



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN
EMPLEO DE BACTERIOCINAS Y PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS
COMO ALTERNATIVA A CONSERVADORES EN ALIMENTOS
FERMENTADOS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

JAVIER ZAMORA MECALCO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Gloria Díaz Ruiz**

VOCAL: **Profesor: Amelia María Guadalupe Farrés González-Sarabia**

SECRETARIO: **Profesor: Israel García Cano**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Norma Angélica Camacho de la Rosa**

2° SUPLENTE: **Profesor: Aleida Mina Cetina**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ASESOR DEL TEMA:

DR. ISRAEL GARCÍA CANO

SUSTENTANTE:

JAVIER ZAMORA MECALCO

Indice

1. Objetivos	3
1.1. Objetivos Generales.....	3
1.2. Objetivo Particulares	3
2. Resumen	4
3. Introduccion	6
3.1. Conservación de Alimentos.....	6
3.2. Alimentos fermentados.....	7
3.3. Bioconservación	9
4. Bacterias ácido lácticas	10
4.1. Clasificación de BAL	11
4.2. Metabolitos producidos por las BAL	17
4.2.1. Producción de ácido láctico	17
4.2.2. Producción de ácido propiónico	19
4.2.3. Fermentación de ácido cítrico	20
4.2.4. Producción de peróxido de hidrógeno.....	22
4.2.5. Producción de CO2 y diacetilo	23
4.2.6. Producción de exopolisacáridos	23
4.2.7. Producción de reuterina	24
5. Bacteriocinas	25
5.1. Clasificaciones	30
6. Pared celular	42
7. Peptidoglucano hidrolasas celular	45
7.1. Clasificaciones	46
8. Tecnologías para su producción	69
9. Adyuvantes	70
10. Normatividad	72
11. Conclusiones	75
12. Referencias	77

1. Objetivos

1.1. Objetivos Generales

El objetivo del presente trabajo es identificar una alternativa al empleo de conservadores químicos por medio del empleo de agentes antimicrobianos presentes naturalmente en alimentos fermentados.

1.2. Objetivos particulares

1.2.1. Describir la evolución de tecnologías y estandarización de los métodos de preparación de los alimentos fermentados incluyendo los microorganismos presentes.

1.2.2. Definir los metabolitos presentes en alimentos producidos por las bacterias ácido lácticas, específicamente los productos proteínicos de los microorganismos para evaluarlos como posibles sustitutos a los conservadores actualmente empleados. Por lo tanto, la revisión se centrará en la definición, clasificación de bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas.

1.2.3. Evaluar los métodos de obtención, empleo y regulación con la finalidad de construir un criterio direccionado a la aprobación por parte de las agencias regulatorias de las tecnologías necesarias para su producción y posible uso a nivel industrial.

2. Resumen

La actividad antimicrobiana reportada en los alimentos fermentados se debe a microorganismos presentes en el alimento, que pueden ser adicionados o no intencionalmente como cultivos iniciadores. Además, las propiedades sensoriales que desarrollan los alimentos fermentados son generadas por la acción de estos microorganismos, que en su mayoría son identificados como bacterias ácido lácticas (BAL). Entre los metabolitos responsables de estos efectos se pueden encontrar el ácido láctico, ácido propiónico, ácido cítrico, peróxido de hidrógeno, CO₂, diacetilo, exopolisacáridos, reuterina, bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas (PGH). Todos ellos contribuyen a lograr que las BAL sean la microbiota predominante en los alimentos madurados.

Entre las sustancias con actividad antibacteriana de mayor importancia sobre las que más se ha trabajado en los últimos años están las bacteriocinas, debido a su acción directa sobre la membrana celular de diferentes microorganismos patógenos. Las bacteriocinas son péptidos pequeños, estables al calor, presentan una gran diversidad por lo que hay múltiples clasificaciones propuestas. La más estudiada es la nisina, la cual se emplea como agente antimicrobiano en diversos alimentos frescos y madurados. Por otro lado, las peptidoglucano hidrolasas (PGH's), principalmente ligadas a la regulación fisiológica del microorganismo como el crecimiento, división celular, recambio de la pared, lisis y muerte celular. Son sensibles a temperaturas altas y, a diferencia de las bacteriocinas, su acción consiste en degradar la pared celular, a partir de cuyo mecanismo se genera una clasificación.

Tanto bacteriocinas como PGH's tienen condiciones especiales de síntesis. Para algunas se tiene que inducir su producción por medio de metabolitos especiales, algunas durante la fase exponencial de crecimiento y otras durante su fase estacionaria. Asimismo, sus condiciones de acción antimicrobiana son específicas: unas atacan a un grupo específico de patógenos, otras trabajan a una temperatura más elevada. De esta manera, es importante aprovechar las diferencias y buscar mecanismos de complementación que les permitan actuar sobre las dos

principales estructuras de protección con las que cuenta un microorganismo: la membrana y pared celular y así ampliar el espectro de acción antimicrobiana

Ambos grupos de péptidos tienen un uso potencial en diversos ámbitos, como en alimentos y farmacia. Sin embargo, deben tener protocolos y deben ser reguladas y aprobadas para su uso, en donde México, aún no cuenta con los recursos necesarios para iniciar el uso de estas proteínas.

3. Introducción

3.1. Conservación de Alimentos

Los alimentos constituyen un medio de cultivo ideal para la proliferación de microorganismos, debido a la presencia de agua y a disponibilidad de nutrientes. Por esa razón, es necesario emplear distintos métodos de conservación con la finalidad de alargar la vida de anaquel de los alimentos (Barbosa-Canovas *et al.* 1998). Originalmente la adición de adyuvantes químicos a los alimentos fue usada para enmascarar sabores desagradables, pero rápidamente se convirtió en una forma de preservarlos (Hui *et al.* 2006).

Con la revolución industrial y el posterior desarrollo de las distintas industrias de alimentos se incrementó de manera considerable el uso de aditivos alimentarios, especialmente los empleados para alargar la vida de anaquel. La industria alimentaria emplea además de la sal, el azúcar y el humo (proveniente de un tratamiento térmico), nitritos, sulfitos, parabenos, ácidos orgánicos (acético, láctico y propiónico), ácido benzoico y sórbico (Barbosa-Canovas *et al.* 1998; Ruiz-Larrea *et al.* 2007). Hasta ahora, los enfoques para reducir el riesgo de brotes de intoxicación alimentaria se han basado en la búsqueda de la adición de conservadores químicos más eficientes o en la aplicación de tratamientos físicos más drásticos, como la refrigeración, la congelación, el uso de HHP (altas presiones hidrostáticas, por sus siglas en inglés High Hydrostatic Pressures), la radiación ionizante, luz pulsada, el ozono, ultrasonido, etc. (Zhou *et al.* 2010). Sin embargo, en los últimos años la adición de estos conservadores químicos no ha sido muy favorecida por el consumidor debido a que presentan inconvenientes y limitaciones. Por ejemplo, la toxicidad probada de muchos de los conservadores químicos comúnmente usados como los nitritos, la alteración de las propiedades organolépticas y nutricionales, debido a su naturaleza (daños por congelación, decoloración en el caso de la alta presión hidrostática y radiaciones ionizantes). Asimismo, la reducción de la actividad de agua de los alimentos empleando sal y el azúcar se ha vuelto menos aceptable, debido al creciente número de enfermedades relacionadas como hipertensión y la diabetes pero, sobre todo, el

rechazo a los conservadores químicos se debe a las nuevas tendencias en la compra y el consumo de productos más saludables, que han sido sometidos a tratamientos menos extremos (menos calentamiento intensivo y mínimo daño por congelación), con menores niveles de sales, grasas, ácidos y azúcares y/o la completa o la eliminación parcial de los aditivos de síntesis química. Para armonizar las demandas del consumidor con las normas de seguridad necesarias, los medios tradicionales de control de los riesgos de deterioro y seguridad microbiana en productos alimenticios están siendo reemplazados por una solución alternativa que está ganando cada vez más atención: "La tecnología de preservación ambiental" o también llamada "bioconservación" (Devlieghere *et al.* 2004; Hui *et al.* 2006; Gálvez *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2010).

Dadas estas circunstancias, en los últimos veinte años el reto planteado es el desarrollo de tecnologías que sean más amigables con el ambiente, seguras para el consumo humano, que preserven sus atributos de calidad y que sean capaces de mejorar las propiedades organolépticas de los alimentos (Barbosa-Canovas *et al.* 1998).

3.2. Alimentos fermentados

La fermentación de alimentos es uno de los procesos de preservación más antiguo empleada por el hombre, principalmente para la carne, la leche y los cereales. La producción de estos alimentos fermentados se manejaba de manera empírica. No se tenían elementos para comprender los cambios que ocurrían en estos productos las técnicas de elaboración eran pasadas de generación en generación, dentro de las pequeñas comunidades productoras (Hui *et al.* 2006).

Los alimentos fermentados son definidos como todos aquellos alimentos que han sido modificados por la actividad de microorganismos o enzimas. Son productos que se preparan a partir de materia cruda que, mediante un proceso en el cual se incluyen microorganismos específicos, adquieren propiedades sensoriales características en cuanto a sabor, aroma, apariencia visual, textura y consistencia, además de una vida de anaquel y seguridad higiénica mayor. En ciertos casos las

enzimas endógenas de la materia prima desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de las características mencionadas. Existen diferentes tipos de fermentación que pueden presentarse en alimentos fermentado:

Fermentación Alcohólica: Es un proceso que se lleva a cabo frente a la falta de oxígeno. Es impulsado por la actividad de algunos microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* que procesan los carbohidratos, tales como la glucosa, la fructosa, la sacarosa y el almidón, entre otros. Con eso se busca llegar a tener como resultado Etanol, CO₂ y ATP (Páres *et al.* 2002)

Fermentación Butírica: Se basa en la conversión de los glúcidos en ácido butírico, a través de la acción de bacterias *Clostridium butyricum*, en ausencia de oxígeno. Este proceso se lleva a cabo a partir de la lactosa con formación de ácido butírico y gas. Una de las características más reconocidas de esta fermentación es la producción de olores desagradables y fétidos (Páres *et al.* 2002).

Fermentación Acética: Esta fermentación se da al transformar al alcohol en ácido acético, que se encuentra en el vinagre, en pequeñas proporciones. Se realiza por la acción de microorganismos pertenecientes a *Acetobacter*, un género de bacterias aeróbicas. A diferencia de la fermentación alcohólica, las bacterias protagonistas de la fermentación acética necesitan gran cantidad de oxígeno para su crecimiento y actividad (Páres *et al.* 2002).

Fermentación Ácido Láctica: Es llevada a cabo por las bacterias ácido lácticas (BAL). Este proceso se consigue ácido láctico con la unión de ácido pirúvico y 2NADH. En este proceso de unión, es el ácido pirúvico el que recibe los electrones, convirtiéndose así en ácido láctico esta fermentación será revisada a detalle en el punto 4.2.1. La fermentación ácido láctica, además de mejorar sus propiedades sensoriales y nutricionales, es un proceso microbiano muy complejo en el cual una población de bacterias lácticas llega a ser la microbiota predominante (Messens y DeVuyst, 2002).

A pesar de ser uno de los métodos más antiguos de conservación, no fue sino hasta mediados del siglo XIX que se consolidó, el nacimiento de la microbiología

como una ciencia y con ella se logró sentar las bases biológicas para entender la fermentación. El comprender el papel que juegan los microorganismos, como lo son las bacterias y los hongos, fue de vital importancia para establecer procesos más eficientes y controlados, generados principalmente por la adición de cultivos iniciadores (Hui *et al.* 2006).

3.3. Bioconservación

En los alimentos pueden estar presentes una gran variedad de microorganismos, provenientes de su manipulación, del equipo empleado en su elaboración y de otras fuentes tales como agua, aire, el polvo, el suelo, etc. Sin embargo, está bien establecido que los factores intrínsecos de los alimentos como acidez, a_w , etc. y extrínsecos como el entorno de almacenamiento, dictan los tipos de microorganismos que dominarán en la microbiota, en la que pueden existir microorganismos que deterioren el alimento o, peor aún, que sean patógenos y dañen la salud. Para asegurar que estos microorganismos no van a estar presentes se recurre a la bioconservación (Leroy *et al.* 2004), la cual se define como: “el uso de herramientas biológicas como microorganismos y/o sus metabolitos con la finalidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y/o responsables de la descomposición del alimento”. La bioconservación ha incrementado su popularidad sobre otros métodos de conservación debido a que no afecta a la salud de los consumidores y tiene un menor impacto sobre las propiedades nutrimentales y sensoriales del producto en relación a otros métodos de conservación, ya sean químicos o fisicoquímicos (Galvez *et al.* 2007). También se puede afirmar que se reducen los costos de procesamiento mientras que la vida útil de los productos se alarga. Se resuelven problemáticas emergentes en la industria, como el incremento de la resistencia a antibióticos en los microorganismos patógenos presentes a lo largo de la cadena alimentaria, gracias a la capacidad de las BAL de inhibir a bacterias patógenas dentro de la fermentación de una manera completamente natural, segura y que contribuye con el desarrollo de características especiales de los alimentos. En contraposición con los aditivos químicos, los consumidores perciben a estas

técnicas de bioconservación como algo “natural” y benéfico para la salud”, por lo que su empleo en alimentos tiene gran aceptación (Hui *et al.* 2006; Reis *et al.* 2012;).

4. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL), constituyen un grupo diverso de microorganismos asociados a las plantas (col, maíz, cebada, col rizada y ensilaje), carne, y tracto digestivo de los animales. Poseen características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Las BAL son mejor conocidas por su uso intencional en la elaboración de productos lácteos como el yogur, mantequilla, requesón, quesos duros (Cheddar, Provolone, Romano y Edam) y los quesos blandos (Brie y Camembert). Las BAL también son importantes en el comercio y el procesamiento de carnes como lo es en la producción de alimentos fermentados, bebidas alcohólicas (Carr *et al.* 2002).

En general, las BAL son cocos y bacilos de longitud variable y de un grosor de 0.5 -0.8 μm , Gram-positivos, no esporulados, no móviles, anaerobios o aerotolerantes, oxidasa y catalasa negativas, carecen de citocromo, no reducen el nitrato a nitrito. A pesar de su metabolismo anaerobio, son anaerobios tolerantes, contienen un grupo hemo, que les permite poner en marcha la cadena respiratoria con el oxígeno como aceptor de electrones y en los medios de cultivos sólidos forman colonias en presencia de aire. Producen ácido láctico como producto de la fermentación de carbohidratos, además de ser ácido tolerantes, algunas pueden crecer a valores de pH bajos (hasta 3.2) otras a valores altos como 9.6 y la mayoría crece entre pH 4.0 y 4.5, permitiendo sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no sobrevivirían debido al aumento en la actividad producida por los ácidos orgánicos (Ekinci y Gurel, 2007; Salminen *et al.* 2012).

Las BAL son microorganismos quimo-organotróficos, nutricionalmente exigentes por lo cual para su proliferación pueden ser empleados carbohidratos fermentables y alcoholes como fuentes de energía para formar principalmente ácido láctico, a través de la degradación de hexosas a lactato (homofermentativas) y productos

adicionales como acetato, etanol, CO₂, formiato o succinato (heterofermentativas), además necesitan vitaminas del grupo B (lactoflavina, tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, ácido fólico) y varios aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas entre otros factores de crecimiento (Devlieghere *et al.* 2004; Ekinci y Gurel, 2007).

La leche es el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL, donde son capaces de hidrolizar péptidos de la leche. La concentración de aminoácidos libres en la leche es muy limitada, por lo cual el desarrollo óptimo de las BAL depende de su capacidad de producción de proteinasas, peptidasas, así como su sistema de transporte de aminoácidos y péptidos específicos (Carr *et al.* 2002). Otros alimentos son también excelentes medios de crecimiento y producción de metabolitos, entre ellos se encuentran la carne, las masas de cereales, y los vegetales. Además de producir el ácido láctico, las BAL también contribuyen al sabor, aroma, textura y al valor nutricional de los alimentos fermentados a través de la producción de exopolisacáridos y modificación de lípidos y proteínas, lo anterior debido a su actividad metabólica sobre estas moléculas, lo que contribuyendo a la digestibilidad de alimentos y preservación del producto final. Estos microorganismos son generalmente utilizados como cultivos iniciadores en la elaboración y conservación de productos lácteos, tales como leche acidificada, yogurt, mantequilla, crema, kéfir y quesos, así como productos cárnicos y vegetales (García *et al.* 1998; Carr *et al.* 2002).

4.1. Clasificación de BAL

En la naturaleza existen los siguientes géneros:

Aerococcus, *Alloinnococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Sin embargo, los géneros más representativos son: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Carr *et al.* 2002; Salminen *et al.* 2012).

La clasificación de las BAL en géneros se basa en principio por su morfología, modo de fermentación (homofermentativas y heterofermentativas) y la configuración del ácido láctico producido, en donde se pueden formar isómeros de ácido láctico a partir de la fermentación de la glucosa (Carr *et al.* 2002). Las homofermentadoras como: *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* y algunas especies de *Lactobacillus*, como *L.acidophilus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L.delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. lactis*, y *S. thermophilus* (Blanco *et al.* 2006), poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como el principal producto de su fermentación de la glucosa utilizando la vía de la glucólisis. El grupo homofermentativo utiliza la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) al convertir 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico (Figura 1). Dentro de este grupo se tiene: *Lactobacillus*, de forma bacilar, aislados o en cadenas cortas, termófilos, acidificantes muy energéticos y de actividad caseinolítica notable. *Streptococcus*, de formas esféricas en cadenas, acidificación rápida y poca actividad caseinolítica (Hernández-Mendoza *et al.* 2007; Salminen *et al.* 2012).

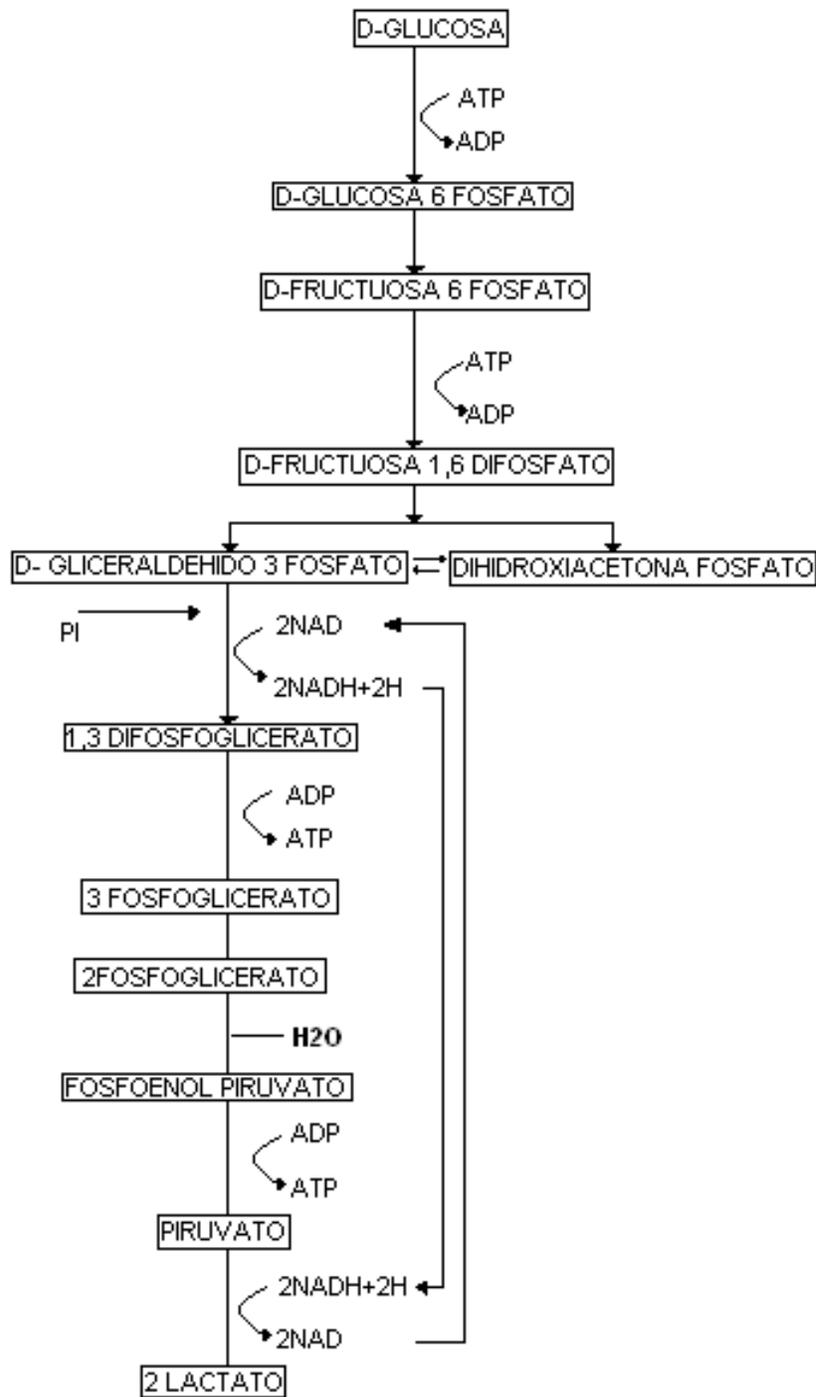


Figura 1. Fermentación homoláctica (tomado y modificado de Salminen *et al.* 2012).

