sometidos, como liofilización, concentración del sobrenadante, purificación y neutralización, entre otros. En el caso particular de los extractos de bacteriocinas, la actividad es mayor cuando son concentrados, pero es necesario tener en cuenta la termoresistencia para evitar la alteración de la funcionalidad de la bacteriocina. En el caso de la plantaricina producida por el *Lactobacillus plantarum* LPBM10 la purificación puede disminuir la actividad y termotolerancia. Además, la acción combinada de dos o más bacteriocinas puede reforzar considerablemente la acción inhibitoria (López et al., 2008).

En la tabla 3 se encuentra una lista de microorganismos no lácticos y la respectiva bacteriocina de bacterias ácido lácticas que lo inhibe.

Tabla 3. Espectro inhibitorio frente a microorganismos no lácticos de bacteriocinas de bacterias ácido lácticas.

Microorganismo sensible	Bacteriocinas
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Sakacina A
<i>Bacillus cereus</i>	Lactocina - S, Lactostrepcin - 5, Nisina, Pediocina - A, Pediocina - AcH, Sakacina - A
<i>Bacillus coagulans</i>	Nisina
<i>Bacillus licheniformis</i>	Nisina
<i>Bacillus pumilis</i>	Termofilina
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Nisina
<i>Bacillus subtilis</i>	Lacticina - 481, Nisina, Termofilina
<i>Bronchothrix thermospacta</i>	Curvacina - A, Pediocina - AcH, Sakacina - A, Sakacina - P
<i>Clostridium bifermentans</i>	Nisina
<i>Clostridium botulinum</i>	Nisina, Pediocina - AcH, Sakacina - A, Sakacina - P
<i>Clostridium butyricum</i>	Nisina, Reuterina
<i>Clostridium perfringens</i>	Nisina, Pediocina - A, Pediocina AcH, Pediocina - VTT, Reuterina, Termofilina
<i>Clostridium sporogenes</i>	Nisina, Pediocina - A
<i>Clostridium tybutricum</i>	Lacticina - 481, Lactocina - S, Pediocina -AcH
<i>Echerichia coli</i>	Reuterina, Termofilina
<i>Listeria innocua</i>	Lactacina - 481, Lactocina - S, Pediocina - A, Pediocina - AcH
<i>Listeria ivanovii</i>	Pediocina - A, Pediocina - AcH, Pediocina - PAC1
<i>Listeria monocytogenes</i>	Carnobacteriocin A&S, Curvacina -A, Enterocina - 1146, Lactacina - S, Lacticina - 481, Leucocin - A, Nisina, Pediocina - A, Pediocina - AcH, Pediocina - JD, Pediocina PA-1, Pediocina PAC10, Pediocina - VTT, Piscicolina - 61, Reuterina, Sakacina - A, Sakacina - P
<i>Listeria seeligeri</i>	Pediocina - A
<i>Listeria welchii</i>	Lacticina - 481, Pediocina - A
<i>Proteus mirabilis</i>	Nisina
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Termofilina
<i>Pseudomona fluorescens</i>	Termofilina
<i>Salmonella enteritidis</i>	Reuterina, Termofilina
<i>Salmonella infantis</i>	Pediocina - VTT, Reuterina
<i>Salmonella lyphimurium</i>	Reuterina, Termofilina
<i>Shigella sp.</i>	Reuterina, Termofilina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nisina, Lacticina - 481, Pediocina - A, Pediocina - AcH, Plantaricina -S
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Curvacina, Lacticina - 481, Lactocina - S, Pediocina - AcH
<i>Staphylococcus epidermis</i>	Nisina
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Nisina

Fuente: (Castro Albornoz & Valbuena Colmenares, 2009)

4.3 MODO DE ACCIÓN

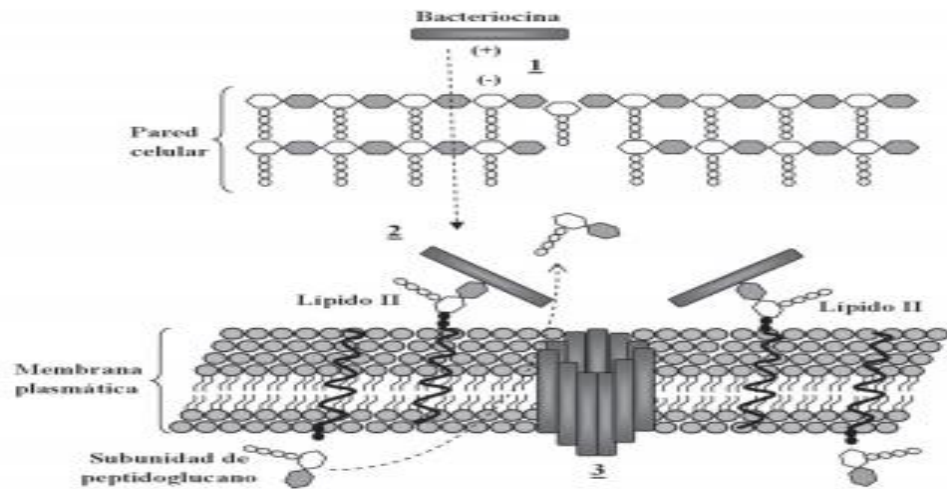
El modo de acción de las bacteriocinas está determinado por la composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína en función de la inmunidad, además de la composición química del medio ambiente (Monroy et al., 2009).

La formación de poros en la membrana citoplásmica de células sensibles es un mecanismo de acción común, presentado por las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas (González et al., 2003). En este proceso las bacteriocinas actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática del microorganismos sensible a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños, pérdida de iones K, ATP o la alteración de la fuerza motriz de protones (fuente de energía celular) necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos (González et al., 2003). La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida potencial de membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, descenso en la síntesis de ADN, ARN y proteínas originando finalmente la inhibición o muerte celular (Vázquez et al., 2009).

Las bacteriocinas se inactivan, al menos, por un enzima proteolítica de origen pancreático (tripsina y alfa-quimiotripsina) y gástrico (pepsina) característica que hace de estos metabolitos bacterianos sustancias seguras para ser incluidas como biopreservantes de los alimentos, puesto que serían inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal sin ser absorbidos como compuestos activos y sin causar, por tanto, los riesgos relacionados con el uso de antibióticos. Estudios de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus curvatus* LTH1174 en la supervivencia de *E.coli* y *Listeria* en un modelo dinámico del estómago y el intestino, reportan que las bacteriocinas son inactivadas por las enzimas digestivas y además, es evidenciado el efecto antagónico sobre *Listeria innocua*. Adicionalmente se han encontrado otras bacteriocinas sensibles a enzimas no proteolíticas, como la leuconocina S que se inactiva por una amilasa (Vázquez et al., 2009).

En la figura 1 se observa un modelo que muestra el mecanismo de acción dual de la nisina. En la etapa 1 la nisina posee una carga neta positiva que incrementa su interacción con las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Posteriormente en la etapa 2, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular interfiriendo con su síntesis, lo que lleva a la bacteria a muerte celular. Finalmente en la etapa 3, adicionalmente, varias moléculas de nisina utilizan al lípido II para anclarse e insertarse en la membrana celular y comenzar con la formación de los poros, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular.

Figura 1. Modo de acción de las bacteriocinas



Fuente: (López et al., 2008)

4.4 BACTERIOCINAS REPRESENTATIVAS

4.4.1. Nisina

La nisina es una bacteriocina producida por diversas cepas de *Lactococcus lactis sub spp. Lactis*, fue la primera bacteriocina aislada a partir de esta bacteria ácido láctica. Rogers la descubrió en 1928, luego de observar que durante la maduración de unos quesos, determinadas cepas de *Lactococcus lactis* inhibían el crecimiento de otras bacterias lácticas patógenas y que ésta además no era perjudicial para la salud (Suarez Gea, 1997).

Desde 1951 la nisina juega un papel importante en la conservación de los alimentos. Reportes indican que la primera preparación comercial de este conservante se obtuvo en Inglaterra en 1953. Para 1968 una comisión conjunta de la FAO/WHO aceptó su empleo como conservante alimentario, indicando que la dosis aceptable podría ser superior a los 0,125 mg/Kg (FAO/WHO, 1969). En 1983 se añadió a la lista positiva de aditivos del CEE (Consejo de la Unión Europea) con el número E234 y la FDA le confirió el estatus de sustancia GRAS (*Generally Regarded As Safe*) para su empleo en la elaboración de quesos fundidos pasteurizados (Martínez Fernández, 1996).

Actualmente se emplea en más de 50 países, aunque con distintos criterios en cuanto a los límites máximos de utilización permitidos y de alimentos donde se puede emplear. La nisina es conocida comercialmente como Nisina (E234), está autorizada como conservante alimentario en la Unión Europea por la Directiva 95/2/(CE) sobre aditivos alimentarios diferentes a los colorantes y los edulcorantes (The EFSA Journal, 2006).