Por su parte, las pertenecientes a los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera*, así como algunos miembros del género *Lactobacillus* que incluyen a *L. plantarum*, *L.rhamnosus*, *L. coryneformis*, *L. curvatus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentun*, *L. kefire* y *L. reuteri* (Blanco *et al.* 2006), son heterofermentadoras y producen solamente 50% de ácido láctico. Estas fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol, 1 mol de CO₂ y 1 mol de ATP. Este grupo de bacterias contiene la enzima fosfoacetolasa, pero carece de la aldolasa y hexosa isomerasa, así que, en lugar de seguir la vía (EMP), utilizan las vías de la hexosa monofosfato o la de la pentosa (Figura 2) (Devlieghere *et al.* 2004; Ly *et al.* 2008).

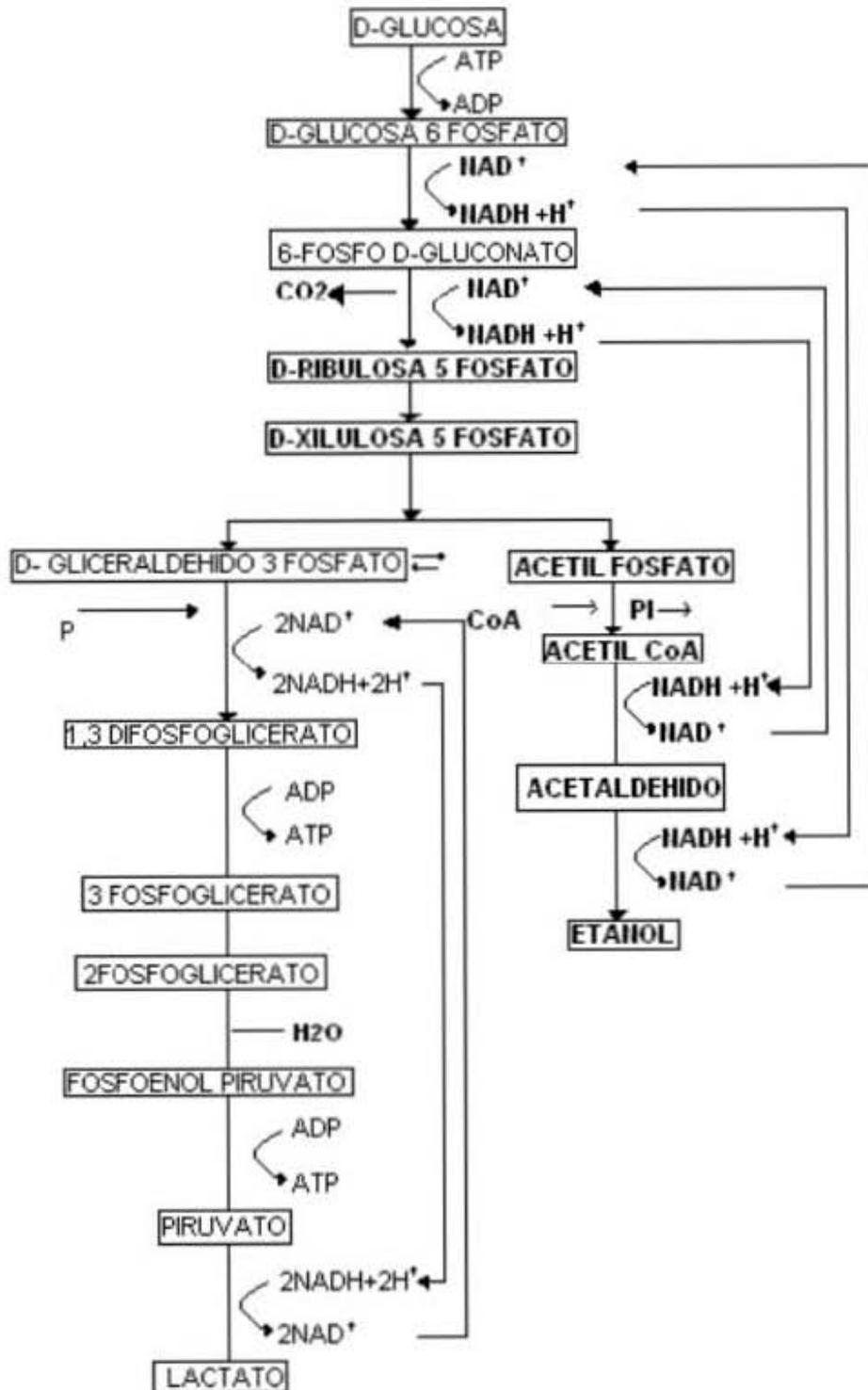


Figura 2. Fermentación heteroláctica (tomado y modificado de Salminen *et al.* 2012).

Las especies heterolácticas obligadas utilizan solamente la ruta dependiente de fosfoetolasa para metabolizar azúcares y, además de ácido láctico, producen cantidades significantes de ácido acético y/o etanol con la generación de dióxido de carbono; la D-galactosa puede ser metabolizada a través de la ruta tagatosa 6-fosfato o ruta Leloir (Figura 3). Estas especies fermentativas metabolizan hexosas a través de la ruta glucolítica EMP, pero pentosas y algunas otras sustancias son metabolizadas vía fosfoetolasa para producir ácido láctico y otros productos, como el ácido acético y etanol (Figura 3) (Salminen *et al.* 2012).

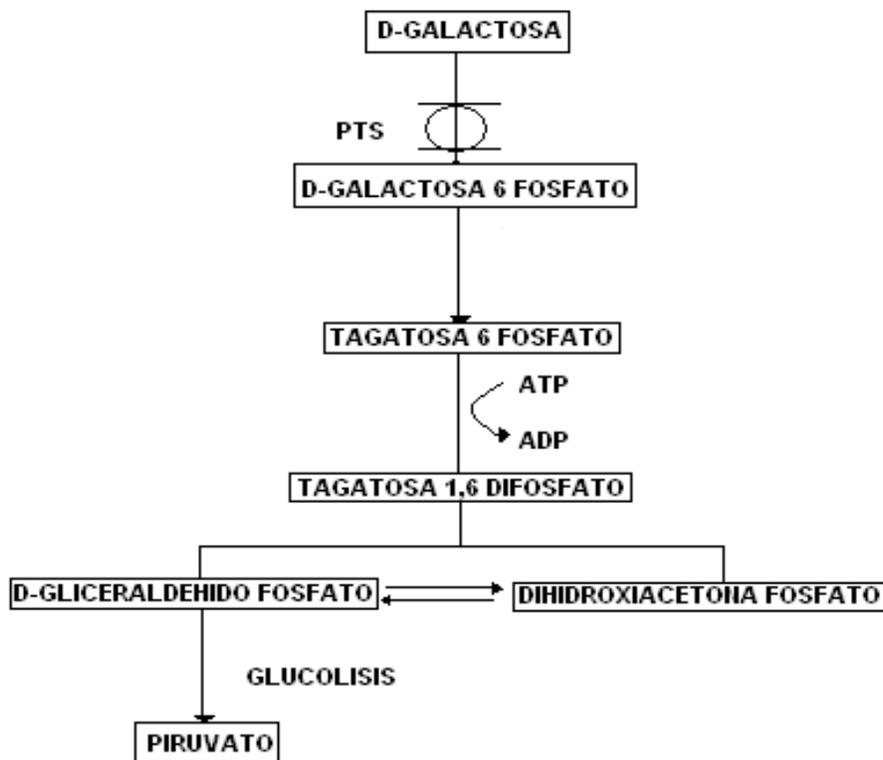


Figura 3. Ruta metabólica de la galactosa (tomado y modificado de Salminen *et al.* 2012).

En la industria alimentaria algunas BAL heterolácticas son empleadas en la producción de compuestos que intensifican el sabor y aroma tales como acetaldehído y diacetilo (Leroy *et al.* 2004; Salminen *et al.* 2012).

Las BAL también se clasifican según la temperatura ideal de crecimiento en mesófilas y termófilas.

Mesófilas: temperatura ideal de incubación a 20-25°C, volumen de cultivo líquido 1-2%, tiempo de incubación de 18-20 h, acidez final 0.8% de ácido láctico. Especies: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis*, biovariedad *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Estos géneros principalmente se emplean en la elaboración de kumis y quesos semi-madurados (Blanco *et al.* 2006).

Termófilas: Temperatura ideal de incubación a 40-45°C, volumen de cultivo líquido 2-3%, tiempo de incubación de 2-4 h, acidez final 0.9% de ácido láctico. Especies: *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Son empleados principalmente para la elaboración de yogurt y quesos madurados (Blanco *et al.* 2006).

4.2. Metabolitos producidos por las BAL

La acción conservadora de las BAL se debe a la inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y dañinos, por varios productos finales de la fermentación. Son capaces de producir una gran cantidad de sustancias denominadas metabolitos. Estas sustancias son ácidos como láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y exopolisacáridos principalmente, estos metabolitos también son responsables de ciertas funciones en los alimentos, como el desarrollo de sabores y olores característicos (Vázquez *et al.* 2009).

4.2.1. Producción de ácido láctico

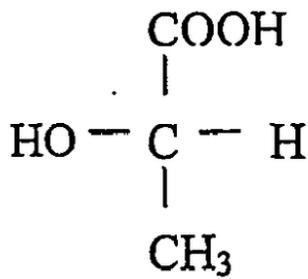
Es el ácido más importante en el ramo de los productos fermentados y preservación de alimentos comestibles. Fue descubierto en la leche cortada por Scheele en 1780, quien lo consideró como un componente de la leche. En 1789, Lavoisier llamó a este componente de la leche "ácido láctico". En 1857, Pasteur

descubrió que no era un componente de la leche, sino un metabolito de la fermentación generado por ciertos microorganismos.

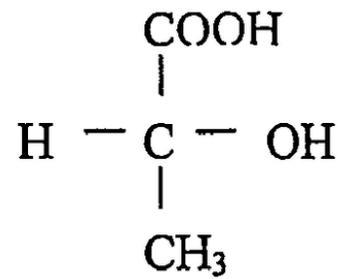
Dentro de los microorganismos productores de ácido láctico pueden citarse *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Bifidobacterium*, siendo *Lactobacillus delbrueckii* el microorganismo más utilizado (Moreira *et al.* 2000). Este es el primer ácido orgánico producido biotecnológicamente, teniendo un amplio rango de aplicaciones. Es utilizado como acidulante/agente amortiguador de pH o inhibidor de esporas de bacterias en una amplia variedad de alimentos procesados, como dulces, pan y productos de panadería, bebidas no alcohólicas, sopas, sorbetes, productos lácteos, mermeladas, gelatinas y mayonesas. En ciertos alimentos no es posible agregar ácido láctico en grandes cantidades por su olor y sabor fuerte, así que puede ser reemplazado por cierta cantidad de ácido acético, el cual también tiene una actividad antimicrobiana (Devlieghere *et al.* 2004; Moreno y Polo, 2008).

El ácido láctico puede ser extraído del producto de fermentación, y se determinará gracias a su capacidad en desviar el plano de giro de la luz polarizada. Si la rotación es a la derecha, se denomina dextrógiro D (-), si la rotación es a la izquierda, se denomina levógiro L(+) y si hay una mezcla de ambos, se denomina racémica, la cual está constituida por fracciones equimolares de las formas L(+) y D(-) (Figura 4) (Carr *et al.* 2002; Páres *et al.* 2002; Gopal *et al.* 2008).

El isómero D (-) es perjudicial al metabolismo humano y puede generar acidosis y descalcificación (Panesar *et al.* 2007). El ácido L (+) láctico es clasificado como GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro) para su empleo como aditivo alimenticio por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos). Este ácido es uno de los más importantes producidos por las BAL (Savadogo *et al.* 2006; Ghasemi *et al.* 2009).



L (+) Ácido Láctico



D (-) Ácido Láctico

Figura 4. Forma L y D del ácido láctico (Páres *et al.* 2002).

El ácido L (+) láctico es el preferido por la industria. La aplicación de procesos de separación, concentración y secado permiten obtener ácido L (+) láctico purificado cuya demanda mundial anual es superior a las 200.000 toneladas (Gopal *et al.* 2008) de las cuales el 85% de la demanda son aplicaciones en alimentos y el 15% restante en la industria no alimentaria (Rojan *et al.* 2009).

4.2.2. Producción de ácido propiónico

Esta fermentación es efectuada por bacterias heterofermentativas empleadas en la industria quesera para la producción de quesos tipo Emmental, Suizo, Gruyere, etc., donde el ácido láctico es transformado en ácido propiónico y acético con desprendimiento de CO₂ (Figura 5), el cual forma los “ojos” en los quesos (Carr *et al.* 2002; Páres *et al.* 2002).

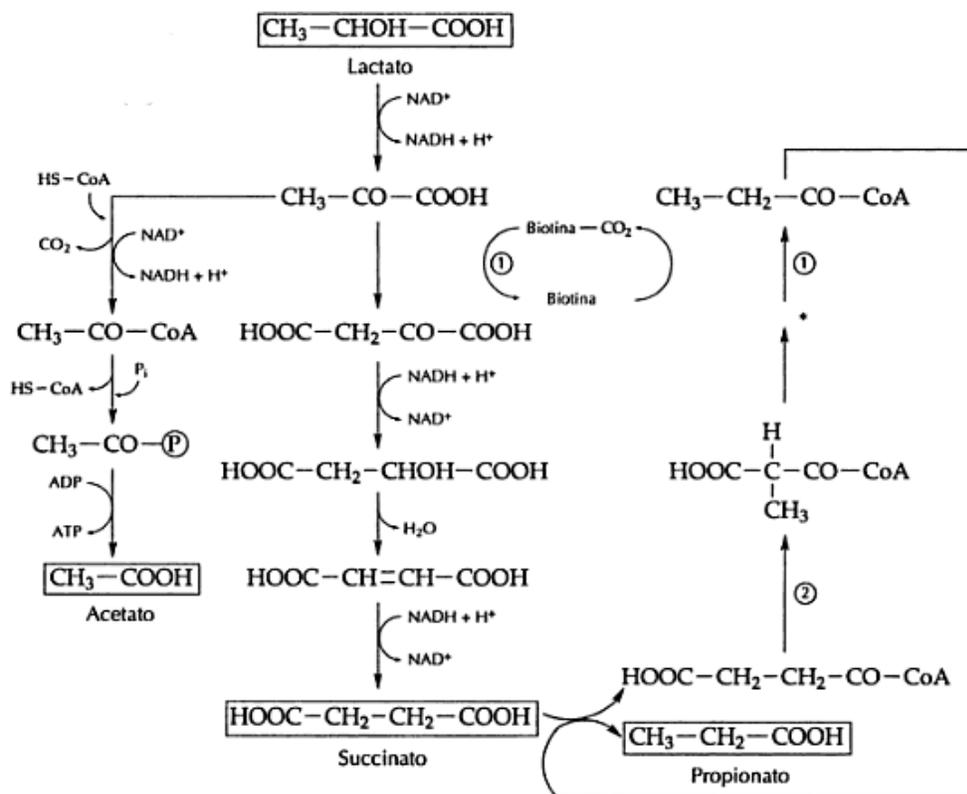


Figura 5. Fermentación propiónica (Páres *et al.* 2002)

4.2.3. Fermentación de ácido cítrico

La efectúan bacterias heterofermentativas como *Leuconostoc citrovorum*, *Streptococcus diacetylactis*, utilizadas en mantequillas y quesos, ya que transforman el ácido cítrico en productos aromatizantes como la acetoina y el diacetilo (Figura 6). Estos compuestos, así como imparten aroma y sabor a los productos lácteos, también tienen un efecto antimicrobiano. El acetaldehído puede inhibir la división celular de *Escherichia coli* y el diacetilo inhibe levaduras, bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Páres *et al.* 2002; Hernández-Mendoza *et al.* 2007).

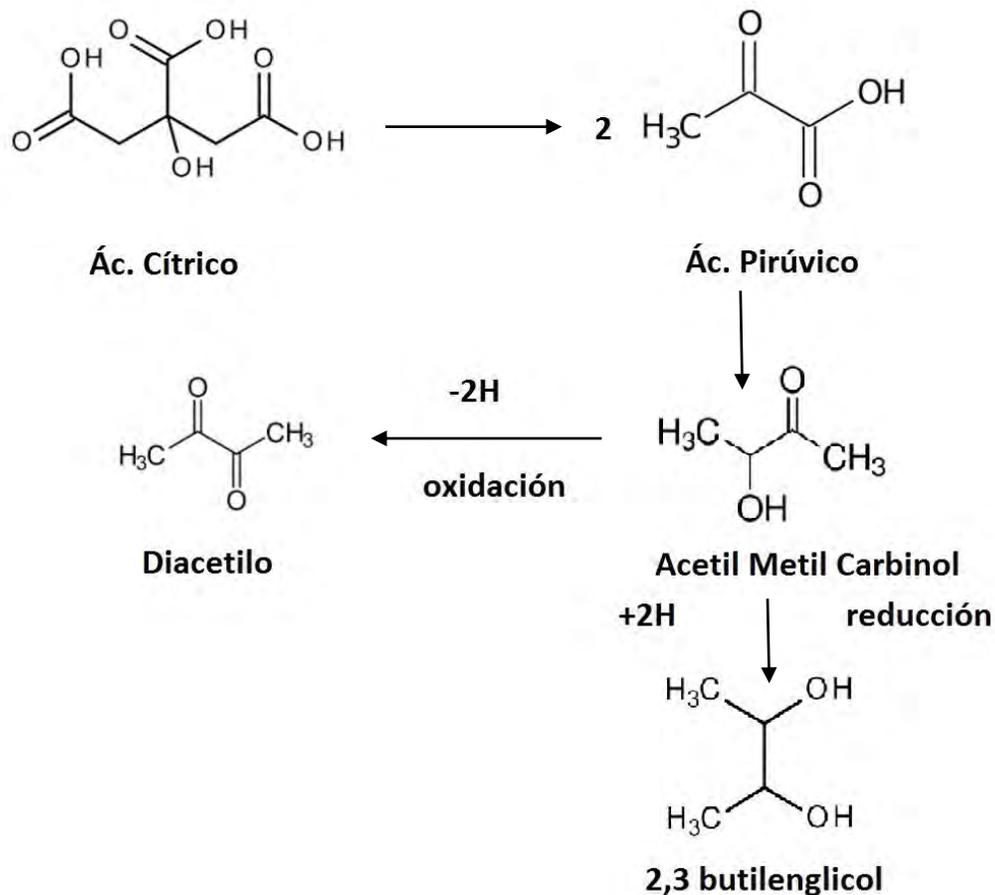


Figura 6. Fermentación del ácido cítrico (Páres *et al.* 2002)

La acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por las BAL contribuyen al desarrollo de sabor, aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos alterantes. La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos y del pH es complementaria, siendo la fracción no disociada de los ácidos orgánicos la que posee una mayor actividad inhibidora debido a su naturaleza lipofílica, ya que pueden atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma e interferir con funciones celulares, como puede ser la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa. Además, provocar el incremento de protones en el interior de la célula. Cuando la concentración de protones excede la capacidad de amortiguamiento del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas

reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso de pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de la célula interfiriendo así con la viabilidad (Vázquez *et al.* 2009).