Es la única bacteriocina incluida en la lista positiva de aditivos alimentarios, Codex Alimentarius, en su norma estándar para quesos, Puede ser usada a una concentración de 12,5 mg/Kg (Codex Stan 283 – 1978) (Sierra Lopera, 2012)

En la tabla 4 se encuentran de acuerdo con el Codex Alimentarius el límite de su uso como conservante en las cantidades máximas especificadas en algunos alimentos.

Tabla 4. Disposición del Codex Alimentarius para la Nisina

Categoría de Alimentos	Nivel máximo
Nata (crema) cuajada (natural)	10 mg/kg
Postres a base de cereales y almidón. (por ejemplo: Pudines de arroz, pudines de mandioca)	3 mg/kg
Productos análogos al queso	12 mg/kg
Queso de proteínas del suero	12 mg/kg
Queso maduro	12 mg/kg

Fuente: (Codex Alimentarius, 2013)

En Colombia por medio de la resolución 4125 de 1991 de Ministerio de Salud se regula que la nisina puede ser usada como conservante en cantidades máximas de 125 mg/kg, que corresponden a 5000 IU/ml (Ministerio de Salud, 2012). La nisina es producida industrialmente y comercializada como NISAPLIN® y como CHRISIN® (Montalban Lopez, Sánchez Hidalgo, Muñoz, Platero, & Maquera, 2007) (Andrés Bello, 2012).

La nisina se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la transformación de alimentos como aditivo para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas. Es ácida por naturaleza por lo que es estable a pH ácidos; su solubilidad aumenta al aumentar la temperatura y disminuir el pH (Monroy et al., 2009). Su naturaleza peptídica permite su degradación por las enzimas digestivas, es inactivada rápidamente en el intestino y no puede detectarse en la saliva de humanos diez minutos después de haber consumido un líquido que la contenga, resultando así presuntivamente inocua para el consumidor y su microbiota intestinal y no produce cambios en las características organolépticas de los alimentos (Sierra Lopera, 2012). Su espectro de acción incluye a los potenciales patógenos y alterantes asociados a los alimentos (*B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Clostridium spp.*, *E. coli*, entre otras). Sus propiedades físico-químicas la hacen resistente a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante su fabricación y almacenamiento y, además, su pequeño tamaño permite la difusión en sistemas semisólidos, propios de la mayoría de los productos alimentarios (Martínez Fernández, 1996).

Es la bacteriocina mejor caracterizada, este conservante natural se emplea para prolongar la vida útil de diversos productos lácteos pasteurizados, se utiliza para evitar la alteración de las conservas por microorganismos termófilos, para disminuir la intensidad del tratamiento térmico de los alimentos enlatados, podría contribuir a la sustitución de los nitritos como agente antibotulínico e inhibir la *Listeria*, controla la alteración de bebidas alcohólicas (control la fermentación maloláctica en vinos y para

evitar el crecimiento de bacterias lácticas durante la fabricación de la cerveza), ayuda en la conservación de alimentos de pH ácido, en productos de panadería con humedad elevada, huevo líquido pasteurizado, además de inhibir el crecimiento de *Clostridium* en los quesos de pasta cocida y en los quesos fundidos donde este crecimiento es responsable de hinchazones tardías (Martínez Fernández, 1996)

4.4.2 Pediocina

Las primeras referencias de la pediocina PA-1 se remontan a los años 80 cuando el grupo de González y Kunka en 1987 la aislaron de una cepa de origen cárnico: *P. acidilactici* PAC1.0 (PA-1).

La pediocina es la bacteriocina más caracterizada después de la nisina, es una bacteriocina producida por cepas de las especies *Pediococcus acidilactici* de origen cárnico, *Pediococcus parvulus* de origen vegetal y una cepa de *L. plantarum* aislada de queso. La pediocina PA-1 es un péptido de 44 aminoácidos que no se modifican postraducionalmente. Tiene carga neta positiva a pH 6,0 y pH básico entre 8,6 y 10. La secuencia primaria conocida es suficiente para inducir un efecto tóxico en las células sensibles (Díez Aldama, 2011). La pediocina es activa frente a un gran número de bacterias Gram positivas relacionadas, tales como algunas especies de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*. También posee actividad frente a otras bacterias Gram positivas más lejanas filogenéticamente, entre las que se encuentran las responsables de algunas tox infecciones alimentarias como el *Bacillus*, la *Brochotrix*, la *Listeria* y el *Staphylococcus*. Con respecto a las bacterias Gram negativas, sus cubiertas celulares impiden el acceso de las bacteriocinas a la membrana plasmática. Sin embargo, tal como ocurre con la Nisina, es suficiente alterar la permeabilidad de sus membranas externas para permitir la acción antimicrobiana de las bacteriocinas (Díez Aldama, 2011).

Es utilizada como conservador en productos vegetales y cárnicos y por su elevada actividad contra especies de *Listeria* tiene un alto potencial para ser utilizada como conservante en alimentos lácteos (González et al., 2003). La pediocina PA-1 añadida al agua que se emplea para higienizar hortalizas crudas (repollo, coliflor, entre otras) como alternativa al tratamiento con hipoclorito o junto con las células lisadas productoras de la bacteriocina en carne de pollo cruda sometida a radiación. Esta comercializada bajo el nombre de Alta 2341 y consiste en un fermentado de un cultivo iniciador de *P. acidilactici* productor de pediocina, recomendado especialmente para productos cárnicos y lácteos (Díez Aldama, 2011).

4.4.3 Plantaricinas

Son bacteriocinas producidas por diferentes cepas del *Lactobacillus plantarum*. Las plantaricinas E/F y J/K son péptidos antimicrobianos obtenidos del *L. plantarum* C11 que pertenecen a la clase IIb bacteriocinas, cuya actividad, por definición, depende de la acción complementaria de dos péptidos diferentes. La actividad antimicrobiana de los péptidos individuales es pobre, sin embargo, su potencia aumenta aproximadamente 1000 veces cuando se combina con sus péptidos afines, plantaricina E con plantaricina F y Plantaricina J con plantaricina K (Atrih, Rekhif, Moir, Lebrihi, & Lefebvre, 2001). Ambas bacteriocinas muestran espectros de inhibición relativamente estrechos, siendo en su mayoría activos frente a especies de lactobacilos (por ejemplo, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. sakei*, *L. curvatus*), además de un número de otras bacterias Gram-positivas estrechamente relacionado con el productor *L. plantarum* (por ejemplo, *Pediococcus pentosaceus* y *P. acidilactici*) (Diep, Straume, kjos, Torres, & Nes, 2009).

La plantaricina A es un péptido sin modificaciones postraduccionales, el espectro antimicrobiano es relativamente estrecho, y comprende principalmente diferentes de *Lactobacillus*, especies tales como *L. casei*, *L. sakei* y *L. viridescens*, además de *L. plantarum*. Se muestra una actividad significativamente más baja que los otros plantaricinas E/F y J/K (Diep et al., 2009).

4.4.4 Divergicina

Es una bacteriocina producida por *Caernobacterium divergens*, se caracteriza por poseer un sistema de secreción que involucra la presencia de un péptido señal, pequeño, de naturaleza hidrofóbica y termoestable (González et al., 2003). Es de naturaleza débilmente ácida, característica interesante por su potencial utilización en los alimentos ya que su efecto sobre las características sensoriales y organolépticas pueden ser mínimos (Tahiri I., Desbiens, Benech, Kheadr, & Lacroix, 2004).

La divergicina no tiene efecto inhibitor frente a otras bacterias ácido lácticas excepto *Carnobacterium spp.*, por lo tanto puede ser útil con los alimentos que tienen flora láctica deseables. Debido a su potente actividad antilisterial, la divergicina puede tener una aplicación potencial como bioconservante para mariscos ligeramente conservado donde la *Listeria* podría ser un problema grave, ya que podía tolerar condiciones de refrigeración, incluso en presencia de altas concentraciones de sal (Tahiri I., Desbiens, Kheadr, & Lacroix, 2009).

4.4.5. Helveticina j.

Esta bacteriocina es producida por *Lactobacillus helveticus*, microorganismo que se encuentra de manera natural en quesos madurados y en algunos alimentos fermentados y es sensible al calor (González et al., 2003). La bacteriocina presenta actividad antibacteriana contra especies relacionadas como: *L. helveticus*, *L. jugurti*, *L. bulgaricus*, *L. Lactoc* y *L. lactisoccus lactis* (Zhang, Pan, Zhang, Chen, & Chen, 2013).

5. CAPÍTULO 4

USO DE LAS BACTERIOCINAS COMO CONSERVANTE EN ALIMENTOS

5.1 ADITIVOS ALIMENTARIOS

Un aditivo es cualquier sustancia que normalmente no se consume como alimento en sí, ni se usa como ingrediente, se añade intencionalmente a los alimentos, sin el propósito de cambiar sus propiedades nutricionales, con el fin de modificar sus características, conservación y/o para mejorar su adaptación al uso que se destinen (Madrid, 1992). El principal objetivo de los aditivos en los alimentos es, disponer de productos sanos, que no perjudiquen la salud del consumidor y que mantengan sus cualidades organolépticas y microbiológicas hasta el momento de su consumo.

Los aditivos cumplen varias funciones útiles en los alimentos tales como: mantener las cualidades y características de los alimentos que exigen los consumidores, lograr que los alimentos continúen siendo seguros, nutritivos y apetecibles en su proceso desde el "campo hasta la mesa", ya que éstos están sometidos a muchas condiciones medioambientales que pueden modificar su composición original, como los cambios de temperatura, la oxidación y la exposición a microorganismos no deseados (Madrid, 1992).

El uso de aditivos está estrictamente regulado, y los criterios que se tienen en cuenta para su uso es que tengan una utilidad demostrada, que sean seguros y no sean perjudiciales para la salud del consumidor (Pulgar, 1986).

Según su función, los aditivos son clasificados así (Pulgar, 1986):

- Sustancias que impiden las alteraciones químicas biológicas: antioxidantes, sinérgicos de antioxidantes y conservantes.
- Sustancias estabilizadoras de las características físicas: emulgentes, espesantes, gelificantes, antiespumantes, antipelmazantes, antiaglutinantes, humectantes, reguladores de pH.
- Sustancias correctoras de las cualidades plásticas: mejoradores de la panificación, correctores de la vinificación, reguladores de la maduración.
- Sustancias modificadoras de los caracteres organolépticos: colorantes, potenciadores del sabor, edulcorantes artificiales, aromas.

5.2 CONSERVANTES

Los conservantes para alimentos son aditivos que actúan como agentes físicos, químicos o naturales y que se utilizan básicamente para alargar la vida útil del producto, previniendo posibles daños o alteraciones de su sabor, textura o apariencia debidos a la acción de agentes químicos (oxidación), físicos (temperatura y luz) o biológicos (microorganismos); obteniendo así un alimento más seguro para el consumidor sin alterar sus características organolépticas (Pulgar, 1986). Aunque la innovación y la naturalidad de los alimentos no es una tarea fácil. Mejorar la conservación, facilitar la preparación o evitar la adición de sustancias externas al alimento son aspectos que están en continuo desarrollo (Madrid, 1992; Pulgar, 1986).

La conservación por medios físicos como la deshidratación, el ahumado, la congelación, el envasado, la pasteurización y el escaldado son suficientes para algunas aplicaciones alimentarias; aunque en muchos casos es necesario el uso de aditivos alimentarios con el fin de proporcionar características deseadas en el alimento o para reforzar o complementar la actividad conservante del método físico. La conservación por adición de sustancias químicas presenta ventajas como su uso sencillo, son económicas y de fácil adquisición, pero por otro lado parte de la población rechaza fuertemente su aplicación por temor a sus posibles efectos tóxicos o por inclinación a consumo de alimentos más “naturales”. Esto ha llevado a las industrias procesadoras de alimentos a la búsqueda de conservantes biológicos con el fin de sustituir o disminuir la dosis de sustancias químicas y así satisfacer las exigencias de los consumidores (Nuñez, Cayré, Castro, Campos, & Garro, 2001).

Actualmente se valora el aprovechamiento de las propias actividades de los microorganismos en la conservación de los alimentos, en lo que se denomina conservación biológica o bioconservación. Este proceso se puede definir como “la extensión de la vida media y de la seguridad de los alimentos mediante el empleo de su microbiota natural o controlada y/o sus productos antibacterianos”. Sus efectos se deben a la competencia por los nutrientes entre los distintos microorganismos del alimento y a la producción de sustancias inhibitoras, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y/o bacteriocinas. Los bioconservantes por excelencia son, sin lugar a duda, las bacterias ácido lácticas, cuyo empleo seguro desde hace millones de años les ha valido el estatus de organismos reconocidos como seguros para su empleo en el procesado de alimentos (QPS: *Qualified Presumption Of Safety* O GRAS: *Generally Recognised As Safe*) (Montalban et al., 2007). Hoy día, su uso programado en las fermentaciones es aceptado por los consumidores como natural y saludable, y representa una solución ecológica a la problemática de la conservación de los alimentos, en especial de aquellos mínimamente procesados (Montalban et al., 2007).

5.3 IMPORTANCIA DEL USO DE BACTERIOCINAS EN LOS ALIMENTOS

Actualmente hay una demanda creciente por los alimentos mínimamente procesados, el uso de aditivos naturales en los alimentos y por reducir el uso de conservadores químicos, esto ha llevado a la industria alimentaria a reconsiderar el potencial antimicrobiano de las bacteriocinas producidas por BAL ya que pueden ser consideradas como conservadores naturales o bioconservadores (Alquicira Paez, 2006). De todas las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas aparecen como las más adecuadas desde un punto de vista tecnológico para ser utilizadas como conservantes de grado alimentario (Martínez Fernández, 1996).

La aceptación del empleo de bacteriocinas como una alternativa natural para la preservación de alimentos ha despertado interés en productores cuyos mercados les presentan exigencias estrictas de calidad microbiana (Concha, Farías, Kümmerlin, & Sesma, 1999). No sólo interesa una reducida carga microbiana, sino la ausencia de patógenos de importancia sanitaria que constituyen un riesgo para los consumidores ya que su naturaleza peptídica permite la degradación por las enzimas digestivas, resultando así presuntivamente inocuas para el consumidor y su microbiota intestinal de ocupación. En algunos casos, su espectro de acción incluye a los potenciales patógenos y alterantes asociados a los alimentos (*B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Clostridium*, etc.) (Díez Aldama, 2011). Por último, sus propiedades fisicoquímicas las hacen resistentes a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante su fabricación y almacenamiento y, además, su pequeño tamaño permite la difusión en sistemas semisólidos, propios de la mayoría de los productos alimentarios (Martínez Fernández, 1996).

Desde un punto de vista aplicado, las bacteriocinas pueden ser usadas como ingredientes bioactivos en polvo para alimentos, como péptidos purificados, semipurificados o a través de cultivos lácticos productores de bacteriocinas. En cualquier caso, el uso de las bacteriocinas como una eficaz barrera requiere de una tecnología en la cual actuarían diferentes factores antimicrobianos tradicionales (pasteurización, pH, preservantes), sinérgicamente con nuevas tecnologías (atmósfera modificada, envasado, altas presiones), cuyos sistemas en conjunto inducirían una acción letal sobre la bacteria que se quiere inhibir (Martin Katusic, 2002)

5.4 APLICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS EN ALIMENTOS

5.4.1 Productos lácteos

Los primeros estudios de aplicación de las bacteriocinas en quesos se remontan a los años 50, utilizándose junto con los indicadores cepas productoras de nisina para

prevenir la presencia de clostridios en la fabricación del queso Gruyere, también se ha estudiado la inhibición de la *Listeria monocytogenes* por la producción *In situ* de nisina durante la elaboración de queso Camembert y de adición directa de nisina en el caso de los quesos frescos. La inhibición de la *Listeria monocytogenes* también se ha observado con otras bacteriocinas como la enterocina, que se utiliza como iniciadora en la elaboración del queso Italiano Taleggio o por la adición de pediocina PA-1 (Nuñez et al., 2001).

En quesos fermentados es difícil asegurar una distribución pareja de un inhibidor a menos que éste sea adicionado mientras la leche está aún líquida. Uno de los problemas que se presentan al usar bacteriocinas de amplio espectro tales como nisina en productos fermentados es que los microorganismos iniciadores probablemente serán inhibidos al igual que los microorganismos de deterioro y patógenos. Este problema puede ser remediado utilizando cultivos iniciadores resistentes a la nisina, si la nisina es adicionada como un preservante exógeno, o usando iniciadores como bacterias productoras de nisina con inmunidad innata (Hill, 1999)

La nisina es usada en quesos procesados, pasteurizados para prevenir la germinación de esporas tales como la del *Clostridium tyrobutyricum* que puede sobrevivir a tratamientos térmicos tan altos como 85 - 105°C. Uno de los efectos más importantes es la prevención de la germinación de esporas de clostridios. Esto ha sido reportado como un problema particular en quesos Suizo y quesos semiduro Dutch, principalmente debido a la esporulación de *C. butyricum* y *C. tyrobutyricum* (Hill, 1999). El uso de nisina permite además que esos productos puedan ser formulados con altos niveles de humedad y bajos contenidos de NaCl y fosfato, y también permite el almacenamiento a cabinas sin refrigeración sin riesgo de deterioro. El nivel de nisina usado depende de la composición del alimento, probablemente de la carga de esporas, vida útil requerida y la temperatura de almacenamiento (O'keeffe & Hill, 1999)

Fenelon et al. (1999) usaron una cepa productora de lacticina 3147 como iniciador en queso Cottage al cual se le inoculó 10⁴ ufc/g de *L. monocytogenes*, la actividad de la lacticina 3147 fue detectada a lo largo de los 6 días de almacenamiento y fue asociada con una reducción de 10³ en el número de listerias en queso almacenado a 4°C y la velocidad de muerte fue mayor en quesos almacenados a temperaturas mayores. Esos resultados demostraron la efectividad de la lacticina 3147 como un inhibidor de *L. monocytogenes* en un sistema alimenticio donde la contaminación postmanufactura por este microorganismo puede ocurrir. También comprobaron la efectividad de una cepa productora de lacticina 3147 en inhibir *L. monocytogenes* en quesos madurados por mohos. Esta cepa se inoculó sobre la superficie de los quesos, los cuales pueden constituir un riesgo de contaminación con listeria y permitir el crecimiento, ya que el pH de la superficie de los quesos madurados puede exceder a 7 (Fenelon, Ryan, Ross, Guinee, & Hill, 1999)

El queso Cheddar reducido en grasa manufacturado con un productor de lacticina 3147 puede ser madurado a temperaturas elevadas debido a que la vasta mayoría de bacterias ácido lácticas no iniciadoras causantes de deterioro son inhibidas por

lacticina 3147, lo cual puede ser difícil de alcanzar con cultivos iniciadores tradicionales debido al deterioro por poblaciones microbianas no-iniciadoras (Fenelon, Ryan, Ross, Guinee, & Hill, 1999).