Las BAL pueden sobrevivir en presencia de pH bajo, a diferencia de otros grupos microbianos, pues poseen un sistema de transporte simultaneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, origina energía para la célula (Vázquez *et al.* 2009).

4.2.4. Producción de peróxido de hidrógeno

El desarrollo de las BAL en medios aerobios conduce a la formación de varios metabolitos del oxígeno como: peróxido de hidrógeno, aniones súper oxido y radicales libres, que poseen un efecto bacteriostático y bactericida frente a la microbiota láctica y no láctica. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) funciona como un oxidante produciendo radicales libres que atacan los componentes celulares esenciales, proteínas y DNA (Salminen *et al.* 2012).

Es producido a través de la acción de NADH oxidasa la cual cataliza la oxidación de NADH por oxígeno molecular. El sistema lactoperoxidasa es un sistema antimicrobiano natural que se encuentra en la leche y ha sido exitosamente utilizado para extender la vida útil de la leche y queso cottage, inhibiendo patógenos en leche y productos lácteos procesados, como *Pseudomonas* y *Staphylococcus aureus* (Carr *et al.* 2002; Blanco *et al.* 2006).

Sin embargo, a pesar de su potencial en la preservación, se reconoce el bajo potencial de este compuesto en los alimentos, ya que puede tener efectos perjudiciales en la calidad organoléptica pues causa rancidez de las grasas y reacciones de decoloración y enverdecimiento (Moreira *et al.* 2000).

4.2.5. Producción de CO₂ y diacetilo

El dióxido de carbono es un producto final de la fermentación heteroláctica y en ocasiones se obtiene por descarboxilación de aminoácidos por BAL. El dióxido de carbono promueve un ambiente anaeróbico, reduce el pH y puede ayudar a destruir la integridad de la pared celular microbiana. Asimismo, el diacetilo es producido por BAL que fermentan el citrato y es sintetizado en el metabolismo intermedio del piruvato. Se caracteriza por el aroma a mantequilla que imparte a productos lácticos cultivados. Se ha mostrado la actividad antimicrobiana del diacetilo a nivel de 200 µg/ml para levaduras y bacterias Gram-negativas, mientras que para bacterias Gram-positivas no lácticas es de 300 µg/ml (Salminen *et al.* 2012).

4.2.6. Producción de exopolisacáridos

Los exopolisacáridos (EPS) son polisacáridos de cadena larga consistentes de ramificaciones de unidades repetitivas de azúcares, principalmente, glucosa, galactosa y ramnosa en diferentes proporciones. Las BAL se caracterizan por su capacidad de conversión de una gran proporción de su fuente de carbono, azúcares fermentables, a ácido láctico. Sin embargo, son capaces de desviar una pequeña proporción de azúcares fermentables hacia la biosíntesis de EPS, dependiendo también de las condiciones de cultivo y composición del medio (Rodríguez, 2003; Lin y Chang, 2007).

Los polisacáridos pueden ser divididos en dos grupos:

Homopolisacáridos compuestos por monosacáridos como el dextrano y heteropolisacáridos compuestos de diferentes azúcares como glucosa, galactosa, ramnosa, manosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido glucónico (Ross *et al.* 2002).

Algunos cultivos de *S. thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* son capaces de producir polisacáridos de alto peso molecular con diferentes estructuras (Ross *et al.* 2002).

Los EPS desempeñan un papel importante en la industria de derivados lácteos fermentados, en particular en la producción de yogurt, queso y crema fermentada. Contribuyen a la textura, reología, sabor, percepción sensorial y estabilidad final del producto. Además, los EPS han sido utilizados ampliamente como geles, emulsificantes y suspensiones de estabilizantes. Otro beneficio fisiológico incluye la colonización gastrointestinal por bacterias probióticas, incrementando la residencia de los EPS en el tracto gastrointestinal. Además, se ha postulado que los EPS producidos por BAL tienen efectos anti-tumor, anti-úlceras, efectos inmunostimulatorios y disminución de niveles de colesterol en la sangre (Serna y Rodriguez, 2005; Shen y Bravo, 2006).

4.2.7. Producción de reuterina

La reuterina o 3-hidroxiopropanal (Figura 7) es una sustancia con actividad antibacteriana de amplio espectro. Se reportó por primera vez en el microorganismo *Lactobacillus reuteri*. Es producido por la célula cuando en el medio se encuentra la mezcla de glucosa y glicerol o gliceraldehído en condiciones anaerobias.

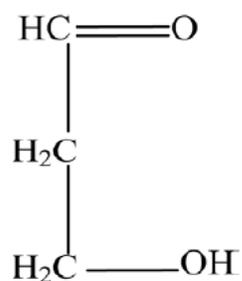


Figura 7. Estructura de la reuterina o 3-hidroxiopropanal (Páres *et al.* 2002)

La reuterina presenta actividad antibacteriana, antifúngica, antiprotozoaria y antiviral. No se ha reportado un posible efecto negativo contra humanos, aunque se ha observado que la reuterina es capaz de enlazar tejidos biológicos en una forma similar al glutaraldehído, debido a su capacidad de establecer puentes de entrecruzamiento con proteínas. En solución acuosa, la reuterina se puede

encontrar en forma dimérica, dando lugar a un dialdehído, que puede enlazar a los grupos amino de las proteínas, específicamente los grupos aldehído reaccionan con el grupo amino de la lisina ubicada en proteínas adyacentes originando los puentes de entrecruzamiento. Las mismas BAL son sensibles a la reuterina pero son más resistentes que los demás microorganismos (De Vuyst y Vandamme, 1994).

Su amplio espectro puede explicarse por su mecanismo de acción. Actúa en contra de enzimas con grupos sulfhidrilo y proteínas como la actina, que forma el citoesqueleto, la Glutathion-reductasa y las ATPasas transportadoras de Ca^{2+} celular (al igual que el incremento de la permeabilidad de la membrana), lo que compromete la viabilidad celular. Es inhibidor de la subunidad de unión a sustrato de ribonucleótido reductasas, por lo que interviene en la síntesis de ADN (Páres *et al.* 2002; Magnusson, 2003; Salminen *et al.* 2012).

Otros productos de interés biotecnológico

5. Bacteriocinas

Son péptidos pequeños estables al calor, producidos por síntesis ribosomal y son segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores, debido a que las bacterias que las producen tienen un mecanismo de inmunidad específica. Estas sustancias con frecuencia actúan frente a las bacterias más estrechamente relacionadas. Sin embargo, estudios recientes afirman que también pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos (Papagianni, 2003; Cotter *et al.* 2005).

En la naturaleza existe una enorme diversidad de bacteriocinas que han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas examinadas hasta la fecha, y aún dentro de una especie podrían producirse diferentes tipos de bacteriocinas.

Se piensa que el 99% de las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina y la única razón de que no se hayan aislado es debido a que han sido poco estudiadas. Las halobacterias, por ejemplo, miembros del grupo Archaea, producen su propio tipo de bacteriocinas, las halocinas (Gordon y O'Brien, 2006).

Los microorganismos invierten una gran proporción de energía para la producción y elaboración de metabolitos antimicrobianos. Sin embargo, aún no se tiene una idea clara de cómo la diversidad de estas sustancias aumenta y cuál es la función que desempeñan en las comunidades microbianas, por lo que estas moléculas han servido como modelo para tratar de responder algunas preguntas evolutivas y ecológicas (Gordon y O'Brien, 2006).

En el caso de las BAL, las primeras observaciones comenzaron en 1928, cuando se describió que ciertas cepas de *Lactococcus* empleadas en la fabricación de quesos producían un efecto inhibitorio en el crecimiento de otras BAL y potencialmente podían inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y nocivas para la conservación del queso (Cotter *et al.* 2005). En 1933 se describió por primera vez una sustancia de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana producida por cepas de la especie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que posteriormente se denominó nisina (Riley y Wertz, 2002). En 1953 se comercializó por primera vez en Inglaterra y en 1969 se aprobó su uso en alimentación por la OMS (Joint Food and Agriculture Organization / World Health Organization Expert Committee on Food Additives), en tanto en 1983 se incluyó en la lista de aditivos de la Unión Europea. Poco después, en 1988, fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) norteamericana (Cotter *et al.* 2005).

La nisina es por tanto la bacteriocina que tiene un historial más largo de uso en alimentos y la que ha sido más estudiada. Se han encontrado aplicaciones de gran utilidad, una de ellas es alargar la vida útil en una amplia gama de productos en todo el mundo, que van desde queso Cottage procesado para postres lácteos hasta huevo líquido. También se encontró que era eficaz en aplicaciones tales

como la inhibición de bacterias involucradas en la descomposición de la cerveza y el vino durante la fermentación (Papagianni 2003; Leroy *et al.* 2004).

Aunque las bacteriocinas se pueden encontrar en muchas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, en la actualidad las bacteriocinas que poseen el mayor impacto dentro de la industria alimenticia son las producidas por las BAL (Tabla 1), debido a que estas bacterias poseen la denominación GRAS, 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. Cuentan con la aprobación regulatoria debido a su origen y a que pueden ser fácilmente adicionadas dentro de alimentos para su fermentación, sin ningún tipo de concentración o purificación (Cotter *et al.* 2005).

Esta tendencia refleja la creciente conciencia de los riesgos que se derivan no sólo de consumir alimentos que transmiten microorganismos patógenos, sino también de los conservadores químicos utilizados. En consecuencia, ha habido un interés renovado en las llamadas tecnología verdes, incluyendo nuevos enfoques para un procesamiento mínimo y la explotación de bacteriocinas para la bioconservación (Papagianni, 2003).

Es importante mencionar que las bacterias ácidolácticas son también los microorganismos más utilizados como probióticos no solo en el ser humano sino en mamíferos y muy recientemente en los peces y crustáceos. Los estudios efectuados con BAL han reportado efectos positivos en el crecimiento, sobrevivencia y eliminación de patógenos de los organismos acuáticos; sin embargo, la gran diversidad de compuestos inhibidores producidos por las bacterias ácidolácticas, como las bacteriocinas, requieren de rigurosos estudios sobre el modo de acción de estos compuestos sobre otros microorganismos en condiciones ambientales diferentes a las de su origen, ya que en la mayoría de los casos se han utilizado cepas aisladas del ser humano o de mamíferos y están siendo comercializadas para ser utilizadas en acuicultura y, a la fecha, no se

cuenta con reportes sobre el tipo y efecto de estos compuestos (O'Sullivan *et al.* 2002).

Tabla 1. Ejemplos de BAL, bacteriocinas que producen y alimentos fermentados donde se encuentran (Castellano *et al.* 2008; Saeed *et al.* 2011).

Bacteriocina	Organismo productor	Alimentos fermentados donde se encuentran
Nisin Z	<i>L. lactis</i> N8, NIZO22186	Quesos madurados
Nisin A	<i>L. lactis</i> NIZOR5, 6F3,NCFB894, ATCC11454	Quesos madurados
Lactocin S	<i>Lb. sake</i> 145	Salchichas curadas
Lacticin 481	<i>L. lactis</i> CNRZ481, ADRIA85LO3	Quesos madurados
Lactococcin	<i>Lb. lactis</i> ADRI85L030	Yogurt, Quesos madurados
Lacticin 3147	<i>Lc. Lactis</i> DPC3147	Quesos madurados
Variacin 8	<i>Micrococcus varians</i> MCV8	Productos cárnicos madurados
Mundticin	<i>E. mundtii</i> AT06	Quesos madurados y productos cárnicos madurados
Piscicocin	<i>Carnobacterium piscicola</i> JG126	Productos cárnicos madurados
Sakacin P	<i>Lb. sake</i> LTH 673	Salchichas curadas
PediocinAch	<i>Pediococcus acidilactici</i> H	Productos cárnicos madurados, productos vegetales fermentados

Divercin V41	<i>C. divergent</i> V41	Productos cárnicos madurados
Bavaricin MN	<i>Lb. sake</i> MN	Salchichas curadas
Enterocin A	<i>E. faecium</i> CTC 492/T136	Quesos madurados, salchichas curadas
Psicocin V1b	<i>C. piscicola</i> V1	Productos cárnicos madurados
Enterocin P	<i>E. faecium</i> P13	Quesos madurados, salchichas curadas
Curvacin A	<i>Lb. curvatus</i> LTH 1174	Quesos madurados
Carnobacterocin B2	<i>C. piscicola</i> LV17A	Productos cárnicos madurados
Sakacin A	<i>Lb. sake</i> LB 706	Salchichas curadas
Enterocin L50A / L50B	<i>E. faecium</i> L50	Quesos madurados, salchichas curadas
Lactocin 705	<i>Lb. casei</i> CRL505	Yogurt, leche fermentada, bebidas lácteas
Lacticin F (LafX and LafA)	<i>Lb. johnsonii</i> VPI11088	Leche fermentada
Lactococin 705 α and β	<i>Lc. Lactis</i> LMG2081	Quesos madurados
Lactococin Gα and β	<i>Lc. Lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 9B4	Quesos madurados
Thermophilin 13 A and B	<i>S. Thermophilus</i> SFi13	Yogurt

5.1. Clasificaciones

Para obtener una clasificación, diversos investigadores han buscado agrupar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas. Se han propuesto hasta cinco principales clases de bacteriocinas provenientes de las BAL, las cuales se describen a continuación y que provienen de la recopilación presentada por Drider y Rebuffat (2011) y Kemperman *et al.* (2003).

Clase I (Lantibióticos)

Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, β -metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a diversas modificaciones químicas que son necesarias para realizar su función denominadas modificaciones postraduccionales. Con poca estabilidad al calor, son péptidos policíclicos de <5 kDa. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina.

A su vez, en función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen en 2 grupos:

- Clase I-A: péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y que engloban a los lantibióticos de un sólo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total.
- Clase I-B: péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.

Clase II (No lantibióticos)

Bacteriocinas lineales y no modificadas post-traduccionalmente. Son péptidos pequeños (<10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA-1, la bacteriocina más estudiada después de la nisina. En este grupo se pueden identificar tres subclases:

- Clase II-a: péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.
- 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. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.
- Clase II-c: péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidoslíder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

Clase III.

Bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina, acidofilicina A y lactacinas A y B.

Clase IV.

Bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteínica 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 post-traduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gaseicina A.

Sin embargo, una clasificación que incluya varios grupos de bacteriocinas puede complicar un consenso entre las distintas partes para llegar a una clasificación coherente y universal, de acuerdo a sus mecanismos de acción y estructuras. Para fines de esta recopilación se ha decidido mostrar la clasificación realizada por Cotter *et al.* (2005) y complementada por el mismo grupo en el 2013.

El esquema de clasificación propuesto divide las bacteriocinas en dos grandes categorías: los lantibióticos, que contienen lantionina (clase I) y las bacteriocinas que no contienen lantionina (clase II), eliminando de esta manera a las hidrolasas termolábiles de alto peso molecular (antiguamente formadoras de la clase III de bacteriocinas) creando de esta manera una designación independiente denominada “bacteriolisinas” (Tabla2).

Tabla 2. Clasificación de bacteriocinas (tomada y modificada de Cotter *et al.* 2005; Cotter *et al.* 2013).

Clasificación	Observaciones	Ejemplos
Clase I Lantibióticos (bacteriocinas que contienen lantionina)	Incluye lantibióticos de uno y dos péptidos, y hasta 11 subclases han sido propuestas	Lantibióticos de un péptido: la nisina, mersacidina, lacticina 481. Lantibióticos de dos péptidos: lacticina 3147, citolisina.
Clase II No lantibióticos (Bacteriocinas que no contienen lantionina)	Clase heterogénea de péptidos pequeños; como pediocina (subclase A), de dos péptidos (Subclase B), cíclicas (Subclase C); anteriormente denominadas clase V).	Clase II-a: PA1 pediocina, leucocin A; clase II-b: lactacin F; clase II-c: enterocina AS48, reuterina 6; clase II-d: lactococcin A, divergicin A.
Bacteriolisinas (Proteínas líticas que no son bacteriocinas)	Proteínas grandes, termolábiles, a menudo hidrolasas de mureína.	Lisostafina, enterolisina A.

Clase I (lantibióticos)

Los lantibióticos (bacteriocinas que contienen lantionina) son pequeños péptidos de 19-38 aminoácidos de longitud, que poseen lantionina o residuos de β -metil-lantionina (Figura 8). Estos residuos inusuales son capaces de formar puentes covalentes entre los aminoácidos, lo que provoca la aparición de anillos internos y le da a este tipo de bacteriocinas la estructura característica.

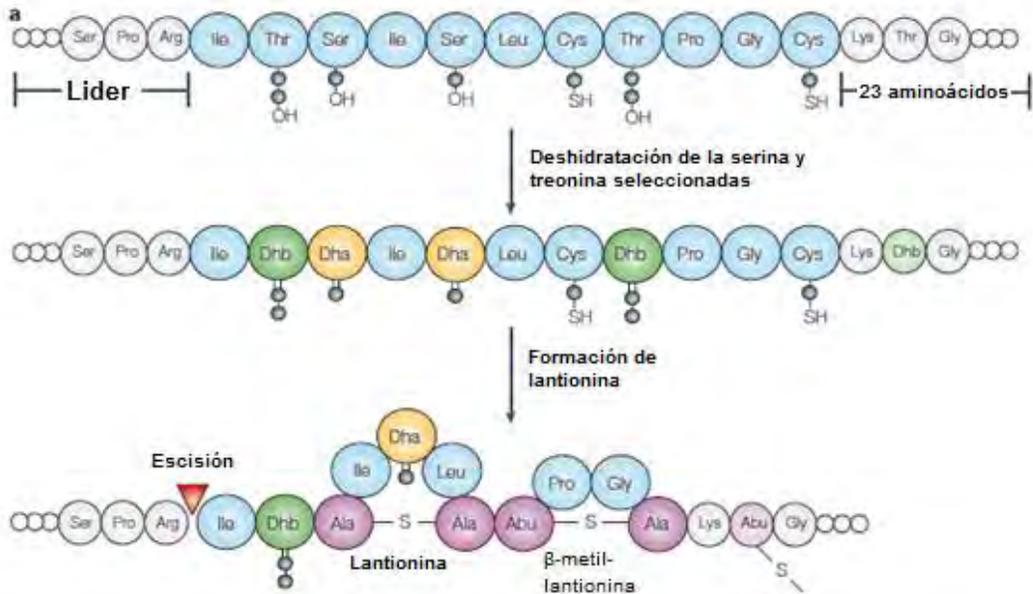


Figura 8. Síntesis de lantionina (tomada y modificada de Cotter *et al.* 2005).