En quesos fermentados puede ser preferible usar bacteriocinas con un rango de actividad altamente específico que no afecte la flora natural del queso, por ejemplo, enterocina 1146, sakacinas A y P, leucocina A y pediocina son extremadamente activas contra la *L. monocytogenes* en niveles que no afectan los cultivos iniciadores. En productos lácteos los cuales no requieren bacterias iniciadoras, se usan preferiblemente bacteriocinas de amplio espectro (Hill, 1999).

En leche fresca y derivados, la aplicación de bacteriocinas permite mantener la vida útil de los productos, reduciendo la temperatura de procesado, al igual que en la leche en polvo que además es especialmente susceptible al desarrollo de *Listeria monocytogenes*. En postres lácteos permiten aumentar considerablemente su vida útil y en yogurt, previenen la formación excesiva de suero (Vázquez, 2002).

5.4.2 Productos cárnicos

La carne tiene un número de propiedades intrínsecas las cuales hacen que el uso de bacteriocinas sea más problemático que en alimentos líquidos. En particular es difícil alcanzar una distribución homogénea, puede haber problemas de solubilidad, las bacteriocinas pueden separar la fase grasa, o simplemente ligarse a las proteínas cárnicas (Hill, 1999).

Para alimentos cárnicos, las bacteriocinas pueden llegar a sustituir el uso de nitritos, sin embargo es necesario determinar la bacteriocina adecuada que no requiera de una elevada concentración de aplicación (Rojas & Vargas, 2008). Se han realizado estudios con nisina con el objetivo de reducir el nivel de nitritos en carnes, los resultados muestran que se requieren altos niveles de nisina para alcanzar un buen control de *Clostridium botulinum* debido a la unión de la nisina con partículas cárnicas, distribución no homogénea, pobre solubilidad en sistemas cárnicos o a la posible interferencia en la actividad de fosfolípidos cárnicos (Abee, 2005).

La producción de bacteriocinas de amplio espectro de inhibición es una herramienta importante para el control de la fermentación láctica en productos cárnicos. La utilización de bacteriocinas presenta muchas ventajas comparado a la utilización de cultivos íntegros ya que se minimizan cambios de textura y sabor, especialmente en productos no fermentados. Sin embargo, la utilización de cultivos iniciadores con cepas productoras de bacteriocinas durante el proceso de fermentación de embutidos fermentados resulta en productos de alta calidad y homogeneidad, además de controlar efectivamente a microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus* (Rojas & Vargas, 2008). El uso de bacteriocinas en el control de patógenos es de especial interés en productos frescos o mínimamente procesados, en donde la

elevada acidificación resulta indeseable. *Listeria monocytogenes* y *Clostridium botulinum* representan el principal peligro en este tipo de productos ya que la primera crece a temperaturas de refrigeración y la segunda forma esporas resistentes a procesos térmicos moderados, pudiendo luego germinar y desarrollarse con la consiguiente producción de toxina en condiciones de abuso de temperatura (Schneider, 2007).

La nisina no es la bacteriocina más adecuada para aplicar en productos cárnicos no fermentados por su baja solubilidad al pH de la carne, lo que implica una difícil distribución uniforme en el alimento ya que las moléculas de la nisina son hidrofóbicas por lo que pueden adherirse a la fase lipídica orgánica de una matriz alimentaria (Martin Katusic, 2002). Aunque se puede realizar la adición de cultivos de bacterias productoras de nisina pertenecientes a los géneros, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacteriu* y *Lactobacillus* por ejemplo aplicación de *P. acidilactici* en salchichas de carne y pavo, salchichas fermentadas con *Lb. Sake* y salami con *Lb. Plantarum* (Vázquez, 2002).

Luckansky et al. (1992) inocularon una cepa productora de pediocina y otra no productora de pediocina en pasta de salchicha tipo vienesa la cual fue subsecuentemente inoculada con 4 cepas de *Listeria monocytogenes*. El número de listerias permanecieron altos ($10^5/g$) en las vienesas que contenían la cepa no productora de pediocina, mientras que en la que contenía la cepa productora de pediocina el número de listerias descendió a menos de $10^2/g$. Además, la pediocina producida sobrevivió al proceso de cocción al final de la fermentación y fue detectable a lo largo de los 60 días de almacenamiento a 4°C. Estos mismos investigadores desarrollaron una forma de gelatina de pediocina, producida por una bacteria ácido láctica, que protege a los embutidos de la contaminación con *Listeria* (Hill, 1999).

5.4.3 Productos de la pesca

Los productos marítimos, tanto en empaque al vacío como en atmósfera modificada tienen un alto riesgo de infestación o contaminación por *c. botulinum*, el uso de bacteriocinas ha demostrado ser efectivo en productos como langosta y el salmón ahumado en el control de *Listeria monocytogenes* (Rojas & Vargas, 2008). En el caso del pescado fresco se debe su utilización a que son las bacterias las principales responsables de su deterioro. Se han descrito aplicaciones en algunos productos derivados de la pesca, como la utilización de carnocina UI49, nisina Z y bavaricina A como alternativa a los ácidos benzoico y ascórbico en la conservación de langostino en la salmuera del refrigerado para disminuir el crecimiento bacteriano y aumentar su vida útil (Einarsson, 1995). También se ha estudiado la utilización de cepas de *Carnobacterium* aisladas de pescado y *L. lactis* para fermentar salmón ahumado y aumentar su vida útil (Vázquez, 2002).

5.4.4 Productos enlatados y conservas

En alimentos enlatados como hongos, maíz, zanahoria, las bacteriocinas se utilizan para el control de termófilos esporulados, por ser productos de baja acidez que reciben un tratamiento térmico mínimo (Rojas & Vargas, 2008). La nisina se utiliza para disminuir la intensidad del tratamiento térmico de los alimentos enlatados mejorando la apariencia y sabor del producto final sin comprometer la seguridad del alimento (Díez Aldama, 2011).

La nisina ha sido usada con éxito en conservas de baja acidez ($\text{pH} > 4.6$) y alta acidez ($\text{pH} < 4.6$), para controlar termófilos formadores de esporas tales como *Bacillus stearothermophilus* y *Clostridium thermosaccharolyticum* (Hill, 1999), los cuales pueden sobrevivir y crecer en conservas almacenadas en altas temperaturas. Se utiliza en conservas de papas, hongos, guisantes, sopas y pudines de cereales. Debido a la actividad incrementada de la nisina a bajos niveles de pH, es idealmente apropiada para conservas de bajo pH tales como las conservas de tomates, para inhibir la flora de deterioro ácido-tolerante tales como *Bacillus macerans* y *Clostridium pasteurianum* (Nuñez et al., 2001).

5.4.5 Cerveza y vino

La resistencia de las levaduras a la nisina permite que ésta pueda ser usada para controlar el deterioro por bacterias ácido lácticas en cervezas y vinos (O'keeffe & Hill, 1999).

La nisina y la pediocina PA-1 por su resistencia a las levaduras se comportan como un eficaz agente antimicrobiano frente a las bacterias lácticas en cervezas y vinos, se utilizan para reducir la cantidad de dióxido de azufre usado en la elaboración del vino y para controlar las bacterias causantes de deterioro (Díez Aldama, 2011).

La nisina en un tratamiento combinado con un polímero derivado de la quitina, el quitosano y lúpulo aumentan la estabilidad microbiológica durante la fabricación y el almacenamiento de la cerveza (Galvagno, Gil, Iannone, & Cerrutti, 2007).

El crecimiento de *Lactobacilos* y *Pediococos* en cerveza es una de las principales causas de deterioro, que conducen a una cerveza con demasiado desarrollo de acidez y con sabores extraños debido a la producción de diacetilo. Se ha demostrado que la nisina puede ser usada para controlar este problema sin tener un efecto adverso sobre la calidad de la cerveza. La nisina además puede reducir los tiempos de pasteurización e incrementar la vida útil de las cervezas (O'keeffe & Hill, 1999).

5.4.6 Otras aplicaciones de las bacteriocinas en alimentos

En alimentos producidos a base de arroz es importante controlar la presencia de *Bacillus cereus*, bacteria capaz de producir dos tipos de desórdenes gastrointestinales: uno de vómito causado por la ingestión de una toxina preformada en el alimento, y el síndrome diarreico causado por una toxina diferente que puede ser producida en el alimento o en el intestino delgado. También pueden verse implicados con esta bacteria productos de carne, leche, salsas y postres. En este tipo de productos, la enterocina resulta ser una bacteriocina apropiada para el control de *B. cereus*, ya que en estudios realizados se demuestra su estabilidad y efectividad a distintas temperaturas de almacenamiento, iniciando con un 90% de actividad y luego de 14 días presenta una actividad de 71% en muestras almacenadas a 6 °C. Al inocular estas muestras con *B. cereus*, se refleja una rápida reducción del recuento de bacterias en tan solo 8 horas (Rojas & Vargas, 2008).

Cepas bacteriocigénicas como *Lactococcus lactis* ESCC 146 y *P. pentosaceus* ATCC 43200 pueden ser utilizadas para mejorar la seguridad y extender la vida útil de alimentos cocinados refrigerados. El color, palatabilidad, textura y sabor no se ven afectados por la presencia de los cultivos (Rodgers, 1997)

En la tabla 5 se muestra un resumen de algunas sugerencias de aplicaciones de bacteriocinas en alimentos.

Tabla 5. Ejemplos de bacteriocinas como conservantes en alimentos.

Bacteriocina	Microorganismo objeto	Aplicaciones
Nisina	Listeria monocytogenes	Embutidos cárnicos
Nisina	Listeria monocytogenes Staphylococcus aureus	Queso Ricotta, queso Camberment, quesos frescos, leche fresca, leche fermentada y leche en polvo
Nisina	Brochothrix thermosphacta	Productos cárnicos que contengan cerdo
Nisina	Clostridium tyrobutyricom	Queso Gruyere
Nisina	Listeria monocytogenes	Pescado fresco, salmón ahumado y langosta
Pediocina	Bacterias ácido lácticas	Vinos y cervezas
Pediocina AcH	Listeria monocytogenes	Queso Munster
Pediocina AcH	Listeria monocytogenes	Embutidos de pollo y pollo crudo
Enterocina	Listeria monocytogenes	Leche fresca
Enterocina	Staphylococcus aureus	Embutidos cárnicos
Enterocina	Listeria monocytogenes	Queso Manchengo
Piscicolina 126	Listeria monocytogenes	Pasta de Jamón
Leucocina A	Lactobacillus sake	Carne
Lactocina 705	Listeria monocytogenes	Carne molida
Lacticina 3147	Listeria monocytogenes	Queso Cottage, queso cheddar

Fuentes: (Marcos et al., 2013; Hill, 1999; O'Keeffe & Hill, 1999)

5.5 MÉTODOS DE BIOPRESERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Los métodos para la aplicación de bacteriocinas en la preservación de alimentos que se han considerado son tres: a) la inoculación de alimentos con cultivos iniciadores o protectores que producen bacteriocinas en el producto, b) la adición de bacteriocinas purificadas o semipurificadas como preservativo alimenticio y c) el uso de un producto previamente fermentado con un cultivo productor de bacteriocina, como ingrediente dentro del procesamiento de un alimento (Castro Albornoz & Valbuena Colmenares, 2009) (Alquicira Paez, 2006).

El primer método puede denominarse método *in situ* de biopreservación por inoculación del sistema alimenticio con la cepa productora de bacteriocina en condiciones que favorezcan su producción; mientras las dos últimas serían metodologías *ex situ* donde la bacteriocina es producida por fuera del alimento en condiciones controladas y luego aplicada al alimento. En el caso de usar sustancias antagonicas puras o semipuras, es necesario utilizar técnicas de precipitación de la proteína adaptadas a las condiciones de cada laboratorio, debe inicialmente estandarizarse la producción y precipitación de la bacteriocina, hasta garantizar su reproducibilidad antes de la aplicación en alimentos para asegurar una cantidad adecuada con suficiente poder inhibitorio (Vázquez et al., 2009).

- **Inoculación de alimentos con cultivos iniciadores o protectores (producción *in situ*):** Las bacterias ácido lácticas ofrecen la posibilidad de producir las bacteriocinas *in situ* durante el proceso de fabricación. De hecho, se ha demostrado que muchos de los cultivos iniciadores utilizados en sistemas alimentarios producen bacteriocinas. Por lo tanto, se podría evitar la adición directa de una preparación pura de la bacteriocina (Díez Aldama, 2011), su éxito depende de la habilidad del cultivo para crecer y producir la bacteriocina en el alimento bajo condiciones ambientales y tecnológicas (temperatura, pH, aditivos, entre otros). Los cultivos iniciadores deben ser capaces de competir con la microflora natural, no debe tener impacto en las propiedades fisicoquímicas y organolépticas del alimento, no debe producir gas ni exopolisacáridos para evitar el inflamamiento en el empaque debido a la acumulación de gases y la formación de viscosidades en las superficies de los productos (Vázquez et al., 2009).

In situ, la producción de bacteriocinas ofrece varias ventajas en comparación con los métodos *ex situ* de producción, en relación con los aspectos legales y económicos. La reducción de los costos de los procesos biopreservación puede ser muy atractivo y la legislación para el uso de bacterias ácido lácticas es más amplia (Marcos et al., 2013).

- **La adición de bacteriocinas purificadas o semipurificadas como preservativo alimenticio (producción *ex situ*):** Al usar este método la dosis de bacteriocina es más precisa y por ende más predecible. Sin embargo la aplicación se limita de acuerdo a la legislación de cada país concerniente a aditivos en los alimentos (Vázquez et al., 2009).
- **La adición de un cultivo productor de bacteriocina como ingrediente (producción *ex situ*):** Éste método consiste en añadir preparaciones de bacteriocina cruda (extracto crudo), licor fermentado o concentrados obtenidos por el crecimiento de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocina en sustrato complejo de calidad alimentaria (leche o suero de leche). (Vázquez et al., 2009). Las preparaciones resultantes pueden ser consideradas como aditivos alimentarios o ingredientes dependiendo de la legislación de cada país. Este método evita el uso de compuestos purificados que pueden tener regulación legal más estricta y ahorra costos en la purificación de cada compuesto (Marcos et al., 2013).

De todas las opciones, la adición directa de bacteriocinas purificadas o semipurificadas ofrece una mejor herramienta de control para los productos, con este método se puede alcanzar una mejor distribución y se evitan los cambios físicos, químicos y organolépticos que conllevan los procesos fermentativos. Sin embargo, el costo hace que esta técnica sea poco atractiva (Castro Albornoz & Valbuena Colmenares, 2009) ya que los casos de producción *ex situ*, pueden llegar a ser metodologías más costosas porque no solo requieren de las cepas iniciadoras (microorganismos completamente aislados), sino de medios de cultivo y equipos para el desarrollo de las cepas y para la producción de la bacteriocina. Adicionalmente se debe garantizar la actividad de cada extracto o de la bacteriocina e incluso puede llegar a ser necesario determinar la concentración mínima inhibitoria contra patógenos. La utilización de estos sistemas de biopreservación requiere en cualquier caso estudios preliminares para determinar el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo en que se desarrolla (curvas de crecimiento), y la estandarización de las técnicas para lograr producirlas en cantidades suficientes (Vázquez et al., 2009).

6. CAPITULO 5 AVANCES CIENTIFICOS Y APLICACIONES COMERCIALES DE BACTERIOCINAS EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

6.1. AVANCES CIENTÍFICOS

Una de las maneras de conocer los avances realizados a nivel investigativo en un tema es mediante la consulta a las patentes relacionadas.

En la tabla 6 se encuentran algunas patentes de Estados Unidos, Japón y la Unión Europea relacionadas con la obtención, producción y aplicaciones de bacteriocinas.

Tabla 6. Algunas patentes relacionadas con la obtención, producción y aplicación de bacteriocinas.