Como se muestra en la figura 8, los residuos de lantionina se forman cuando la deshidratación enzimática de la serina (dehidroalanina, Dha) condensa con el grupo sulfhídrico de una cisteína vecina (Cys). Esto forma un puente entre los dos residuos, creando de este modo un anillo dentro del péptido o lantibiótico modificado. Cuando se unen la treonina (Thr) y la cisteína (Cys), el residuo que se forma es β -metillantionina. Los puentes resultantes entre la lantionina y la β -metillantionina se indican en color rosa como Ala-S-Ala (alanina-S-alanina) y Abu-S-Ala (aminobutirato-S-alanina), respectivamente. Muchos lantibióticos también contienen serinas deshidratadas (Ser) y treoninas (deshidrobutilinas, Dhb). Además, los lantibióticos pueden contener otros residuos inusuales resultado de la modificación postraducciona, incluida la sustitución de D-alaninas por L-serinas. Pueden ser divididos, empleando la base de su estructura y modo de acción.

En general, para los lantibióticos catiónicos anfífilos alargados en forma de vallas como, la nisina (Figura 9) se identifica su actividad a través de la formación de poros, que conduce a la disipación del potencial de membrana y el flujo de salida de pequeños metabolitos de las células. Por el contrario, los lantibióticos

globulares (por ejemplo, mersacidina) fueron definidos originalmente como lantibióticos que actúan a través de la inhibición enzimática. Sin embargo, actualmente se ha establecido que la nisina posee ambos mecanismos de acción y que otros, como lacticina 3147, la cual es un lantibiótico de dos péptidos, debe su función a la actividad cooperativa de dos lantioninas.

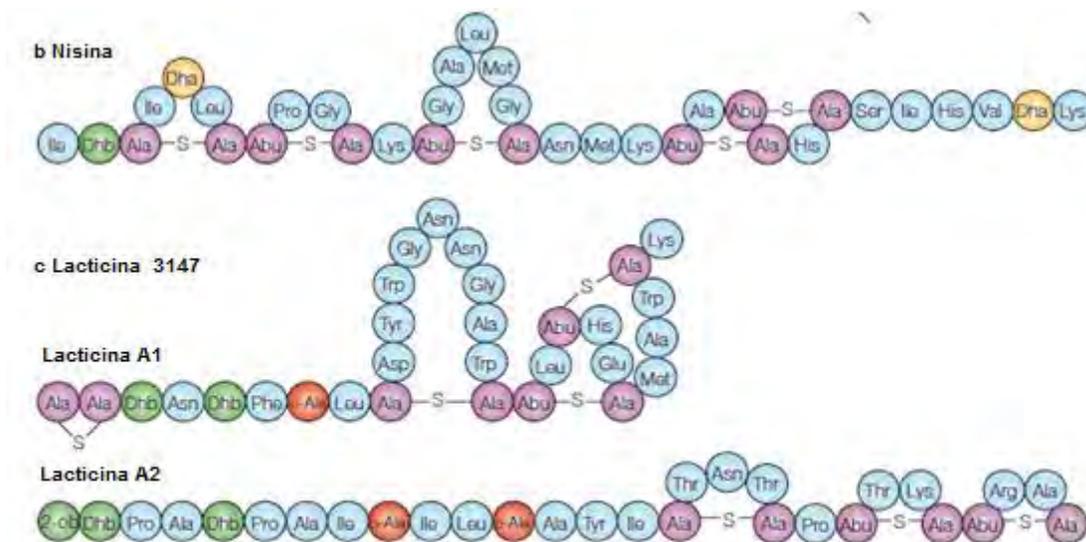


Figura 9. Estructura de la Nisina y Lacticina 3147 (tomada y modificada de Cotter *et al.* 2005).

Los lantibióticos pueden estar compuestos de un único péptido (nisina, figura 9-b) o de dos péptidos que actúan en sinergia (lacticina 3147, figura 9-c). La reacción de deshidratación y la formación del anillo puede ser catalizada por dos enzimas (NISB y NISC en el caso de la nisina) o una sola enzima (LcnM en el caso de lacticina 481).

Algunos lantibióticos solo son activos en el intervalo nM, es decir, su actividad es de varios órdenes de magnitud más alta que el mostrado por los péptidos antimicrobianos encontrados en el sistema inmune innato.

Aunque no se tiene un mecanismo preciso de acción para cada lantibiótico, es evidente que una molécula de acoplamiento o de destino está involucrada, lo que se ha establecido como lípido II.

La unión de nisina al lípido II facilita un doble mecanismo de acción relacionado directamente con la síntesis de peptidoglucano y la formación de un poro. La nisina parece tener una estructura modular en la que se presentan varios residuos N-terminales los cuales son sitios altamente conservados y que también están presentes en otras bacteriocinas similares a la nisina como, la epidermina y streptin, se ha demostrado que estos sitios son esenciales para formar la unión entre la nisina y el pirofosfato del lípido II formando una región tipo bisagra.

El sitio terminal y la intervención de la región bisagra,son esenciales para la formación del poro (Figura 10). También se cree que los péptidos individuales de algunos lantibióticos de dos péptidos presentan módulos de unión discreta al receptor y de formación de poros. La actividad combinada de estos módulos ayuda a explicar la alta actividad de algunos lantibióticos.

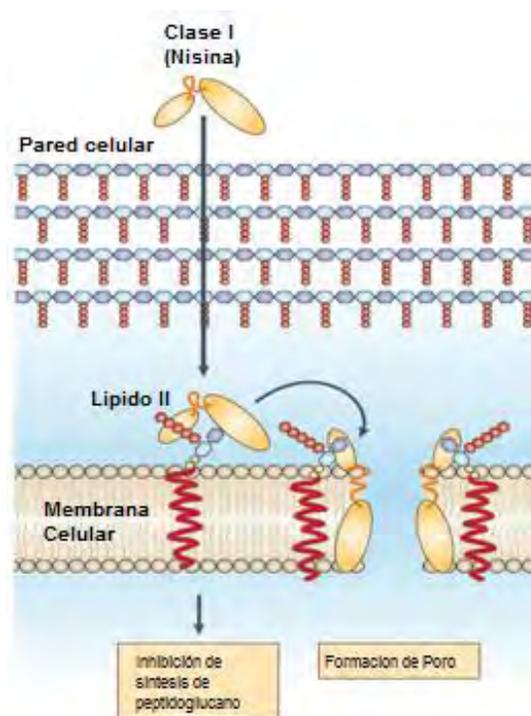


Figura 10. Representación de la clase I de bacteriocinas (Tomada y modificada, de la revisión de Cotter *et al.*2013).

Para algunos miembros de la clase I (o lantibióticos), tales como la nisina, se ha demostrado que tienen un modo de acción dual. Ellos se pueden unir a los lípidos II, el transportador principal de subunidades de peptidogluano desde el citoplasma a la pared celular, y por lo tanto prevenir la síntesis de la pared celular, lo que lleva a la muerte celular. Además, se pueden utilizar los lípidos II como una molécula de acoplamiento para iniciar un proceso de inserción en la membrana y la formación de poros que conduce a una muerte celular rápida. Un lantibiótico de dos péptido, tales como lacticina 3147, puede tener estas actividades duales distribuidas a través de los dos péptidos, mientras que la mersacidina tiene sólo la actividad de unión al lípido II, pero no forma poros.

Sin embargo, en la revisión de Cotter *et al.* (2013), presenta un complemento a su clasificación de bacteriocinas, donde se manejan más subdivisiones, para el caso de las bacteriocinas modificadas que forman la clase II. Recientemente ha sido propuesta una nomenclatura completa para los RiPPs (por sus siglas en inglés “ribosomally synthesized, post-translationally modified peptides”). Dado que los RiPPs incluyen bacteriocinas modificadas, esta nomenclatura también se ha adoptado para las bacteriocinas modificadas de la clase I (Tabla 3).

Tabla 3. Sub-clasificación de la clase I de bacteriocinas (tomada y modificada de Cotter *et al.* 2013)

Grupo	Estructura	Ejemplos
MccC7-C51	Se une covalentemente un ácido aspártico al extremo carboxilo-terminal	MccC7-C51
Lazo péptidos	Poseen estructuras tipo lazo	Mccj25
Péptido que contienen azolina	Poseen heterociclos sin ninguna otra modificación	MccB17
Lantibióticos	Poseen puentes de lantionina	Nisina, planosporicina, mersacidina, actagardina, mutacina 1140
Linadirinas	Tienen estructuras lineares y contienen aminoácidos dihidratados	Cipemicina
Proteusinas	Contienen múltiples hidroxilaciones, epimerizaciones y metilaciones	Politeonamida A
Sactibioticos	Contiene ligas sulfuro- α -carbonilos	Subtilosina A, Turicina CD
Patelamidas como cianobactinas		Patelamida A
Anaciclamidas como cianobactinas	Péptidos cíclicos que consisten en aminoácidos proteinogénicos, con enlaces fenilo	Anaciclamida A10
Tiopeptidos	Contiene una piridina central, dihidropiridina, o anillos de piperidina así como heterociclos.	Tiostrepton, Nocatiacina I, GE2270 A, Filipimicina
Brotomicinas	Contienen amidinas macrocíclicas, un tiazolcarboxiterminal descarboxilado y aminoácidos con carbonos-metilados	Brotomicina A2
Glicocinas	Contienen S enlazados a glicopeptidos.	Sublacin 168

Clase II (bacteriocinas que no contienen lantionina)

También son péptidos pequeños (<10 kDa) estables al calor, pero a diferencia de los lantibióticos, no son sujetos a una extensa modificación post-transduccional. Actúan mediante la permeabilización de la membrana bacteriana, provocando de esa manera la fuga de moléculas (Figura 11). Se han sugerido varias subagrupaciones; sin embargo, para esta clasificación existen dos tipos comunes a todos los sistemas de clasificación: la clase II-A como la pediocina y la clase II-b bacteriocinas de dos péptidos.

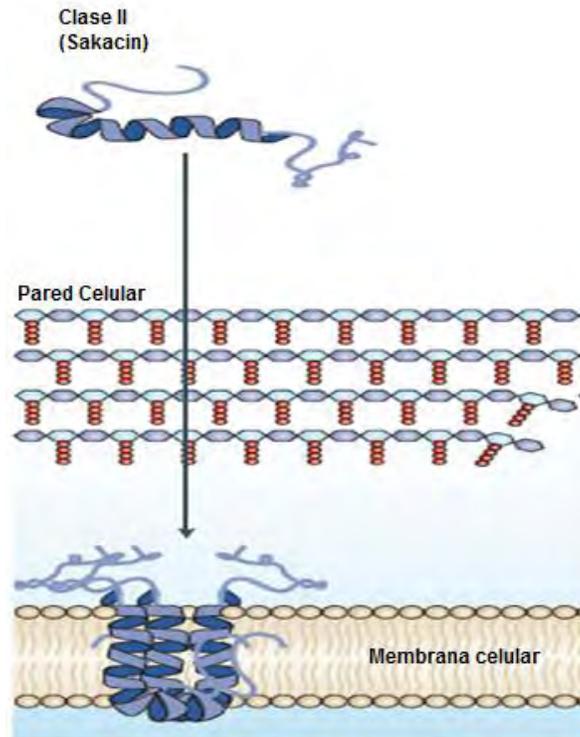


Figura 11. Representación de la clase II de bacteriocinas (Tomada y modificada de Cotter *et al.* 2013).

En general, los péptidos de clase II tienen una estructura anfifílica helicoidal, lo que les permite insertarse en la membrana de la célula objetivo, que conduce a la despolarización y la muerte.

Las bacteriocinas de dos péptidos requieren la actividad combinada de ambos péptidos con un mecanismo de acción que implica la disipación del potencial de la membrana, la fuga de iones o la caída de las concentraciones de ATP intracelular. Estos péptidos muestran una muy baja actividad cuando se prueban individualmente.

Las bacteriocinas como la pediocina tienen un espectro estrecho de actividad, pero muestra una alta actividad específica contra patógenos presentes en alimentos, como *Listeria monocytogenes*. Estas bacteriocinas tienen estructuras que van desde 37 aminoácidos, como la leucocina A y mesentericina, hasta 48

residuos, como la carnobacteriocina B2, y pueden poseer uno o dos puentes disulfuro.

La conservación de los péptidos es más evidente en la región hidrofílica del N-terminal catiónico, denominada "caja pediocina", que contiene la secuencia de amino ácidos YGNGVXCXXXVXV, (en el que X es cualquier aminoácido), y se cree que es para facilitar la unión a la superficie. Por otro lado, los dominios C-terminales, que se encuentran después de una región bisagra, son menos conservados y se cree que determinan el espectro antimicrobiano contra *Listeria*, se han utilizado como base para la formación de otras tres subdivisiones. Los indicios de que estos sitios terminales representan distintos módulos se han confirmado por la aparición de una clase híbrida de bacteriocinas del subgrupo II-a, que confirmó que la especificidad del objetivo es determinada por el dominio C-terminal.

La clase II-C (anteriormente clase V) son bacteriocinas agrupadas con base a su N- y C-terminales que se unen covalentemente, lo que resulta en una estructura cíclica. Aunque relativamente son pocas las bacteriocinas de la clase II-C que han sido identificadas, se han propuesto dos subdivisiones designadas subclase c-I (que comprende la enterocina AS48 y la circularina A que no proviene de las BAL) y la subclase c-II (la cual incluye a la gassericina A, reutericina 6 y labutirivibriocina AR10 producida por *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10 (Kalmokoff *et al.* 2003), que se realiza con base al porcentaje de aminoácidos presente en la secuencia de identidad.

Para las bacteriocinas que ocupan la clase II-D, se combinan las bacteriocinas lineales que tienen en su estructura uno o varios péptidos. En algunos casos, han sido subdivididas sobre la base de secuencias líder.

Sin embargo, como se había mencionado anteriormente, en el artículo de Cotter (*et al.* 2013), aparecen modificaciones a las subclasificaciones. Para el caso en particular del grupo II aparece una quinta sub clasificación II-E, en donde se

incluye a los péptidos sin modificación ribosómica que cuentan con una región C-terminal rica en serina, del tipo sideróforo.

Proteínas líticas (bacteriolisinas)

Son proteínas que anteriormente abarcaban la clase III de las bacteriocinas, las cuales son proteínas grandes, termolábiles, con actividad antimicrobiana. Su mecanismo de acción es distinto al de las bacteriocinas, funcionan a través de la lisis de las células sensibles, pues inducen la hidrólisis de la pared celular por medio de una catálisis (Figura 12). Estas proteínas son también estructuras modulares y tienen un dominio catalítico en el N-terminal que muestra homología con las endopeptidasas, y un extremo C-terminal que probablemente representa su sitio de reconocimiento.

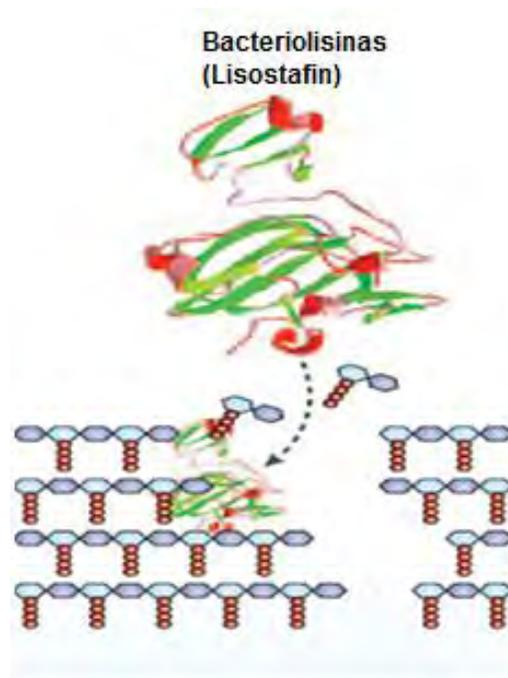


Figura 12. Modo de acción de las bacteriolisinas provenientes de las BAL (imagen tomada y modificada de Cotter *et al.* 2005).

6. Pared celular

Un componente clave de la envoltura bacteriana es la pared celular conformada por peptidoglucano (PG). Este es un polímero de azúcares-aminoácidos, que forma una matriz covalente que rodea la membrana citoplásmica y constituye el componente principal del esqueleto de la pared celular lo suficientemente poroso para permitir la difusión de los metabolitos a la membrana plasmática (Blackman *et al.* 1998; Tsuyoshi y Thomas 2011). Se construye a partir de matrices de hebras de polisacáridos conectadas por enlaces cruzados covalentes entre restos peptídicos adjuntos, que lleva a la formación de una red continua que rodea la célula (Figura 13) (Tsuyoshi y Thomas 2011).

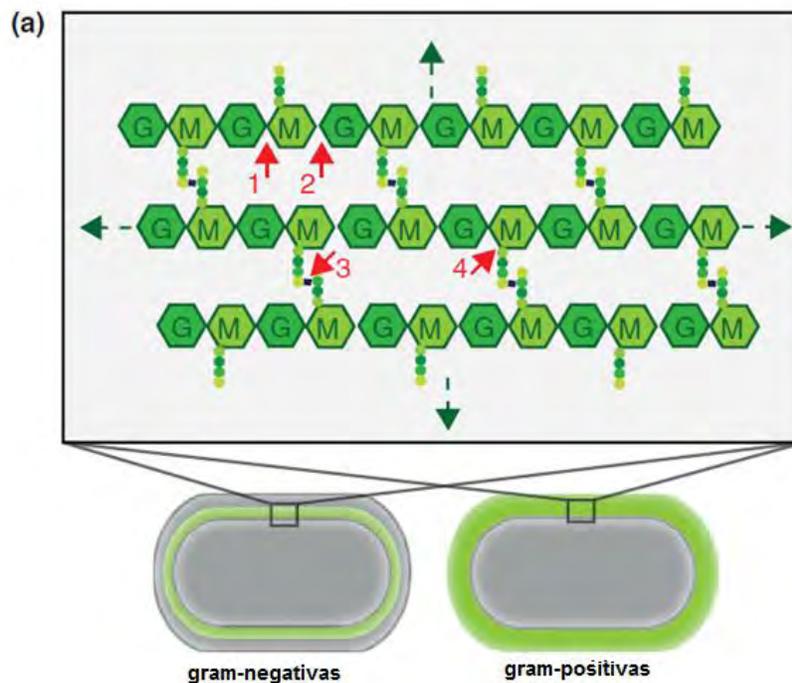


Figura 13. Representación esquemática del peptidoglucano de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. (M) ácido N-acetilmurámico, (G) N-acetilglucosamina. Los puntos de colores representan la unión de los péptidos. Las flechas rojas indican los sitios de corte de las peptidoglucano hidrolasas: 1) N-acetilglucosaminidasas, 2) N-acetilmuramidasa y transglucosidasas, 3) endopeptidasas, y 4) amidasa (Tomado y modificado de Tsuyoshi y Thomas, 2011).

A su vez, el polisacárido se conforma por unidades alternadas de ácido-1,6-anhidro-N-acetilmurámico (conocido como ácido N-acetilmurámico, MurNAc) y β -1,4-N-acetilglucosamina (conocido como N-acetilglucosamina, GlcNAc) (Figura 14) (Vollmer *et al.* 2008).

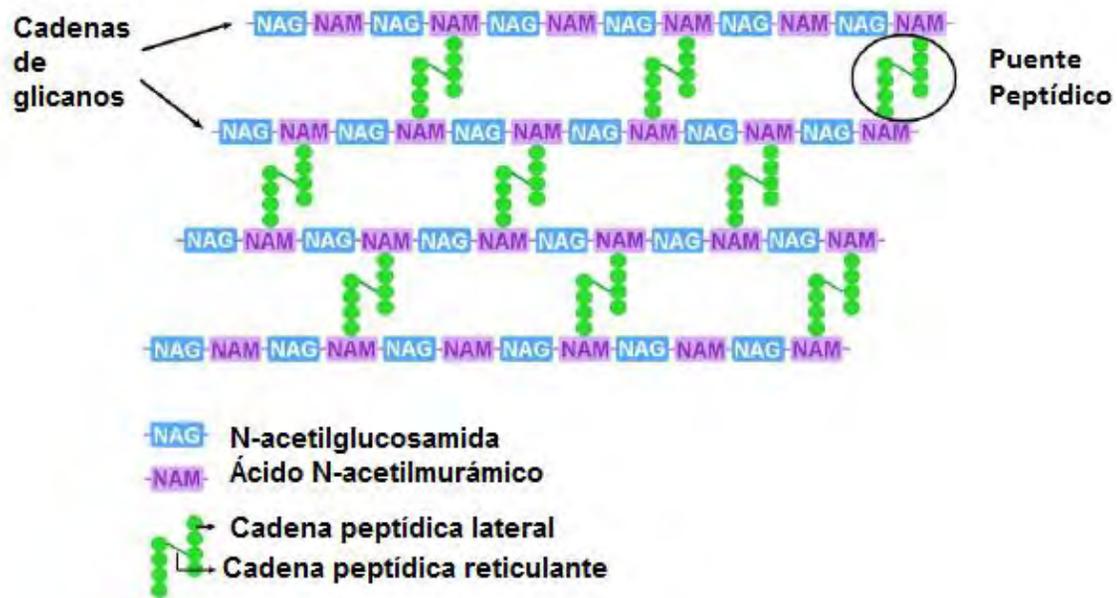


Figura 14. Hebras largas y fuertes de peptidoglucano que constan de N-acetilglucosamina y subunidades de ácido N-acetilmurámico que se encuentran unidas por puentes peptídicos cortos y flexibles (Tomado y modificado de Maliničová *et al.* 2010).

El peptidoglucano de la pared celular bacteriana es un elemento clave para la estructura, la replicación y la supervivencia de las células, el crecimiento bacteriano está íntimamente ligado a la expansión y la división de la capa de peptidoglucano. Dado que las lesiones en la matriz pueden conducir a la lisis celular, estos procesos deben ocurrir sin interrumpir la integridad de la red de peptidoglucano.

En las bacterias Gram-positivas, el peptidoglucano forma múltiples capas y presenta una conformación tridimensional que origina una pared celular muy fuerte y rígida. Puede tener asociados otro tipo de constituyentes, como ácidos teicoicos y lipoteicoicos y/o polisacáridos (Figura 15). Por el contrario, el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias Gram-negativas constituye una sola capa delgada y no contiene ácidos teicoicos ni lipoteicoicos (Maliničová *et al.* 2010).

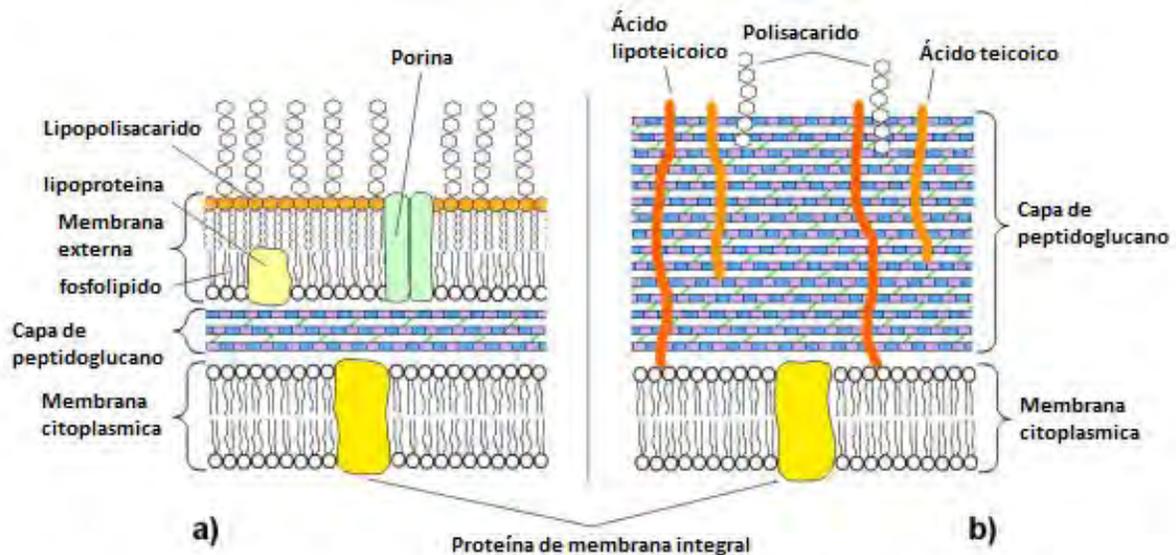


Figura 15. Estructura esquemática de la envoltura celular en a) Gram-negativas, b) Gram-positivas (Tomado y modificado de Maliničová *et al.* 2010).

7. Peptidoglucano hidrolasas

Las enzimas involucradas en la ruptura de los enlaces covalentes que se presentan en el peptidoglucano son las peptidoglucano hidrolasas (PGH) (Murray *et al.* 2006; Tsuyoshi y Thomas, 2011). Las PGH están involucradas en diferentes funciones celulares, participan en el desarrollo de la pared celular bacteriana y su regulación, como: el crecimiento, división celular, reproducción, recambio de la pared, así como en los diferentes fenómenos de lisis y muerte celular (Lortal *et al.* 1997; Smith *et al.* 2000; Maliničová *et al.* 2010). Es difícil asignar una función distinta a una PGH por varias razones. En primer lugar, muchas bacterias poseen un alto número de hidrolasas y que parecen tener funciones redundantes (Smith *et al.* 2000). En segundo lugar, una hidrolasa puede tener más de una función. Por ejemplo, *E. coli* tiene cinco N-acetilmuramil-L-alaninamidases (más adelante se explicará su función), seis transglicosilasas unidas a la membrana y tres endopeptidasas. Todas ellas parecen contribuir (en grado variable) a la escisión del septo durante la división celular para permitir la separación de las células hijas (Heidrich *et al.* 2002). Además, estas hidrolasas son responsables de la liberación de productos de rotación de peptidoglucano durante el crecimiento celular (Lortal *et al.* 1997). Por otra parte, estas hidrolasas son responsables de inducir autólisis bajo ciertas condiciones (Vollmer *et al.* 2008). Cabe señalar que hay ejemplos de hidrolasas por cada enlace glucosídico y amida del peptidoglucano, pero no se encuentran todos los casos en todas las especies. A diferencia de las bacteriocinas la clasificación de las PGH no es complicada. Turner (2004) clasifica a estas enzimas en dos grupos: autolisinas y endolisinas dependiendo de su procedencia.

7.1. Clasificaciones

Endolisinas

Son hidrolasas de mureína codificadas por fagos que rompen el peptidoglucano bacteriano en la fase terminal del ciclo de reproducción del fago. Su acción es fuertemente regulada por holinas, en la detección de la membrana, y por la conversión de su estado inactivo a activo. Las endolisinas también se conocen como lisozimas de fagos, lisinas, enzimas muralíticas o mureolíticas. Se caracterizan de manera uniforme por tener como objetivo directo los enlaces en la capa de peptidoglucano de la pared celular bacteriana; el resultado de esta actividad es la degradación de la capa rígida de mureína y la liberación de los fagos recién ensamblados a modo de lisis (Loessner, 2005).

Una cuestión importante es la regulación de la lisis mediada por las endolisinas de las células huésped infectadas, y esto ha sido intensamente estudiado empleando como prototipos el fago λ , y otros fagos de *E. coli*. La mayoría de los fagos, logran a tiempo la lisis por el uso correcto de dos proteínas la endolisina y las holinas, las cuales son pequeñas proteínas hidrófobas que son codificadas por el fago y se insertan en la membrana citoplásmica. Dentro de un tiempo programado genéticamente, y la activación de un evento específico (una concentración crítica de la holina y la despolarización parcial de la membrana), los monómeros de holina se ensamblan instantáneamente para formar oligómeros y forman lesiones en las membranas o agujeros por los que las endolisinas pueden pasar. El resultado es la lisis celular súbita (Figura 16). Las holinas también pueden ser reguladas por inhibidores, que interfieren con el ensamble intermembranal de la holina. Si está presente, el inhibidor se transcribe por lo general a partir del mismo marco de lectura como la holina, pero dispone de un dominio transmembranal funcionalmente defectuoso (Vukov *et al.* 2003; Loessner, 2005).

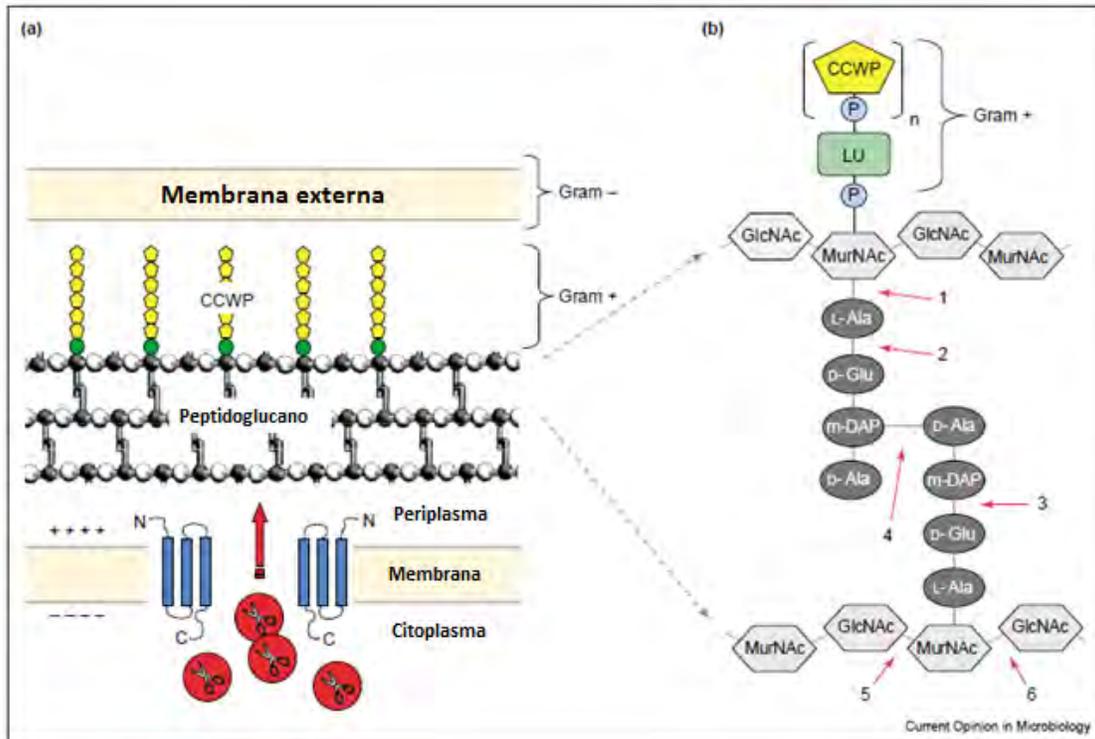


Figura 16. La estructura de la pared celular, endolisinas (color rojo) y holinas (color azul). (a) Representación esquemática de la pared celular bacteriana, y de cómo las endolisinas de fagos obtiene el acceso a su sustrato. (b) Representa la estructura un peptidoglucano (Tomado y modificado de Loessner, 2005).

Las endolisinas más conocidas carecen de una secuencia de péptido señal, por lo cual dependen enteramente de las holinas afines para su llegada al peptidoglucano. Sin embargo, en diferentes estudios se ha revelado la presencia de un péptido señal en un fago de *Oenococcus oeni* (Sao-Jose *et al.* 2000) y en el fago de *Lactobacillus plantarum* Øg1e (Kakikawa *et al.* 2002). La endolisina de este último fago requiere de la función del sistema de secreción (denominado Sec) del hospedero para su exportación, el cual muestra una estructura modular de al menos dos dominios distintos (Loessner, 2005), que están formados por un N-terminal que es un dominio catalítico (CD) y un C-terminal que es un sitio de unión

a la pared celular (CBD), correspondientes a sus dos funciones básicas: la hidrólisis enzimática y reconocimiento de sustrato (Figura 17). En algunos casos, se ha reportado que las lisinas pueden tener más de un CD y un CBD, por ejemplo una lisina del fago plyG de *Bacillus*, ha demostrado tener un CD y dos dominios de unión separados, un CDB y un dominio de unión de esporas (SBD) (Yang *et al.* 2014).



Figura 17. Estructura esquemática de las endolisinas también conocidas como lisinas (Tomado y modificado de Yang *et al.* 2014).

Aunque un CDB es necesario para la mayoría de las endolisinas, la autólisis de algunas endolisinas para eliminar el CDB puede resultar en una mejor actividad lítica sin pérdida de especificidad. Un buen ejemplo es el CD de lisina Ply187 (N-terminal de 157 aminoácidos) tiene una actividad de N-acetilmuramil-L-alanina-amidasa mayor que la lisina completa (Yang *et al.* 2014).

Generalmente, el CD tiene acceso y corta específicamente los principales enlaces en el peptidoglucano mediante el reconocimiento específico de los CDB. Los sustratos de los CBD son moléculas únicas y conservadas en las paredes de las células que son esenciales para la viabilidad bacteriana, los cuales son normalmente polisacáridos neutros que están restringidos a determinadas especies o incluso cepas (Yang *et al.* 2014).

Estas enzimas son altamente activas contra bacterias susceptibles como Gram-positivas, pues son capaces de digerir las paredes celulares de las bacterias incluyendo patógenos Gram-positivos resistentes a múltiples fármacos. Por lo tanto, se han considerado como “enzibióticos” con aplicaciones importantes en la medicina y la biotecnología (Fischetti *et al.* 2006).

Es importante señalar que en células Gram-positivas, las endolisinas también pueden actuar como exolisinas porque el peptidoglucano es, en la mayoría de los casos, accesible desde el exterior (Figura 18). Este no es el caso para las células Gram-negativas, en el que la presencia de la membrana externa impide eficazmente el acceso de las enzimas líticas hidrofílicas. Sin embargo, cuando la capa de lipopolisacárido se interrumpe (por el ácido etilendiaminotetraacético, detergentes, etc) las células inmediatamente se vuelven sensibles a las hidrolasas externas (Yang *et al.* 2014).

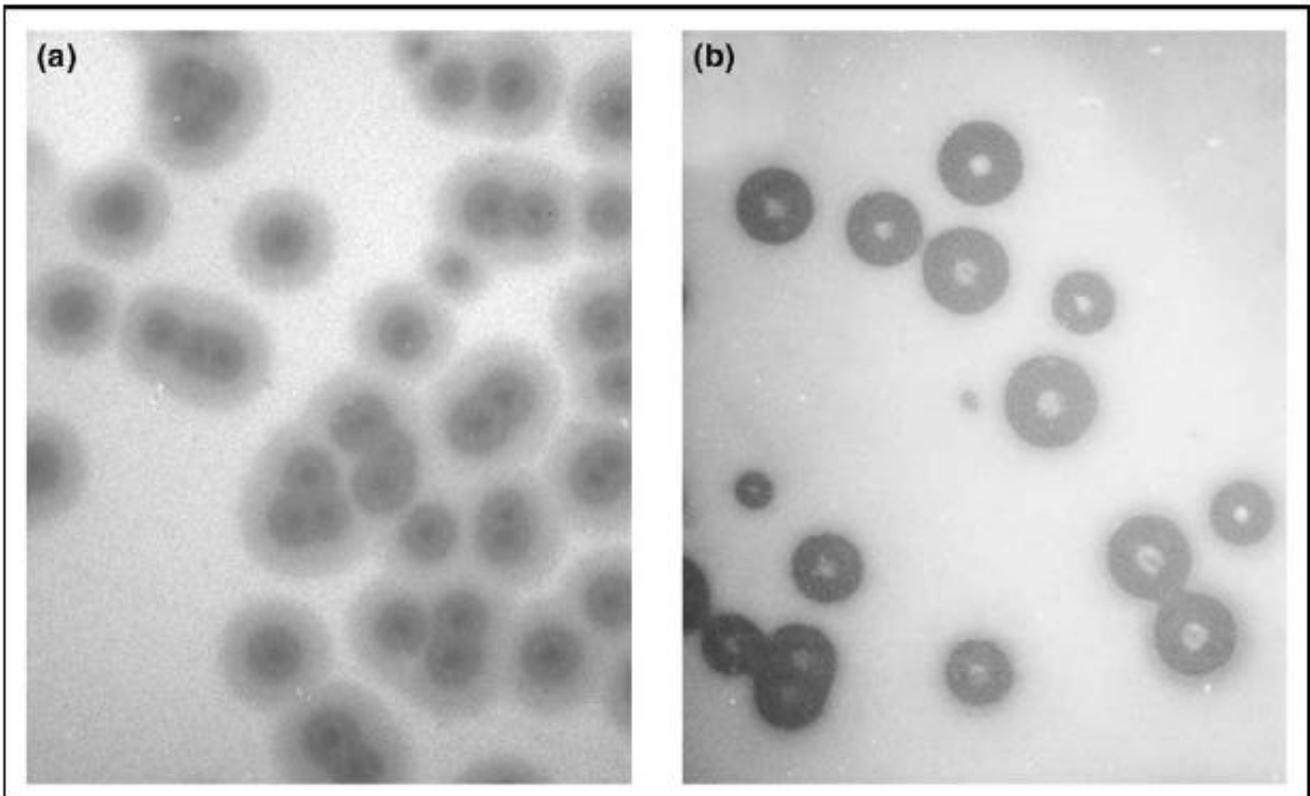


Figura 18. Evidencia macroscópica de la actividad de las endolisinas (a) Acción del fago A511 sobre *L. monocytogenes* en una capa de agar suave. Son claramente visibles las zonas de lisis causadas por la liberación del fago A511, donde aparentemente se extiende desde el centro de la placa e hidroliza las células desde afuera. En (b), colonias de *E. coli* que producen el fago A511 se trataron con cloroformo, para liberar el fago, posteriormente se cubrieron con células de *L.monocytogenes* en agar suave. Se puede observar como el fago se extiende desde las células de *E. coli* e hidroliza las células de *L. monocytogenes*, lo que provoca grandes zonas de lisis alrededor de las colonias de *E. coli*. Claramente, las endolisinas pueden actuar como exolisinas cuando el sustrato de la pared celular es accesible, como en la mayoría de las bacterias Gram-positivas (Tomado y modificado de Loessner, 2005).

Peptidasas

Estas enzimas rompen enlaces amida entre aminoácidos en el peptidoglucano o sus fragmentos solubles (Shockman y Höltje, 1994; Höltje, 1995). Dependiendo de su especificidad, las peptidasas se pueden subclasificar como: exopeptidasas y endopeptidasas (Tabla 4) (Rao *et al.* 1996).