Inventores/Poseedor	Fecha de publicación	Código	Descripción
Ross, Paul Reynolds Rea, Mary Clare Ryan, Marie Philippa Asignada a: Teagasc (Dublín, IE)	27/03/2001	Patente de Estados Unidos 6207411	Esta invención se refiere a un nuevo agente antimicrobiano, una bacteriocina, con características similares a las de la nisina. La bacteriocina está designado lacticina 3147 y tiene las siguientes propiedades: un peso molecular de aproximadamente 2,8 kDa; actividad inhibidora contra lactococos, lactobacilos, enterococos, bacilos, leuconostocs, pediococos, clostridios, estafilococos y estreptococos; sensibilidad a las proteasas de tipo tripsina, alfa-quimotripsina, proteinasa K y pronasa E, pero no pepsina; estabilidad al calor, la actividad a pH ácido, y la capacidad de inhibir las cepas bacterianas productoras de nisina
Henderson, James T. Van, assennar Pieter Asignada a: Microlife, Technics (EE.UU.)	30/10/1991	Patente Europea EPO453719	Péptido que se deriva de una bacteriocina aislada a partir de <i>Pediococcus acidilactici</i> NRRL-B-18050. El péptido tiene un peso molecular de 4.629, que es alrededor de un tercio del peso molecular aparente de la bacteriocina de origen natural de 16500. El péptido se puede derivar de la purificación de la bacteriocina natural o se puede derivar químicamente. La bacteriocina tiene una alta actividad frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y otras bacterias.
Wettenhall, Richard Edward Davidson, Barrie Ernest Hillier, Alan James Asignada a: Universidad de Melbourne (Victoria, AU)	25/04/1997	Patente de Estados Unidos 6054163	Esta invención proporciona una bacteriocina, la piscicolina 126 que tiene un peso molecular de aproximadamente 4,4 Kda. Esta novedosa bacteriocina tiene un espectro de inhibición diferente y más estrecho que el de la nisina y la pediocina PA-1. Según la invención se utiliza como conservante de alimentos.
Germond, Jacques Edouard Marciset, Oliver Mollet, Beat Asignada a: Nestec S.A (Vevey, Suiza)	04/11/1997	Patente de Estados Unidos 5383890	Esta invención se refiere a dos nuevas bacteriocinas obtenidas a partir de <i>Streptococcus thermophilus</i> , un método para producir un extracto sobrenadante que contiene al menos una de estas dos bacteriocinas y el uso de estas bacteriocinas en la preparación de productos alimenticios, especialmente quesos, leches acidificadas y productos cosméticos como agente activo contra los microorganismos patógenos.
Stern, Norman J. Svetoch, Edwar A. Eruslanov, Boris V. Asignada a: EUA, representado por el Secretario de Agricultura (Washington, DC, EE.UU)	03/01/2008	Patente de Estados Unidos 7662592	Esta invención se trata de unos péptidos inductores producidos por la bacteria productora de la bacteriocina que estimulan la producción de bacteriocinas in vitro. Proporciona un método para aumentar la producción de bacteriocina O-7 in vitro en la que un péptido se le adiciona a un cultivo de <i>Lactobacillus salivarius</i> PVD-32

Inventores/Poseedor	Fecha de publicación	Código	Descripción
Kawamoto, Shinichi Shima, Jun Suzuki, Chise Omomo, adahiro	02/12/2003	Patente de Japón JP2003339377	Consiste en la creación de un nueva Lactobacillus, la cepa Enterococcus mundtii 7393. Lo obtuvieron a partir del Enterococcus faecium. La bacteriocina mundticin KS se obtiene a partir de la nueva cepa bacteriana, los genes resistentes fueron clonados a partir del genoma de la cepa bacteriana. La nueva bacteriocina mundticin KS y la cepa Enterococcus mundtii 7393 se utilizan para la conservación de alimentos
Vandenbergh, Peter A. Walker, Shirley A. Kunka, Blair S. Asignada a: Microlife Technics, Inc. (Sarasota, FL)	02/03/1999	Patente de Estados Unidos 5877272	Esta invención se refiere a una nueva bacteriocina derivada de un Lactococcus lactis LL-1 y un método de uso para inhibir bacterias, particularmente en los alimentos y otros materiales que necesitan protección frente a las bacterias. Tiene un amplio espectro de actividad frente a bacterias Gram positivas en un intervalo de pH entre 2 y 8.
Berjeaud, Jean Marie Fremaux, Christophe Cenatiempo, Yves Simon, Laurence Asignada a: Rhodia Chimie (Boulogne Billancourt, Francia)	15/02/2005	Patente de Estados Unidos 6855518	Esta patente se trata de un polipéptido aislado, una bacteriocina llamada sakacina T derivada de Lactobacillus sakei 2512. La invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico codificada para dicha bacteriocina y el uso de ella como agente activo contra patógenos y flora indeseable en la preparación de productos alimenticios.
Blackburn, Peter De La, Harpe Jon Asignada a: Ambi Inc. (tarrytown, NY)	09/06/1998	Patente de Estados Unidos 5763395	Esta innovación proporciona composiciones y métodos para la producción de bacteriocinas que contienen lantionina como la nisina, la subtilina, la duramicina, la cinamicina, la epidermina y la galidermina. Se pueden formular en una variedad de composiciones que presentan actividad bactericida contra organismos Gram negativos y Gram positivos. Estas composiciones actúan como bactericidas amplia gama mejorados además tienen una vida de almacenamiento mejorada.
De Vuyst, Luc Avonts, Lazlo Asignada a: Vrije, Universiteit Brussel (Pleinlaan, Bruselas)	25/10/2001	Patente de Estados Unidos 079278	Esta invención se refiere a una nueva bacteriocina obtenida a partir de Lactobacillus johnsonii LMG-P19261, que muestra actividad inhibitoria frente a Helicobacter pylori. La invención trata la producción, aislamiento y purificación de la bacteriocina, el uso para la prevención y/o el tratamiento de infecciones bacterianas, en particular de las infecciones con Helicobacter pylori.
Vandenbergh, Peter A. Kunka, Blair S. Henderson, James T. Asignada a: INDOPCO INC	06/04/1993	Patente de Japón JP05084092	Esta patente consiste en un sobrenadante del material producido por una cepa que pertenece al género Pediococcus, se somete a una purificación por ultrafiltración para proporcionar un filtro que contiene una bacteriocina con un peso molecular entre 4 y 5 KDa, estable en agua hirviendo, inhibe el crecimiento de bacterias alimentos y no cambia su sabor.

Inventores/Poseedor	Fecha de publicación	Código	Descripción
Fliss, Ismail Desbiens, Michel Thairi, Imane Asignada a: Université Laval (Québec, CA)	24/07/2007	Patente de Estados Unidos 7247306	Esta invención se refiere a una nueva bacteriocina, divergicina M35, producida por <i>Carnobacterium divergens</i> M35 y una composición que comprende una cantidad eficaz de divergicina M35 y su uso para matar o limitar la proliferación de la <i>Listeria monocytogenes</i> .
Ono, Hiroshi. Sonomoto, Kenji Asignada a: TOKAI Tsukemono KK, SHU UNIV	05/04/2012	Patente de Japón JP2012067034	Esta patente proporciona una bacteriocina obtenida a partir de una bacteria láctica capaz de extender la caducidad de un alimento, especialmente encurtidos adicionando la bacteria láctica en la preparación del alimento.
Kageyama, Makoto Kuroda, Kazufumi Asignada a: MITSUBISHI CHEM IND LTD	23/08/1979	Patente de Japón JP54107596	Esta innovación se refiere a una nueva bacteriocina obtenida mediante un cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , en un medio que contiene la mitomicina C y purificada mediante cromatografía. Esta bacteriocina tiene actividad bactericida contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Daeschel, Mark A. Mcguire, Joseph Asignada a: El Estado de Oregon representado por la Junta Estatal de Educación Superior (Eugene, OR)	19/09/1995	Patente de Estados Unidos 5451369	Esta patente proporciona métodos para disminuir la actividad microbiana en artículos y superficies adaptados para su uso en la preparación y envasado de alimentos. La actividad antimicrobiana se da mediante la aplicación de recubrimientos de moléculas de bacteriocina. Por ejemplo, poner en contacto el artículo o la superficie con una solución de nisina o una mezcla de varias bacteriocinas.

Fuente: (Free Patents Onlines FPO, 2013)

6.2. EMPRESAS PRODUCTORAS Y COMERCIALIZADORAS DE BACTERIOCINAS

La nisina es producida industrialmente y se comercializa como NISAPLIN® y como CHRISIN® (Montalban et al., 2007; Bello, 2012).

Nisaplin® es producida por Danisco, líder mundial en la producción de ingredientes para alimentos y otros productos. Es el fabricante de preparación de nisina. Fabricado en el Reino Unido. Nisaplin, nisina en polvo, es un producto antimicrobiano no basado en productos lácteos, estable al calor y brinda beneficio de control contra bacterias Gram positivas y microorganismos patógenos.

Beneficios:

- Ayuda a reducir los riesgos de seguridad alimentaria
- Protege la vida útil de los alimentos
- Habilita la reducción de los tiempos de procesamiento y las temperaturas
- Se acomoda a la demanda de los consumidores por los productos naturales.

Áreas de aplicación: panadería, bebidas, lácteos, aplicaciones de frutas, carnes, aves y mariscos, grasas y aceites (DANISCO, 2013).

CHRISIN ® y CHRISIN ® C son preparados en polvo estandarizados de nisina que impide el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos Gram positivos en los productos alimenticios. Se puede utilizar en una variedad de queso y productos cárnicos en función de la legislación local. Estos preparados son producidos por CHR HANSEN proveedor global de ingredientes a de biociencia en la industria de alimentos (CHR HANSEN, 2013).