Exopeptidasas

Aminopeptidasas

Catalizan la liberación de un aminoácido en el grupo amino terminal de una proteína o péptido. Las aminopeptidasas se producen en una amplia variedad de especies microbianas, incluyendo bacterias y hongos. Debido a que los sustratos que emplean son distintos podemos hacer una diferenciación entre ellas, por ejemplo la aminopeptidasa de *E. coli* que es una proteasa de 400 kDa, tiene un pH óptimo entre 7.5 a 10.5 y requiere Mg^{2+} o Mn^{2+} para la actividad. La aminopeptidasa de *Bacillus licheniformis* tiene un peso molecular de 34 kDa y contiene Zn^{2+} en su sitio activo, así mismo se potencializa la actividad por el ion Co^{2+} (Rao *et al.* 1996). Mas del 90% de las aminopeptidasas se encuentran en fracciones solubles repartidas entre el citoplasma, pared celular de Gram-positivas, debido a que se encuentran involucradas en el metabolismo de péptidos exógenos, en el movimiento de proteínas intracelulares y en la eliminación de proteínas anormales (Vendramin, 2013)

Carboxipeptidasas

Catalizan la liberación de un aminoácido en el grupo carboxilo terminal de una proteína o péptido. Dependiendo de su sitio catalítico se dividen en serin carboxipeptidasas, metalocarboxipeptidasas y cisteína carboxipeptidasas. Algunas carboxipeptidasas son similares en cuanto a las especificaciones de su sustrato como lo es el caso de las metalocarboxipeptidasas de *Penicillium* spp. *Saccharomyces* spp. y *Aspergillus* spp. pero se diferencian en otras propiedades

como el pH, estabilidad, peso molecular y el efecto de los inhibidores (Rao *et al*, 1996).

Tabla 4. Clasificación de Peptidasas. Los círculos abiertos representan los residuos de aminoácidos en la cadena del polipeptido. Los círculos negros indican el aminoácido terminal. Las flechas indican los sitios de acción de la enzima (Tomado y modificado de Rao *et al*. 1996).

Clasificación de Proteasas

Proteasa	Modo de acción	Clase de Enzima no.
Exopeptidasas		
Amino peptidasas	•↓-○-○-○-○---	3.4.11
Dipeptidil peptidasa	•-•↓-○-○-○---	3.4.14
Tripeptidil peptidasa	•-•-•↓-○-○---	3.4.14
Carboxipeptidasa	---○-○-○-○-○↓•	3.4.16-3.4.18
Serina proteasa		3.4.16
Metaloproteasa		3.4.17
Cisteina proteasa		3.4.18
Peptidil dipeptidasa	---○-○-○-○↓-••	3.4.15
Dipeptidasas	•↓-•	3.4.13
Omega peptidasas	*-•↓-○-○---	3.4.19
	---○-○-○↓-•-*	3.4.19
Endopeptidasas	----○-○-○↓-○-○-○---	3.4.21-3.4.34
Proteasa aspártica		3.4.23
Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido		3.4.99

Endopeptidasas

Son enzimas que actúan en la región intermedia de la cadena polipeptídica, a su vez el corte se puede dar de diferentes maneras por ejemplo las DD-peptidasas actúan entre dos D-aminoácidos, mientras que las LD- o DL-peptidasas rompen el enlace entre un L- y un D-aminoácido (Figura 21) (Shockman y Höltje, 1995; Smith *et al.* 2000). Las DD-endopeptidasas hidrolizan los puentes cruzados D-Ala-meso-A₂pm, que habían sido formados por la DD-transpeptidación en el peptidoglucano recién formado (Sauvage *et al.* 2008). El grupo amonio-carboxilato de la cadena lateral en el ácido diaminopimélico está en la configuración D- y es estructuralmente equivalente a la de D-alanina que sale en las reacciones de DD-trans o carboxipeptidación. Por lo tanto, la actividad de las DD-endopeptidasas puede ser considerada como la faceta inversa de las actividades de la DD-trans o carboxipeptidasa. De hecho, muchas DD-endopeptidasas pertenecen a las PBP's (por sus siglas en inglés penicillin-binding proteins) de bajo peso molecular que comparten los rasgos típicos de secuencia de las PBP's y son inhibidas por las β -lactamasas, las cuales son estructuralmente análogas a la secuencia terminal D-Ala-D-Ala en el pentapéptido donador, para una reacción de transpeptidación de peptidoglucano (Goffin y Ghuysen, 1998; Sauvage *et al.* 2008).

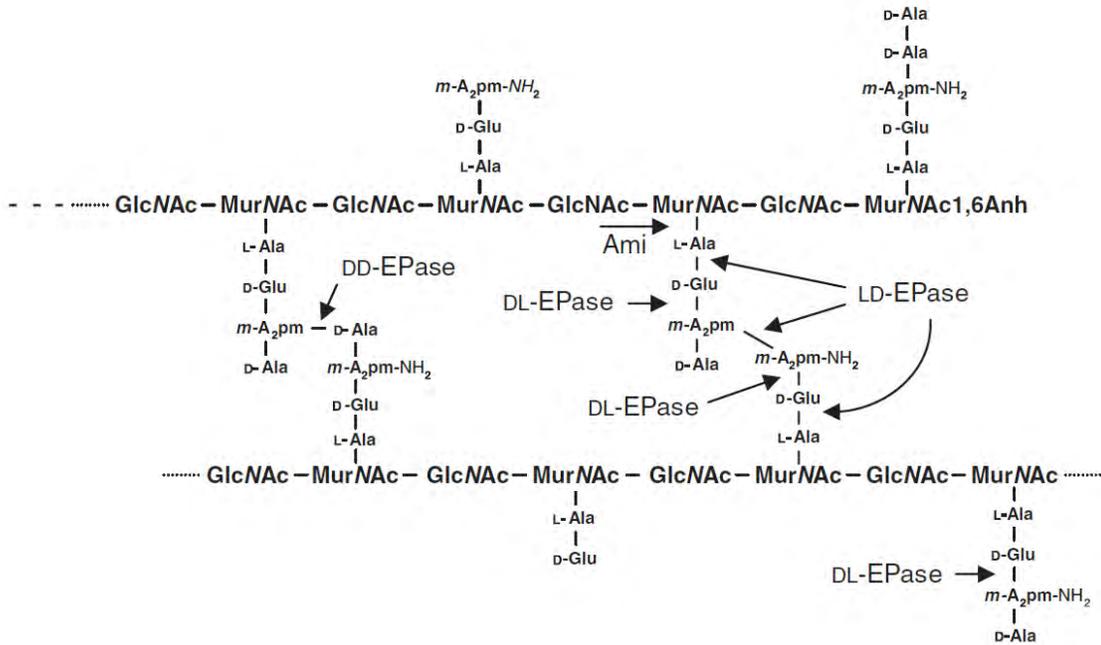


Figura 21. Endopeptidasas (DD-EPase, LD-EPase, DL-EPase) cortan los enlaces amida en los péptidos. Los sitios de corte para LD y DL-endopeptidasas están indicados en el dimero del péptido (en los enlaces cruzados), sin embargo estas enzimas también cuentan con sitios de corte en los péptidos monoméricos (Tomado y modificado de Vollmer *et al.* 2008).

Dos tipos de PBP se han identificado como endopeptidasas. La primera es una enzima multi-modular descrita como PBP tipo-4 (Figura 22) (Sauvage *et al.* 2008). La segunda es una enzima mono-modular desprovista de un dominio C-terminal, pero con una hélice anfipática que ancla la proteína a la membrana citoplasmática. Estas enzimas pertenecen a las PBP's del tipo-7 (Sauvage *et al.* 2008).

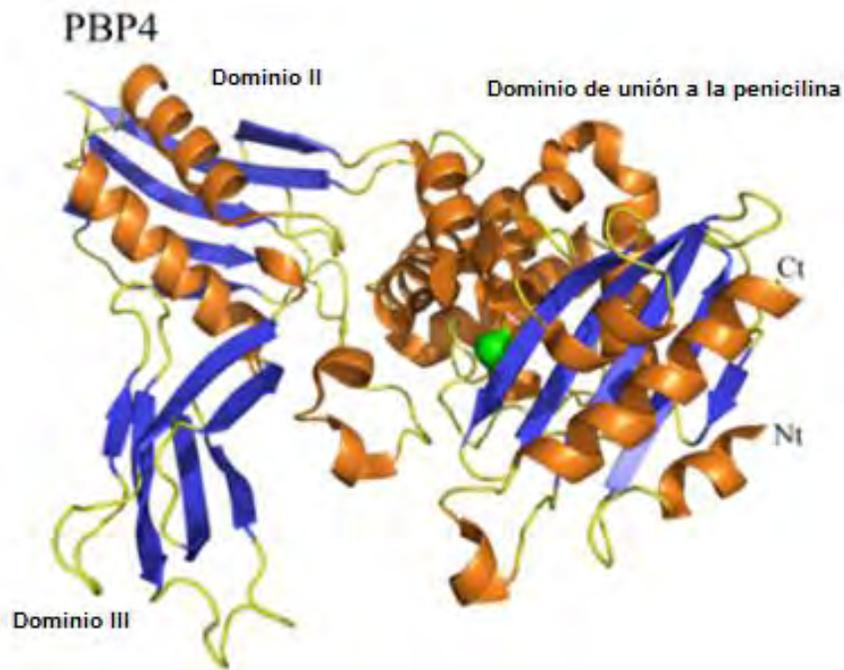


Figura 22. DD-Endopeptidasa PBP4 de *E. coli*. Este grupo de endopeptidasas comparten la misma estructura general, que se compone de tres dominios, uno de los cuales (dominio I) posee la estructura típica y el sitio activo de las PBP (Tomado y modificado de Vollmer *et al.* 2008).

Las PBP4 están vagamente asociadas con la membrana citoplasmática. Una superficie cargada positivamente aparece en el dominio II de la DD-peptidasa de *Actinomadura* R39 y en la PBP4a de *B. subtilis*, pero no en la PBP4 de *E. coli*. Se ha sugerido que esta superficie positiva podría interactuar con el ácido teicoico presente en *Bacillus* y *Actinomycetos* (Sauvage *et al.* 2007).

La PBP7 (Figura 23) es la segunda DD-endopeptidasa sensible a la penicilina en *E. coli* y se codifica por el gen *pbpG*. La PBP7 carece de actividad DD-carboxipeptidasa y está asociada a la membrana. Hidroliza el puente cruzado D-Ala-meso-A₂pm. En estudios *in vitro*, la PBP7 así como su producto de

degradación proteolítica PBP8 estabilizan y estimulan la actividad de otra hidrolasa de peptidoglucano, la transglicosilasa lítica soluble Slt70, por interacción directa proteína-proteína (Romeis y Höltje, 1994). La PBP7 carece de la hélice N-terminal y expone en la parte superior del sitio activo una protuberancia β -horquilla, que, en otro tipo de PBP7, se ha planteado la hipótesis de que sirve para anclar la proteína a la membrana plasmática (Vollmer *et al.* 2008).

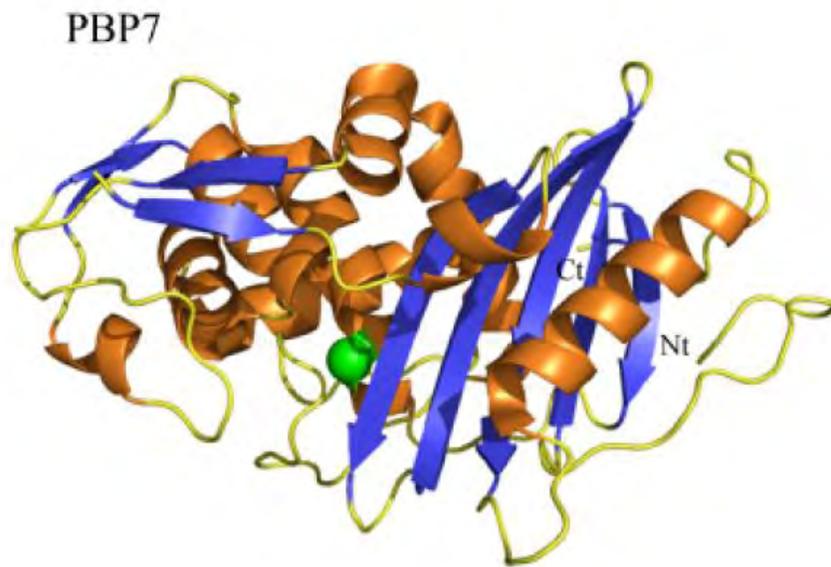


Figura 23. DD-endopeptidasa PBP7 de *Mycobacterium tuberculosis*, PDB código 2BCF. El residuo catalítico de la serina, del dominio DD-peptidasa de unión a la penicilina, se muestra como una esfera verde (Tomado y modificado de Vollmer *et al.* 2008).

También hay DD-endopeptidasas sin relación con las PBP, que no son inhibidas por los β -lactámicos. Las endopeptidasas insensibles a la penicilina denominadas MepA (Figura 24) de *E. coli* hidrolizan tanto el DD-(meso-A2pm-D-Ala) como el LD-(meso-A2pm-meso-A2pm) que son péptidos de enlaces cruzados (Keck *et al.* 1990; Engel *et al.* 1992). La enzima MepA es metalo dependiente, contiene la

triada His(113)-Asp(120)-His (211) que se une a Zn^{2+} , esencial para su actividad. Las MepA comparten la forma de su sitio activo con un gran grupo de metalopeptidasas incluyendo, a las endopeptidasas LytM (Odintsov *et al.* 2004), lisostafina y ALE-1 (Lu *et al.* 2006), las cuales cortan el puente interpeptídico de la pentaglicina en el peptidoglucano de *Staphylococcus aureus* (Bochtler *et al.* 2004).

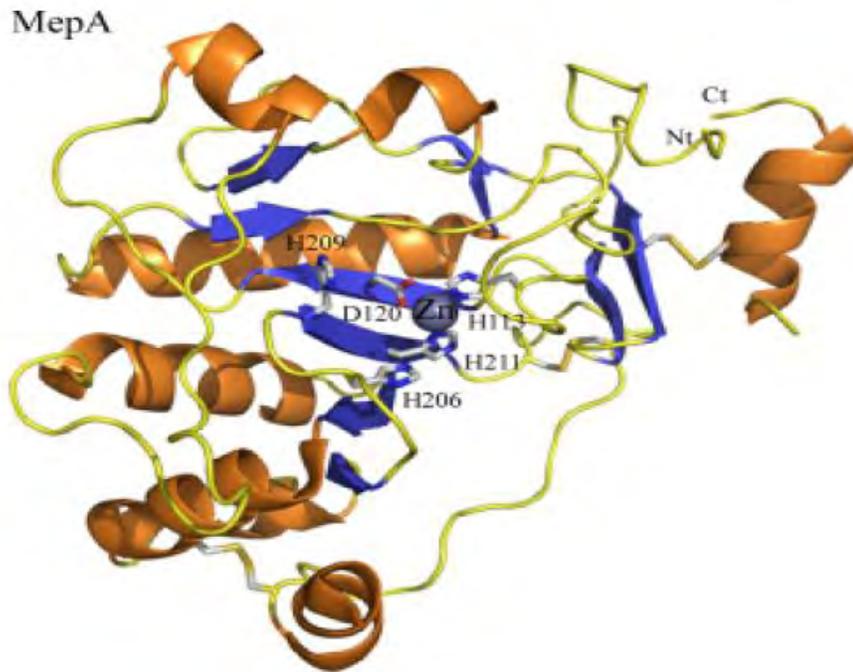


Figura 24. LD-endopeptidasa MepA (*E. coli*), PDB código 1U10, con el ion catalítico de zinc representado como una esfera azul y sus tres ligandos (His113-Asp120-His211) con los dos residuos His206 y His209 representados como tubos (Tomado y modificado de Vollmer *et al.* 2008).

Varias LD-endopeptidasas se han identificado en *B. subtilis*, dos de los cuales, CwlK y LytH, hidrolizan el enlace entre L-Ala (posición 1) y D-Glu (posición 2) en el peptidoglucano (Figura 21) (Fukushima *et al.* 2007). La secuencia de aminoácidos de CwlK es similar a la de la AepA (Ply500) endopeptidasa del fagoA500 de *L. monocytogenes* (Loessner *et al.* 1995) y a la carboxipeptidasa enterococcal VanY, que se requiere para la expresión de resistencia a la vancomicina. Cabe señalar que CwlK no está relacionada con la segunda LD-endopeptidasa de *B. subtilis*,

LytH, que presumiblemente corta el mismo enlace peptídico (entre L-Ala y D-Glu), y que es responsable de la alta concentración de residuos MurNAc que llevan un solo L-Ala en el peptidoglucano de las esporas de esta especie (Horsburgh *et al.* 2003).

Bacillus subtilis también tiene varias DL-endopeptidasas que cortan el enlace entre D-Glu (posición 2) y meso-A₂pm (posición 3) (Fukushima *et al.* 2006). También tiene un dominio hipotético (YqgT) de la familia I de las DL-endopeptidasas (Smith *et al.* 2000) que son enzimas dependientes de Zn²⁺ con similitud de secuencia con las endopeptidasas I de *B. sphaericus*. Esta enzima tiene ambas actividades como DL-endopeptidasa, así también como de DL-carboxipeptidasa y corta el enlace peptídico entre D-Glu y m-A₂pm en tripéptidos (L-Ala-D-Glu(γ)-meso-A₂pm)-DL carboxipeptidasa o tetrapéptidos (L-Ala- D-Glu (g)-meso-A₂pm-D-Ala) con o sin el resto adjunto GlcNAc-MurNAc (en L-Ala) (Smith *et al.* 2000).

Por otra parte, las LD-carboxipeptidasas (Figura 26) cortan los enlaces entre el m-A₂pm (posición 3) y D-Ala (posición 4) en un tetrapéptido para eliminar el residuo terminal D-Ala (Figura 25). Cabe señalar que, aunque tal actividad se ha detectado en muchas especies de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, sólo hay unas pocas enzimas que se sabe tienen esta especificidad.

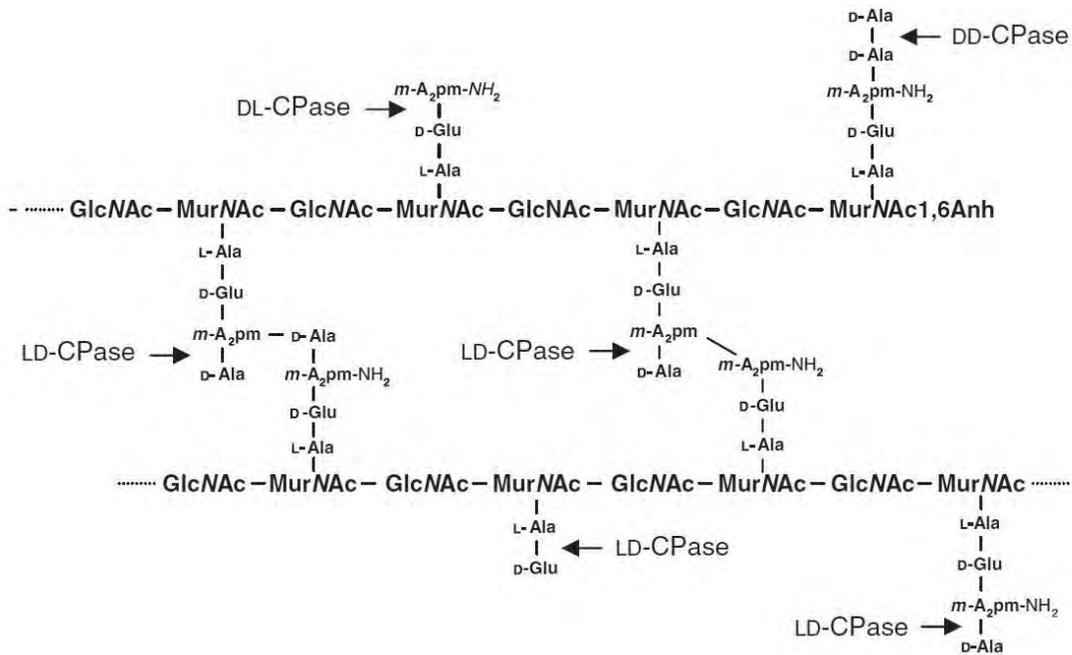


Figura 25. Carboxipeptidasas (DD-CPase, LD-CPase, DL-CPase) hidrolizan los enlaces peptídicos para remover D- o L-aminoácidos de la posición C-terminal (Tomado y modificado de Vollmer *et al.* 2008).