Aplicaciones:

- Productos lácteos: queso procesado y queso para untar; quesos acidificados directos; postres lácteos pasteurizados, leche fresca y recombinaada.
- El huevo líquido
- Aderezos y salsas
- Alimentos con alta humedad
- Alimentos reducidos en grasas
- Alimentos enlatados
- Procesamiento de productos fermentados

Beneficios:

- Extender la vida útil, evitar su deterioro y proteger contra el abuso de temperatura.
- Mejorar la calidad del producto

- Reducir costos de fabricación y distribución
- Satisfacer la demanda de alimentos en conserva con ingredientes naturales
- Garantizar la seguridad alimentaria

En Colombia se comercializa el Nisaplin® en empresas como Cimpa S.A.S, Tecnas S.A, Interenzimas S.A, inveslam LTDA y Betalactámicos S.A en presentaciones de 100 y 500 gr con precios aproximados de \$35.000 pesos y \$118.000 pesos respectivamente.

La pediocina PA-1 aunque aún no está oficialmente aprobada como conservante alimentario hace parte de un ingrediente multifuncional llamado ALTA 2341.

ALTA 2341, comercializado por la empresa canadiense QUEST INTERNATIONAL INC. Alta 2341 es un, ingrediente alimentario multifuncional totalmente natural a base de bacterias lácticas tradicionales. El producto contiene metabolitos naturales, que incluyen ácidos orgánicos y pediocina, una bacteriocina, que se encuentra en los productos cárnicos fermentados típicos. Esto ayuda a prevenir la contaminación bacteriana en los alimentos listos para el consumo de carne por inhibir el crecimiento de una amplia gama de bacterias Gram-positivas. (ICIS Trusted market intelligence for the global chemical and energy industries, 1999)

7. CONCLUSIONES

Las bacterias ácido lácticas por su larga historia de consumo, prueban su seguridad y su gran potencial de bioconservación, ya que naturalmente dominan la microflora de muchos alimentos gracias a su capacidad de competir por los nutrientes y/o inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes que deterioran el producto, debido a la producción de metabolitos antimicrobianos. Son importantes en la industria de los alimentos porque producen sustancias metabólicas, tales como peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, ácido láctico y bacteriocinas durante las fermentaciones lácticas. Estos compuestos son deseables no solo por sus efectos sobre los alimentos como sabor, olor, color, y textura, sino también por inhibir la microflora indeseable, extendiendo la vida útil e inhibiendo microorganismos patógenos, permitiendo preservar el valor nutritivo y la salubridad de los alimentos, proporcionando un producto agradable y seguro al consumidor.

El empleo de las bacteriocinas en la industria alimentaria es ideal debido a sus características bioquímicas, ya que pueden resistir los tratamientos térmicos y los cambios de pH que sufren muchos alimentos durante su fabricación y almacenamiento, además, su pequeño tamaño podría favorecer su difusión homogénea dentro de ellos.

Entre las principales limitaciones en el uso de las bacteriocinas en los alimentos están, su estrecho espectro de actividad antimicrobiana, su bajo poder de acción frente a bacterias Gram negativas y levaduras y la existencia de cepas resistentes, por lo tanto lo ideal es usar las bacteriocinas en métodos de preservación combinados. Las bacteriocinas sirven como una barrera bactericida ayudando a reducir los niveles de contaminación bacteriana, mientras que la aplicación de otros métodos de preservación bacteriostáticos como el uso de envasado en atmósfera modificadas o la reducción de la actividad de agua ayudan a inhibir la flora resistente a la bacteriocina, incrementando la efectividad del método de preservación.

La bioconservación representa una alternativa para la industria de alimentos, permitiendo la obtención de productos libres de aditivos artificiales, pero que a la vez sean inocuos y con prolongada vida comercial. Todo ello genera beneficios tanto para la industria como para los consumidores.

La nisina es la bacteriocina mas estudiada debido a que es la única bacteriocina incluida en la lista positiva de aditivos alimentarios, Codex Alimentarius, por lo tanto se encuentra mucha información y hay muchas investigaciones sobre su producción, espectro de inhibición, modo de acción y aplicaciones biomédicas y en alimentos.

La información sobre las bacteriocinas se encuentra muy fragmentada, hay muy pocos libros disponibles, pero se encuentran investigaciones realizadas en universidades, corporaciones, organizaciones y empresas alrededor del mundo muy enfocadas a la producción y a las aplicaciones de las bacteriocinas principalmente en alimentos.

La mayor aplicación de las bacteriocinas se da en los sectores de los productos lácteos y cárnicos, sectores hacia los cuales se han orientado más las investigaciones. La nisina por ser la única bacteriocina que pertenece a la lista positiva de aditivos de la Unión Europea CCE y reconocida como sustancia GRAS (*Generally Regarded As Safe*), para su empleo en la elaboración de quesos fundidos pasteurizados es la bacteriocina más utilizada principalmente en productos lácteos.

Las patentes se orientan más hacia la obtención, métodos de producción y la caracterización de las bacteriocinas. Ya que hasta ahora se sabe que cada bacteria ácido láctica produce mínimo un bacteriocina pero hay muy pocas caracterizadas y se tiene poco conocimiento sobre sus propiedades bioquímicas.

8. DISCUSIÓN

El tema de las bacteriocinas es importante ya que además de inhibir microorganismos patógenos responsables del deterioro de los alimentos sin cambiar las características organolépticas del producto, posee características físicas y biológicas como la estabilidad a pH neutro ácido y su termo resistencia, que las hace muy atractivas para reemplazar conservantes químicos o combinarlas con métodos físicos de conservación en la industria de alimentos, y así suplir la demanda actual por los alimentos naturales de los consumidores

En la realización de la presente monografía se utilizaron diferentes fuentes secundarias, principalmente artículos científicos publicados en bases de datos como Science Direct, Scielo y Scopus, los cuales al igual que las patentes están enfocados principalmente al desarrollo de nuevos protocolos y metodologías para la obtención de bacteriocinas, su producción y purificación. En menor proporción también se encuentran artículos enfocados en ensayos de la utilización de las bacteriocinas en alimentos, concentrados para animales y aplicaciones biomédicas. Así mismo se consultaron tesis doctorales y de maestría, éstas más enfocadas a las características físicas, químicas y biológicas, al espectro de inhibición y a las aplicaciones de las bacterias ácido lácticas y de las bacteriocinas de una manera muy general. Los libros fueron principalmente utilizados para la construcción de antecedentes del uso de los conservantes y de las bacterias ácido lácticas; sobre las bacteriocinas, ya que los textos encontrados para consulta tenían fechas de publicación antiguas, y por lo tanto no contienen, los avances en el tema.

Por lo tanto se recomienda hacer una indagación más amplia en el tema de las bacteriocinas, seguir compilando investigando sobre las bacteriocinas de una forma más específicas debido a que cada bacteriocina tiene un protocolo diferente de obtención y purificación, unas características bioquímicas muy específicas de acuerdo a su especie y de esto depende el posible uso o aplicación a la cual se puede destinar.

Durante la búsqueda bibliográfica se constató que es importante realizar investigaciones y pruebas de la utilización de las bacteriocinas como conservantes en diferentes tipos de alimentos ya que son degradadas por enzimas lo que quiere decir que no generan resistencia como los antibióticos, por lo tanto son inocuas para el consumidor; aspecto fundamental en la industria de alimentos hoy cuando se están aplicando nuevos ingredientes que posean condiciones más naturales. Además, por sus características bioquímicas son resistentes a los tratamientos térmicos y gracias a su pequeño tamaño se distribuyen fácilmente en los alimentos. Estas características

hacen que las bacteriocinas sean muy atractivas y tengan mucho potencial en la industria de alimentos.

Se recomienda también realizar una investigación sobre el uso de bacteriocinas por métodos combinados ya que las bacteriocinas tienen un espectro de inhibición muy específico por lo tanto debe combinar su uso con un método físico de conservación para asegurar la calidad del producto.

9. BIBLIOGRAFÍA

- ICIS Trusted market intelligence for the global chemical and energy industries.* (13 de 09 de 1999). Recuperado el 10 de 2013, de <http://www.icis.com/Articles/1999/09/13/94688/quest-launches-new-products-for-the-food-ingredients.html>
- Tecnología y Alimentos.* (2008). Recuperado el 22 de Junio de 2013, de <http://tecnoyalimentos.wordpress.com/2008/06/05/bacteriocinas/>
- CHR HANSEN.* (2013). Recuperado el 15 de 10 de 2013, de <http://www.chr-hansen.com/products/product-areas/enzymes/our-products/bioprotective-enzymes/chrisinr.html>
- DANISCO.* (2013). Recuperado el 15 de 10 de 2013, de <http://www.danisco.com/product-range/antimicrobials/nisaplir/>
- Free Patents Onlines FPO.* (2013). Recuperado el 20 de 10 de 2013, de http://www.freepatentsonline.com/result.html?sort=relevance&srch=top&query_txt=bacteriocine&submit=&patents=on
- Abee, T. (2005). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 169 - 185.
- Alquicira Paez, L. (2006). Tesis de maestria. *Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por Pediococcus parvulus MXVK 133.* Iztapalapa, Mexico: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Andrés Bello, M. (2012). Tesis Doctoral. *Aplicación de nuevas tecnologías para el diseño y desarrollo de productos de dorada (Sparus aurata) procente de acuicultura.* Valencia, España: Universidad Pontificia de Valencia.
- Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A., Lebrihi, A., & Lefebvre, G. (Agosto de 2001). Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-Listeria bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum C19. *International Journal of Food Microbiology*, 68(1-2), 93 - 104.
- Casaus, M. D. (1998). Tesis Doctoral. *Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas.* Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.