La LdcA proveniente de *E. coli* también es una LD-carboxipeptidasa citoplasmática, involucrada en el reciclaje de peptidoglucano y es esencial para el inicio de la fase estacionaria de crecimiento. Los sustratos de LdcA, son tetrapéptidos libres (L-Ala-D-Glu (γ)-meso-A₂pm-D-Ala), o tetrapéptidos vinculados a Mur-NAc, GlcNAc-MurNAc, GlcNAc-1,6-anhidroMurNAc o UDP-MurNAc (Vollmer *et al.* 2008).

Actualmente se ha logrado obtener la estructura cristalina de la LD-carboxipeptidasa de *Pseudomonas aeruginosa*, donde se puede observar que la enzima tiene una arquitectura de dos dominios con una triada catalítica conservada compuesta por Ser-His-Glu (Figura 26) (Korza y Bochtler, 2005).



Figura 26. LD-carboxipeptidasa. Cada diez residuos se señalizan por un pequeño círculo, los residuos 50, 100, 150, 200, y 250 son representados por círculos grandes. Los dominios N-terminales se encuentran de color negro, y los C-terminales están en gris. Las líneas punteadas representan los enlaces entre los dominios N- y C-terminales. Las cadenas laterales de los residuos Ser115, Glu217, y His285 se muestran en una forma que asemeja a un átomo (Tomado y modificado de Korza y Bochtler, 2005).

Por lo general, las DD-carboxipeptidasas pertenecen a las PBP del tipo-5 (figura 27) y son las más abundantes de bajo peso molecular. Son enzimas bi-modulares con un dominio de unión a penicilina de topología clásica y una hebra β -helicoidal en el dominio C-terminal esencial para el funcionamiento correcto de PBP5. Este dominio terminal se caracteriza por una hélice anfipática en su extremo, que es responsable del anclaje de la enzima a la membrana citoplasmática. La sobreproducción de PBP5 conduce a la lisis celular (Nelson y Young, 2001).

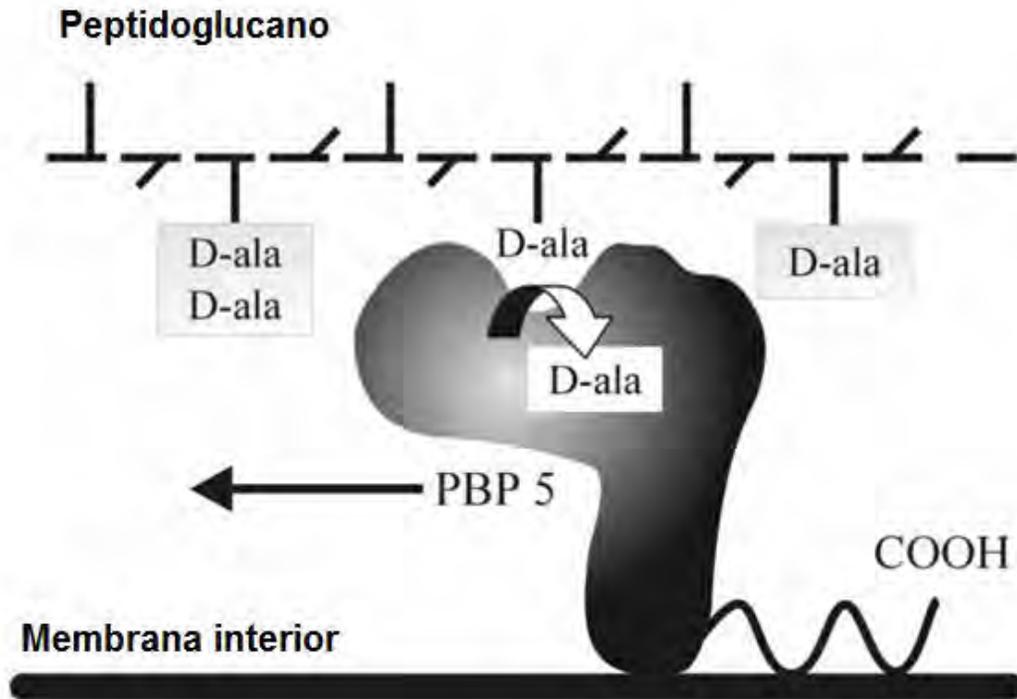


Figura 27. Estructura esquemática y orientación de PBP 5 en el periplasma de *E. coli*. La representación esquemática de PBP 5, es en forma de L invertida de color negro. El sitio activo DD-carboxipeptidasa se representa como una hendidura en la porción α -helicoidal predominante en la cabeza de la molécula. El tallo β -helicoidal está conectado a la cabeza para formar un ángulo derecho desigual, y toda la proteína está atada a la cara exterior de la membrana interna por una hélice anfipática-carboxi-terminal (línea curva). Las cadenas laterales del péptido unido a los residuos del ácido N-acetilmurámico se ilustran mediante líneas cortas que se extienden encima, por debajo o en el plano de la pared celular. El movimiento de PBP 5 se indica por medio de la flecha negra, y se observa que la proteína remueve los residuos terminales D-alanina (D-Ala) de las cadenas laterales del péptido que se extienden hacia la membrana interna (Nelson y Young, 2001).

N-acetil- β -D-muramididasas

Las N-acetil- β -D-muramididasas, denominadas también N-acetilmuramididasas, son enzimas que rompen el enlace β 1, 4-glucosídico, entre los residuos MurNAc y GlcNAc en el peptidoglucano, este enlace puede ser cortado de dos formas distintas, una de ellas por la acción de lisozimas y la otra por la acción de las transglicosilasas líticas, las cuales se describen a continuación.

Lisozimas

Las lisozimas son producidas en fagos, bacterias, hongos, vertebrados e invertebrados. Hidrolizan el enlace glucosídico, lo que resulta en un producto con un residuo terminal de la reducción de MurNAc (Figura 28) (Vollmer *et al.* 2008).

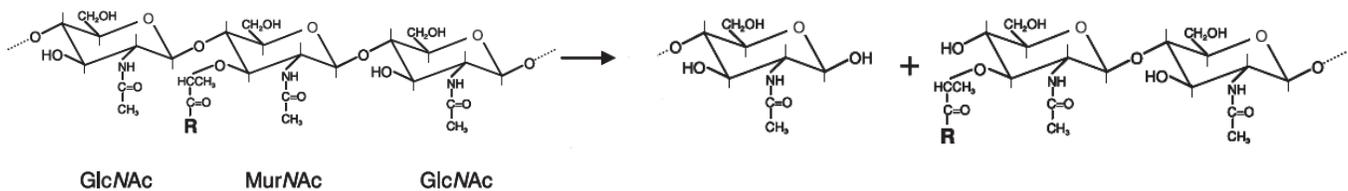


Figura 28. Ruptura del enlace glucosídico, por acción de una lisozima (Vollmer *et al.* 2008).

Aunque todos ellos cortan el enlace β 1, 4-glucosídico, algunas de estas enzimas hidrolizan la quitina [β 1,4(GlcNAc)-polímero] o el quitosano (quitina parcialmente desacetilada), o son transglicosilasas líticas.

Dentro de las lisozimas existen cuatro clases que contienen dominios con probada actividad hidrolítica contra peptidoglucano. Los prototipos de estas cuatro clases son la lisozima del huevo de la gallina o HEWL (por sus siglas en inglés), la

lisozima de clara de huevo de ganso (GEWL), lisozima del bacteriófago T4 (T4L) y la lisozima *Chalaropsis*. Posiblemente HEWL, GEWL y el fago T4L son el resultado de la evolución divergente de un ancestro común, pues a pesar de que no comparten una identidad en su secuencia estadísticamente significativa, sus estructuras tridimensionales muestran algunas similitudes intrigantes, aunque distantes. Su sitio activo se encuentra en una grieta entre dos dominios, que están conectados por una cadena larga de α -hélice. Se ha propuesto que un residuo de ácido glutámico es esencial para la catálisis del ácido en general, que se encuentra localizado en el extremo C-terminal de una α -hélice en la mitad del N-terminal de cada una de las proteínas (Vollmer *et al.* 2008).

En comparación con otras hidrolasas de peptidoglucano, hay relativamente pocas lisozimas bacterianas bien caracterizadas con una especificidad comprobada experimentalmente. Dos lisozimas autolíticas se han identificado en *Enterococcus hirae* ATCC9790 (Vollmer *et al.* 2008). Una de ellas, denominada SF muramidasa, que ha demostrado ser una exoenzima que degrada progresivamente hebras de glicanos de su extremo GlcNAc. En contraste, pesticina es una endo N-acetilmuramidasa específica como HEWL (Vollmer *et al.* 1997).

La pesticina está codificada por el gen *pst*, el cual se encuentra en conjunto con su gen de inmunidad *pim* en un pequeño plásmido de virulencia de *Yersinia pestis* pPCP1. Para el caso de la lisozima bacteriana, cellosyl, que es producida por *Streptomyces coelicolor* y pertenece a la clase de lisozimas *Chalaropsis*. A diferencia de HEWL y T4L, cellosyl exhibe una actividad de β 1,4-N-6-O-diacetilmuramidasa y es capaz de degradar el peptidoglucano *o*-acetilado presente en *S. aureus* y otros patógenos (Vollmer, 2007).

La autolisina bacteriana LytC de *S. pneumoniae* es otra N-acetilmuramidasa que pertenece a la clase de lisozimas *Chalaropsis*. Al igual que otras hidrolasas de peptidoglucano neumocócicas, LytC contiene un módulo de unión a colina medio

por el cual lleva a cabo su fijación al ácido teicoico de la pared celular, que es esencial para su actividad (Monterroso *et al.* 2005).

Transglicosilasas líticas

Las transglicosilasas líticas cortan el enlace glicosídico, β 1,4 entre el MurNAc y GlcNAc (figura 29) con una formación posterior de un anillo 1,6-anhidro en el residuo de MurNAc (Höltje *et al.* 1975).

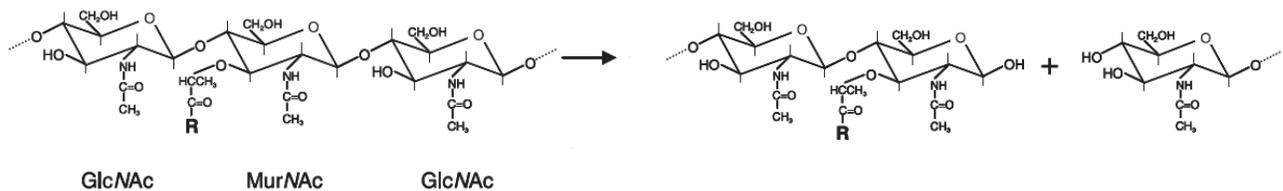


Figura 29. Ruptura del enlace glicosídico, por acción de una transglicosilasa lítica (Vollmer *et al.* 2008).

La reacción de transglicosilación intermolecular propuesta, implica un único residuo ácido catalítico, a menudo glutamato, que dona su protón para el oxígeno glicosídico entre MurNAc y GlcNAc (Thunnissen *et al.* 1994). Cortan el enlace glicosídico con una reacción de transglicosilación intermolecular, lo que resulta en la formación del anillo de 1,6-anhidro en el residuo de MurNAc del producto (Figura 30) (Vollmer *et al.* 2008).

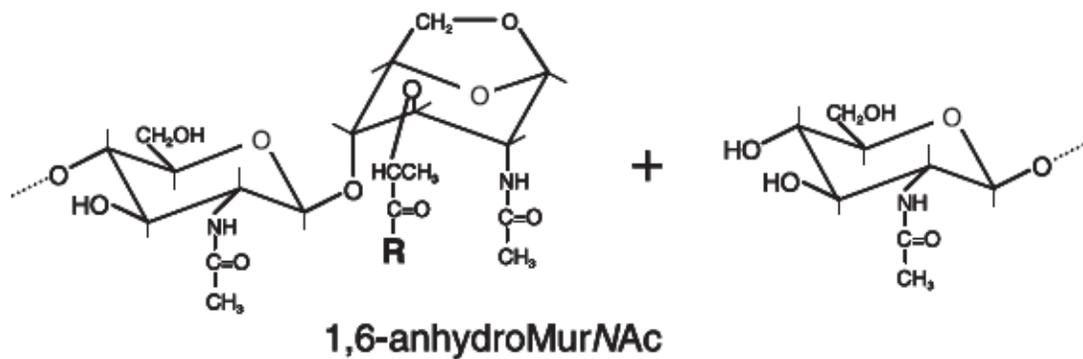


Figura 30. Esquema de la ruptura del enlace entre MurNAc y GlcNAc con la formación del anillo 1,6-anhidro en el MurNAc por medio de una reacción intermolecular del péptido R unido al residuo lactil del MurNAc (Vollmer *et al.* 2008).

El oxocarbonio resultante presumiblemente se estabiliza por el grupo N-acetamido en la posición 2 de MurNAc bajo formación de un anillo intermedio de oxazolina. La desprotonación catalítica del grupo hidroxilo en el C-6 del MurNAc por el glutamato, permite el ataque nucleofílico en C1 para formar el anillo de 1,6-anhidro. Este mecanismo concuerda con la inhibición observada de la transglicosilasa lítica unida a la membrana MltB de *P. aeruginosa* (Scheurwater *et al.* 2007).

Muchos dominios catalíticos de transglicosilasas líticas, por ejemplo la de la transglicosilasa lítica soluble Slt70 (Figura 31) de *E. coli* poseen un pliegue similar a GEWL, que también tiene un residuo de glutamato ácido en el sitio activo (Thunnissen *et al.* 1995).

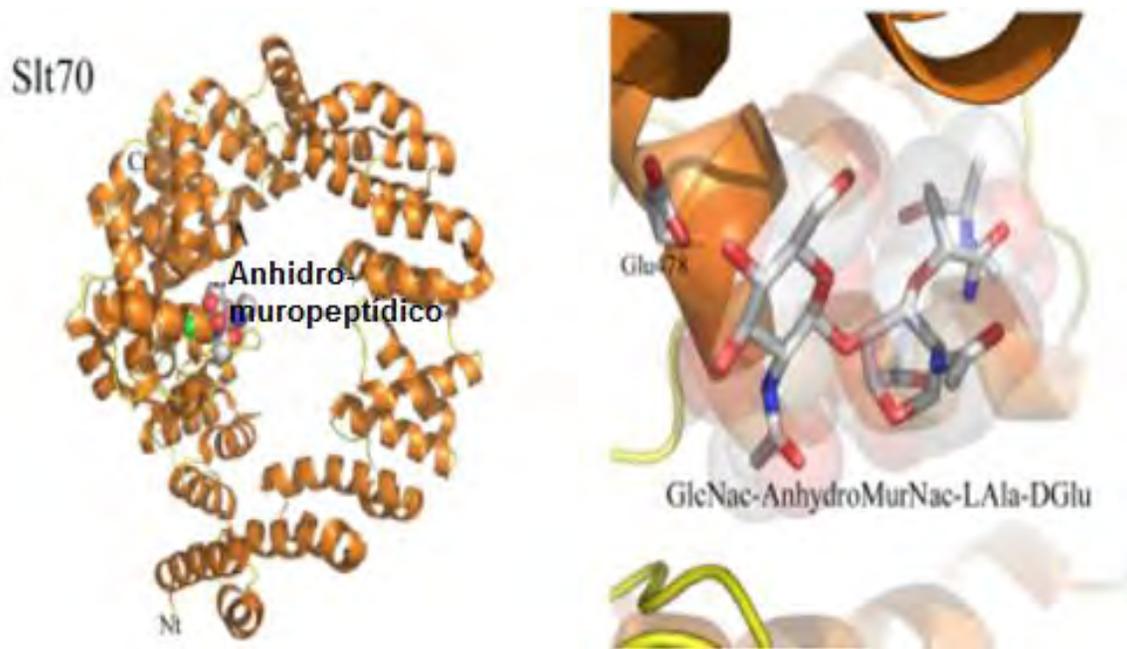


Figura 31. Transglucosilasa lítica soluble Slt70 (*E. coli*), código PBD 1QTE; del lado izquierdo, se observa el gran agujero central de la rosquilla, con un 1,6-anhidromuropeptido y el Glu478 catalítico (en verde) representado como esferas; del lado derecho, se observa un acercamiento de la vista de la hendidura catalítica, con 1,6-anhidromuropeptido y la Glu478 catalítica representada en forma de tubos (Tomado y modificado de Vollmer *et al.* 2008).

Sin embargo, hay diferencias estructurales importantes entre GEWL y las transglucosilasas líticas. El entorno del residuo catalítico del glutamato es mucho más hidrófobo en las transglucosilasas líticas, que también carecen del segundo residuo catalítico (un aspartato) presente en lisozimas, estas diferencias explican los otros mecanismos de reacción (hidrólisis vs formación del anillo intramolecular) de los dos tipos de enzimas. Además de que también difieren, en las especificidades de sustrato, las lisozimas son endo-N-acetilmuramidasa mientras que la mayoría de las transglucosilasas líticas caracterizadas muestran una actividad exo-lítica de liberación del 1,6-anhidroMurNAc que contiene unidades peptídicas de disacárido de uno de los extremos finales de la cadena de glicano. Esto es consistente con las estructuras de cristal que muestra las diferencias en los arreglos de unión del sustrato. Considerando que las lisozimas acomodan un

hexasacárido en el sitio de unión al sustrato, diferentes transglicosilasas líticas tienen sitios que van de tres a seis residuos de N-acetilamino (Thunnissen *et al.* 1995). Además, las N-acetilmuramidases difieren en sus especificidades de sustrato con respecto al requisito de sustitución de péptidos para la actividad. Por ejemplo, Slt70 y las lisozimas del bacteriófago T4 sólo cortan el peptidoglucano que contienen los péptidos unidos a las cadenas de glicano, y son inactivos contra hebras de glicano no sustituidas (que carecen de los péptidos). Por otro lado, la transglicosilasa lítica unida a la membrana MltA (Figura 32) proveniente de *E. coli* y HEWL puede cortar indistintamente los enlaces de péptidos sustituidos y cadenas de glicano no sustituidas. Estas diferencias en cuanto al requisito de sustrato, indican la presencia de sitios de unión a péptidos en algunos pero no todas las N-acetilmuramidases (Vollmer *et al.* 2008).

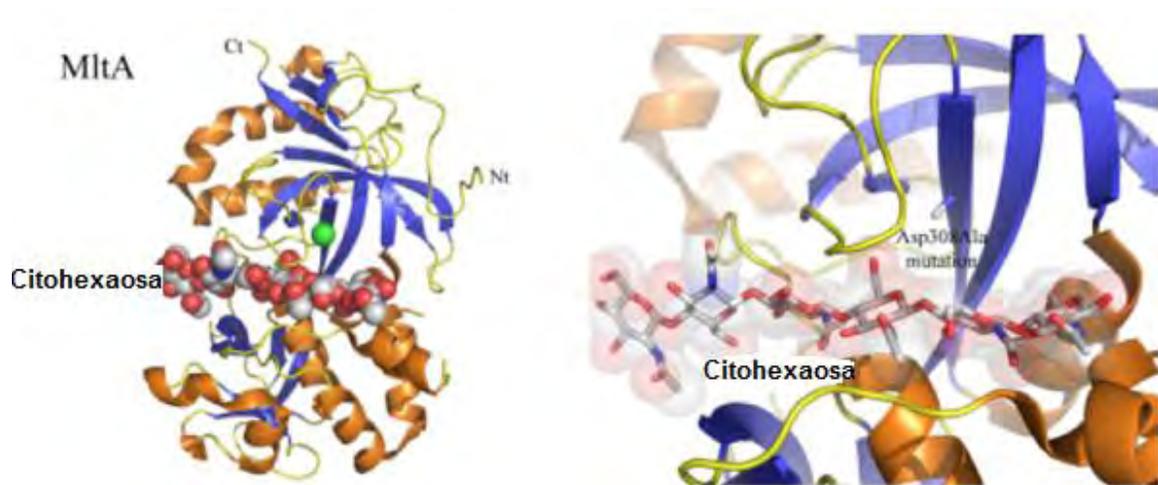


Figura 32. Transglicosilasa lítica MltA (*E. coli*), código PDB 2PI8; del lado izquierdo, se observa el enlace de la quitohexaosa de MltA-D308A mutante con la quitohexaosa que se muestra en forma de esferas y la Asp308Ala catalítica como una esfera verde; del lado derecho, se muestra la vista ampliada de la hendidura catalítica, con el hexosacárido y la Asp308Ala catalítica representada como tubos (Tomado y modificado de Vollmer *et al.* 2008).