- Castro Albornoz, G., & Valbuena Colmenares, E. (2009). Biopreservación: alternativa para mejorar la calidad de los quesos. Venezuela. Recuperado el 10 de 10 de 2013, de Venezuela Ganadera: <http://es.scribd.com/doc/121460574/Biopreservacion-alternativa-para-mejorar-la-calidad-de-los-quesos>
- Codex Alimentarius. (2013). *Codex Alimentarius*. Recuperado el 9 de 10 de 13, de <http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/details.html?id=1&lang=es>
- Concha, R., Farías, M., Kümmerlin, R., & Sesma, F. (1999). Enterocina - 35, una Bacteriocina con Actividad sobre *Listeria monocytogenes*. Posible uso en la industria de alimentos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 133- 138.
- Cristóbal Delgado, R. L. (2008). Tesis de maestría. *Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias*. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos .
- Dicks, L., & Todorov, S. (2005). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram - negative bacteria. *Enzyme and microbial technology*, 36(2 - 3), 318 - 326.
- Diep, D., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., & Nes, I. (Agosto de 2009). An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, 30(8), 1562 - 1574.
- Díez Aldama, L. (2011). Tesis doctoral. *Efectos de agentes enológicos y pediocina PA-1 sobre las bacterias lácticas del vino*. Logroño, España: Universidad de la Rioja.
- Einarsson, H. (1995). Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal Applied and Environmental Microbiology*, 61, 669 - 676.
- Fenelon, M., Ryan, M., Ross, R., Guinee, T., & Hill, C. (Enero de 1999). Elevated Temperature Ripening of Reduced Fat Cheddar Made with or Without Lacticin 3147. Producing Starter Culture. *Journal of Dairy Science*(1), 10 - 22.
- Galvagno, M., Gil, G., Iannone, L., & Cerrutti, P. (2007). Exploring the use of natural antimicrobial agents and pulsed electric fields to control spoilage bacteria during a beer production process. *Revista Argentina de Microbiología*, 39, 170 - 176.
- Gao, Y., Belkum, M., & Stiles, M. (1999). The outer membrane of gram negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochoicin -C. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4329 - 4333.
- González Martínez, B. E., Gómez Treviño, M., & Jiménez Salas, Z. (Abril - Junio de 2003). Bacteriocinas de probióticos. *RESPYN Revista de salud pública y nutrición*, 4(2).
- Herrera, V. (2009). Trabajo de grado. *Evaluación de la producción de nisina a partir de Lactococcus Lactis. Subs. Lactics*. Medellín, Colombia: Universidad Pontificia Bolivariana.

- Hill, C. (1999). Bacteriocins: natural antimicrobials from microorganisms. *New Methods of Food preservation*, 22 - 39.
- Jami, G. M., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2013, Agosto). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by *Lactobacilli* isolated from Sturgeon fish. *Food Control*, 32, 375 - 389.
- Joerger, R. (2003). Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *Poultry Science*, 640 - 647.
- López, J. E., Ochoa Z., A., Anaya L., J. L., Martínez T., M., & Medina M., E. (julio - septiembre de 2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas*, 39(3), 49 57.
- Madrid, A. (1992). *Los aditivos en los alimentos*. Madrid: Mundi-prensa libros. S.A.
- Marcos Balciunas, E., Castillo Martínez, F. A., Dimitrov, S. T., Gombossy de Melo Franco, B. D., & De Souza Oliveira, R. P. (Julio de 2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32, 134 - 142.
- Marcos, B. (2007). Tesis doctoral. *Mejora de la seguridad alimentaria en productos cárnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías de conservación emergentes*. España, Girona: Universidad de Girona.
- Martin Katusic, A. (2002). *Capacidad Antagonista frente a la *Listeria monocytogenes* de dos sustancias tipo Bacteriocina utilizadas en combinación con NaCl y CO₂*. Chile: Universidad Austral De Chile.
- Martínez Fernández, B. (1996). Tesis Doctoral. *Bacteriocinas de *Lactococcus Lactis* Aislados de quesos Asturianos: Nisina Zy Lactococina 972*. Oviedo, España: universidad de Oviedo.
- Martinez, J. (2000). Tesis Doctoral. *Producción y empleo de anticuerpos de especificidad predeterminada para la producción, cuantificación y purificación de las bacteriocinas pediocina PA-1 enterocina A y para el reconocimiento específico de su co- expresión heteróloga en *Lactococcus lactis**. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
- Ministerio de Salud. (11 de 10 de 2012). *Invima*. Recuperado el 13 de 10 de 9, de Resolución 4125 de 1991:
http://www.invima.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=504:resolucion-4125-abril-51991&catid=304:resolucion-1999&Itemid=2135
- Monroy Dosta, M. d., Castro Barrera, T., Fernández Perrino, F. J., & Mayorga Reyes, L. (2009). Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, 73, 63 - 72.

- Montalban Lopez, M., Sánchez Hidalgo, M., Muñoz, A., Platero, A. M., & Maquera, M. (2007). *Clásicas versus nuevas aplicaciones de las bacterias del ácido láctico*. Granada, España: Universidad de Granada.
- Nuñez, G., Cayré, M. E., Castro, M. P., Campos, C., & Garro, O. A. (2001). *Actividad de la Nisina sobre la microflora alterante de aderezos*. Corrientes, Chaco, Argentina: Universidad Nacional del Nordeste.
- O'keeffe, T., & Hill, C. (1999). *Cornell University*. Recuperado el 15 de 07 de 2013, de Potential in Food Preservation: <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/BACTERIOCINS.doc>
- Parra Huertas, R. A. (junio de 2010). Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Revista de biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 8, 93 - 105.
- Pulgar, A. J. (Marzo- Abril de 1986). Los aditivos alimentarios. *Alimentación, equipos y tecnología*, 2, 155 - 157.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research*, 218 - 228.
- Rodgers, S. (1997). Bacteriocin production by protective cultures. *Food Service Technology*, 2, 59 - 68.
- Rodriguez Peña, J., & Torres Lozano, L. M. (2006). Proyecto de grado. *Evaluación de sustancias antimicrobianas presentes en extractos obtenidos de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño*. Bogotá, Colombia: Universidad de la Sabana.
- Rojas Muñoz, J. (2010). *Scribd*. Recuperado el 3 de 08 de 2013, de <http://es.scribd.com/doc/36605372/Capitulo-03-Bacteriocinas>
- Rojas, C., & Vargas, P. (Abril - Junio de 2008). Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en marcha*, 21, 9 - 16.
- Schneider, R. (2007). Aplicación de bacteriocinas en el control de contaminación de la carne. (U. N. Litoral, Ed.) *NACAMEH*, 1(1), 41 - 52.
- Sierra Lopera, L. (2012). Tesis de Maestría. *Evaluación de la preservación de extractos líquidos de café mediante el uso de bacteriocina (nisina) y aplicación de microondas*. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Suarez Gea, A. M. (1997). Tesis Doctoral. *Producción de anticuerpos frente a la nisina a: estrategias de inmunización y desarrollo de inmunoensayos*. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
- Tahiri, I., Desbiens, M., Benech, R., Kheadr, E., & Lacroix, C. (2004). Purification, characterization and amino acid sequencing of divergicin M35: a novel class IIa

bacteriocin produced by *Carnobacterium divergens* M35. *International Journal of Food Microbiology*, 97(2), 123 - 136.

Tahiri, I., Desbiens, M., Kheadr, E., & Lacroix, C. (2009). Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. *Food Microbiology*, 26(8), 783- 793.

The EFSA Journal. (2006). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on the safety in use of nisin produced using a modified production process as a food additive. *The EFSA Journal*. (EFSA, European Food Safety Authority, 1 - 8.

Tiwari, S., & Srivastava, S. (Julio de 2008). Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 759 - 767.

Vásquez M., S. M., Suárez M., H., & Zapata B., S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), 64-71.

Vázquez, M. (2002). *Avances en seguridad alimentaria*. Madrid: Altaga.

Yin, L., Wu , C., & Jiang, S. (2004). Purification and characterization of bacteriocin from *pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1146 - 1151.

Zhang, T., Pan, Y., Zhang, J., Chen, Y., & Chen, L. (2013). Molecular cloning and antimicrobial activity of enterolysin A and helveticin J of bacteriolysins from metagenome of Chinese traditional fermented foods. *Food Control*, 31(2), 499 - 507.