N-acetil- β -D-glucosaminidasas

Las endo-N-acetil- β -D-glucosaminidasas, también llamadas N-acetilglucosaminidasas, hidrolizan el enlace glicosídico entre los residuos de N-acetil- β -D-glucosamina y monosacáridos adyacentes en diferentes sustratos de oligosacáridos incluyendo el peptidoglucano, la quitina y los N-glicanos (Karamanos, 1997). La mayoría de estas enzimas tienen un dominio catalítico que pertenece a la familia de proteínas (Pfam) 01832. Las N-acetilglucosaminidasas a menudo tienen uno o varios CBD por ejemplo, el dominio LysM.

Lactococcus lactis tiene tres N-acetilglucosaminidasas conocidas (AcmA, AcmB y AcmC) y una hipotética (AcmD), dos de los cuales (AcmA y AcmD) tienen tres dominios de peptidoglucano vinculante LysM (Huard *et al.* 2003, 2004; Steen *et al.* 2005). Curiosamente, la presencia de tres dominios LysM ha demostrado ser el número óptimo para la actividad de AcmA porque las proteínas variantes con menos o más dominios LysM, eran menos activas. De manera similar, la N-acetilglucosaminidasa AtlA de *Enterococcus faecalis* tiene seis dominios LysM necesarios para su actividad enzimática óptima (Eckert *et al.* 2006), mientras que LytB de *S. pneumoniae* tiene 18 repeticiones imperfectas que sirven de unión a los residuos de fosfocolina del ácido teicoico. Otras N-acetilglucosaminidasas identificadas y caracterizados son AtlA de *S. aureus* (una enzima bifuncional que también contiene un dominio N-acetilglucosaminidasa), Acd de *Clostridium difficile* y LytD y LytG de *B. subtilis* (Vollmer *et al.* 2008).

En contraste con las endo-N-acetilglucosaminidasas mencionadas anteriormente, que hidrolizan los enlaces glicosídicos en el peptidoglucano de alto peso molecular, la N-acetilglucosaminidasa citoplásmica NagZ de *E. coli*, utiliza como sustrato el disacárido, GlcNAc-1,6-anhidroMurNAc, que es un intermedio intracelular de la vía del reciclaje de peptidoglucano (Vötsch y Templin, 2000).

8. Tecnologías para su producción

Una parte muy importante respecto al uso de las bacteriocinas y PGH como alternativa a conservadores en alimentos fermentados radica en la forma en que se llevará a cabo su obtención.

Actualmente la producción se encuentra limitada a laboratorios de investigación y desarrollo debido al alto costo y bajos rendimientos de producción (Parente y Ricciardi, 1999) lo que lo convierte en un proceso poco rentable para las industria. Los factores relacionados directamente a esta producción son los sistemas de expresión (bacterias a emplear) y los sistemas de recuperación.

Por ejemplo, para producir AmiB a partir de una cepa de *E. coli* BL21 (DE3), es necesario inocularlo en un medio rico que contenga sulfato de kanamicina e incubarlo a 37°C, una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial se debe inducir la producción de la AmiB empleando IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) como inductor de la enzima en estudio. Posterior a 3 h de incubación (tiempo en el que se incrementa la concentración de la proteína de interés), se deben recolectar las células por medio de centrifugación. Hasta esta parte termina el sistema de expresión y comienza el sistema de recuperación (Scheurwater *et al.* 2007).

Para extraer la AmiB es necesario hacer lavados y resuspender las células en amortiguador de fosfato de sodio a pH 8.0, junto con un coctel de inhibidores de RNasa I y DNasa I y llevar a una incubación en hielo antes de ser sometidas a sonicación. Una vez lisadas las células se deben de centrifugar, la fracción soluble debe ser colectada e incubada nuevamente con una solución especial de Ni²⁺ en agitación suave a 4°C (Scheurwater *et al.* 2007).

Como se puede observar en el ejemplo anterior el proceso de producción y purificación requiere de varios subprocesos y cuidados como: la temperatura, equipos y reactivos empleados además que solo aplica para una sola N-acetilmuramil-L-alanina-amidasa producida en laboratorio y por último pero no

menos importante, surge el cuestionamiento ¿De dónde proviene la AmiB? Cualquier autoridad centraría su preocupación al saber que la producción específicamente proviene de una *E. coli*, sin embargo no debería ser impedimento para llevar a cabo la producción industrial a gran escala, ya que sólo es necesario invertir en desarrollo tecnológico que garantice que en ningún momento se pone en peligro la producción del producto (Gestión del riesgo).

Se debe realizar un escalamiento a planta piloto, generar procedimientos normalizados que controlen su producción (SOP'S), realizar una gestión de riesgo para verificar los puntos críticos de control (de vital importancia si se desea utilizar una cepa de *E. coli*) (EUA FDA, ICHQ9 2006) y de esta manera mitigar el riesgo inherente al proceso, capacitar y calificar al personal involucrado en el proceso, llevar a cabo una validación de las metodologías analíticas que se empleen para su identificación y cuantificación como puede ser el uso de HPLC (high pressure liquid chromatography) y por último solicitar los registros pertinentes a las agencias regulatorias de cada uno de los países donde se pretenda comercializar (EUA FDA, CFR 21 parte 110 2016).

9. Adyuvantes

Al hablar de PGH y bacteriocinas, técnicamente estamos hablando de productos de bacterias que ya existen en los alimentos. Por ejemplo, los cultivos iniciadores que son agregados intencionalmente para contribuir con la vida de anaquel o mejorar los atributos organolépticos entre otros (Leroy *et al.* 2004).

La parte fundamental al retomar el tema de los adyuvantes recae en la presentación en la que se adicionarán a las matrices de alimentos y que desencadenan las siguientes preguntas:

¿En qué momento se deben adicionar?

- ¿Se deben mezclar con el cultivo iniciador?, ¿La presentación debe ser en polvo o líquido? Para tratar de responder estas preguntas, se plantean diversas técnicas físicas que podrían ayudar a la aplicación de los metabolitos de interés.

Secado por aspersión.

El proceso de secado por aspersión implica la inyección del medio por un sistema que permite la pulverización a alta velocidad a temperaturas de hasta 200°C, que conduce a la formación de gránulos. En consecuencia, este procedimiento da lugar a la exposición del medio de secado a altas temperaturas durante un corto tiempo, lo que puede ser perjudicial para la integridad de las células bacterianas vivas y de sus productos proteicos. Durante el secado por pulverización, las células bacterianas se encuentran con estrés térmico, deshidratación, exposición al oxígeno y el estrés osmótico (Meng *et al.* 2008).

Varios estudios han informado sobre el rendimiento de una variedad de probióticos durante el secado por aspersión y, en general, la tasa de supervivencia de los cultivos probióticos depende de factores tales como la cepa probiótica utilizada, sin embargo cuando se habla del material proteínico, como bacteriocinas o PGH, hay que hacer varias consideraciones como la susceptibilidad ante las temperaturas altas, aun cuando es un tiempo mínimo de contacto con el aire caliente se debe medir la actividad de estas después del proceso de secado (Meng *et al.* 2008).

Liofilización.

La liofilización es un proceso que se ha empleado durante años en alimentos y especialmente en probióticos. Se basa en una rápida sublimación del agua presente en la matriz y ocurre básicamente en tres fases, un congelamiento por lo general a temperaturas por debajo de los -190°C, un secado primario y uno secundario bajo una alta presión (Meng *et al.* 2008). Como las condiciones de procesamiento asociadas con la liofilización son más leves que el secado por aspersión, se obtienen tasas de supervivencia probióticas superiores en polvos liofilizados (Meng *et al.* 2008).

Se ha demostrado que alrededor del 60-70% de las células que sobrevivieron a la etapa de congelación pueden vivir a través de la etapa de deshidratación. Durante la congelación, la formación de hielo extracelular provoca un aumento de la osmolalidad extracelular, por lo que tan pronto como el hielo se forma fuera de la célula en solución, la célula comienza a deshidratar (Meng *et al.* 2008).

También se ha observado que la eliminación del agua unida de las células bacterianas durante el secado conduce al daño de las proteínas superficiales, la pared celular y la membrana celular. El agua unida juega un papel importante en la estabilización de la integridad estructural y funcional de las macromoléculas biológicas a través de diferentes tipos de unión débil, incluyendo los presentes en la pared celular y la membrana celular (Meng *et al.* 2008). Por lo tanto, para poder emplear este método es necesario llevar a cabo estudios específicos de cada uno de los distintos productos proteínicos que estamos evaluando emplear y buscar de esta manera una mejor alternativa que nos permita tener el mejor rendimiento. Ambos métodos revisados anteriormente requieren de un estudio tecnológico arduo durante el proceso de escalamiento de laboratorio a planta para llevarse a cabo.

Una alternativa que es ampliamente usada de una manera común es el uso de distintas soluciones amortiguadoras. Es decir, se pueden tener proteínas perfectamente estables y conservando su actividad y solo se requiere evaluar la solución amortiguadora que se desea emplear y muy importante mantener la temperatura baja (4°C aproximadamente) (Scheurwater *et al.* 2007).

10. Normatividad

Como sabemos las bacteriocinas y PGH no se encuentran como un producto de uso común en el mercado, pues aunque ya existen distintas investigaciones en cuanto a su uso y obtención no se producen todavía en forma económicamente viable. Sin embargo, las bases para su aprobación por parte de las distintas agencias regulatorias alrededor del mundo ya han sido sentadas.

La nisina es una bacteriocina que se puede adquirir en el mercado a través de varias empresas como FERBERA®, BRENNTAG®, Sigma-Aldrich® entre otros. Para fines de este trabajo nos enfocaremos en el producto de la empresa Sigma-Aldrich®, el cual se oferta como: “Nisin from *Lactococcus lactis*” a la cual podemos acceder a la hoja de seguridad donde viene listado la descripción del mismo, número de CAS (1414-45-5) y los test que sirven para su identificación.

Esta información indica que el producto ya cuenta con los permisos necesarios para ser vendido, pero si esto es cierto ¿De qué tipo de producto estamos hablando? Bueno, para poder dar una solución a esta pregunta recurrimos a la página oficial de la FAO, nos dirigimos a la base de datos de las especificaciones más recientes para aditivos alimentarios realizadas por el Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) el cual como se menciona en la página de internet “es un comité científico internacional de expertos administrado conjuntamente por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Ha venido reuniéndose desde 1956, inicialmente para evaluar la inocuidad de los aditivos alimentarios”. Esto quiere decir que normativamente la Nisina es identificada como un aditivo alimentario y por ende debe de regirse con la legislación vigente de cada país para el uso de aditivos en alimentos.

En la monografía número 14 del año 2013 para la Nisina que aparece en la FAO aparece la siguiente información:

- Definición: donde se expone el tipo de proceso de obtención de la Nisina. De que microorganismo proviene. Proceso de extracción, purificación, formula química, formula estructural, peso molecular, y actividad en unidades internacionales (IU)
- Descripción: apariencia del producto
- Usos: tipo de uso en alimentos: “conservador antimicrobiano”
- Características: se da una descripción de los resultados de los ensayos, por ejemplo: solubilidad, actividad, pureza y muy importante los criterios microbiológicos con los que se debe cumplir

- *Salmonella*: Ausente en 25 g
- Coliformes totales: No más de 30 UFC/g
- *Escherichia coli*: Ausente en 25 g
- Pruebas: la identificación de la bacteriocina por medio de estabilidad en una solución ácida y en una solución alcalina y las pruebas para determinar su pureza
- Ensayo: en este apartado se da la descripción detallada de los métodos analíticos que emplean para las características del producto.

Como se puede observar, si se desea iniciar con el registro de algún tipo de bacteriocina o PGH es necesario realizar los pasos anteriores, como mínimo, para poder solicitar una evaluación por parte de las autoridades o en este caso de la JECFA.

11. Conclusiones

El desarrollo del presente trabajo ha tenido como punto de origen un problema que actualmente esta siendo cada vez más cuestionado por las personas y científicos del mundo: el uso de conservadores químicos dentro de los alimentos que consumimos.

Por tal motivo, surgió la pregunta ¿Es posible reemplazarlos? La respuesta a esta pregunta la encontramos dentro de la propia historia, pues como se pudo constatar, a través del tiempo se han empleado distintos medios de conservación, entre ellos la fermentación.

Gracias a los avances de la biotecnología se ha podido comprender lo que ocurre en una fermentación, del papel de las bacterias en la generación de las propiedades organolépticas de los alimentos fermentados y que estas bacterias, denominadas BAL, inhiben el crecimiento de otros microorganismos que causan deterioro a los alimentos y daño a nuestra salud.

El estudio de los metabolitos producidos por las BAL lleva al descubrimiento y estudio a fondo de las bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas. Las primeras formadas por péptidos pequeños estables al calor, con una clasificación compleja, producidas por un gran número de bacterias, que las producen direccionadas principalmente a la formación de poros en la membrana celular. Por otro lado, las peptidoglucano hidrolasas, enzimas de un tamaño mayor respecto a las bacteriocinas y que están direccionadas a la ruptura de la pared celular cuentan con una clasificación más sencilla, sin embargo estas son sensibles a temperaturas altas. Para ambas se detallaron estructuras, clasificaciones, sustratos, ejemplos de cepas productoras, todo para poder tener un panorama amplio de uso de las mismas y prepararnos para la siguiente etapa: su producción. Ambas son reportadas con procedimientos complejos de obtención debido a la

necesidad específica de sustratos necesarios por las cepas microbianas para sintetizarlas y métodos complejos de purificación. Incluso se explora la posibilidad de emplear cepas genéticamente modificadas que no tienen denominación GRAS y eventualemente al realizar un proceso de gestión de riesgo como es solicitado por las agencias regulatorias

El proceso de purificación de la bacteriocina o peptidogucano hidrolasa llevan un precio muy alto, pues los sistemas utilizados por la industria, como en el caso de los probióticos, consisten en la liofilización y el secado por aspersion que pueden llegar a dañar las estructuras proteínicas, por lo cual la opción mas viable seria utilizar soluciones amortiguadoras y controlar su temperatura. Esta alternativa la podemos emplear debido a que durante el proceso de identificación y purificación en laboratorio se caracteriza el tipo de estructura, si es estable a la temperatura, el rango de estabilidad de pH y la actividad de la misma.

Tras lo visto anteriormente la respuesta a la pregunta ¿Es posible remplazar los conservadores químicos? Es Sí. La naturaleza ofrece las herramientas para hacerlo (bacteriocinas y PGH) y la ciencia y el desarrollo tecnológico proporciona información para su utilización. Sin embargo, aun falta un largo camino por recorrer en investigación direccionada a un escalamiento de proceso a gran escala (evaluar actividad en matrices de alimentos, métodos de purificación en planta). México, aún no cuenta con los recursos necesarios para iniciarse por parte de las empresas de alimentos en gran parte por la poca difusión de los materiales de investigación disponibles y el poco apoyo gubernamental, sin embargo, las recientes investigaciones hechas por organizaciones como la FAO posiblemente generen el cambio que se necesita.

12. Referencias

- Alvarado, C., Chacón, Z., Otoniel, J., Guerrero, B., Lopez, G. (2007). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal. Su uso como cultivo iniciador. *Revista Científica FCV-Luz*, 3, 301-308.
- Barbosa-Cánovas, V.G., Pothakamury, R.U., Palou, E. (1998). Conservación no termica de alimentos, (pp. 217-226, 228-230, 234-236). México: Editorial Acribia.
- Bernhardt, T.G. & de Boer, P.A. (2003). The Escherichia coli amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Molecular Microbiol*, 48, 1171–1182.
- Blackman, S.A., Smith T.J, Foster S.J. (1998). The role of autolysins during vegetative growth of *Bacillus subtilis* 168. *Microbiology*, 144, 73–82.
- Blanco, S., Delahaye, P., Franegas, N. (2006). Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. *Revista Facultad de Agronomía (Maracay) Venezuela*, 32, 131-144.
- Bochtler, M., Odintsov, S.G., Marcyjaniak, M., Sabala, I. (2004). Similar active sites in lysostaphins and D-Ala-D-Ala metallopeptidases. *Protein Science*, 13, 854–861.
- Caprice, E., Fitzgerald, G. (1999). Food fermentation: role of microorganism and food production and preservation. *International journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 131-149.
- Caprice, E., Fitzgerald, G. (1999). Food fermentation: role of microorganism and food production and preservation. *International journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 131-149.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79, 483-499.
- Cheng, X., Zhang, X., Pflugrath, J.W. & Studier F.W. (1994). The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 4034–4038.
- Cotter, P.D., Hill, C. & Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews. Microbiology*, 3, 777-788.
- Cotter, P.D., Hill, C. & Ross, R.P. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics?. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(2), 95-105.
- Courtin, P., Miranda, G., Guillot, A. (2006). Peptidoglycan structure analysis of *Lactococcus lactis* reveals the presence of an L,D-carboxypeptidase involved in peptidoglycan maturation. *Journal of Bacteriology*, 188, 5293–5298.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations,” *Review International Dairy Journal*, 14, 273-285.

- DeVuyst, L. & Vandame, E.J. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. 1 edition. (pp. 91-109, 125). London: Blackie Academic and Professional.
- Drider, D. & Rebuffat, S. (2011). Prokaryotic Antimicrobial Peptide: from genes to Applications, Genetics and Applications. 1 edition. (pp. 29-53). U.S.A: Springer.
- Dziarski, R. & Gupta, D. (2006). The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biology*, 7, 232.
- Eckert, C., Lecerf, M., Dubost, L., Arthur, M. & Mesnage, S. (2006). Functional analysis of AtlA, the major N-acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 188, 8513–8519.
- Ekinci, F. & Gurel, M. (2007). Effect of Using Propionic Acid Bacteria as an Adjunct Culture in Yogurt Production. *Journal Dairy Science*, 91, 892-899.
- Engel, H., Van Leeuwen, A., Dijkstra, A. & Keck, W. (1992). Enzymatic preparation of 1,6-anhydromuropeptides by immobilized murein hydrolases from *Escherichia coli* fused to staphylococcal protein A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 772–783.
- Fischetti, V.A. (2006). Using phage lytic enzymes to control pathogenic bacteria. *BMC Oral Health*, 6(Suppl.1): S16. Doi: 10.1186/1472-6831-6-S1-S16.
- Foster, S.J. (1994). Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of *Staphylococcus aureus* 8325/ 4. *Journal of Bacteriology*, 177, 5723–5725.
- Fukushima, T., Yao, Y., Kitajima, T., Yamamoto, H. & Sekiguchi, J. (2007). Characterization of new L,D-endopeptidase gene product CwlK (previous YcdD) that hydrolyzes peptidoglycan in *Bacillus subtilis*. *Molecular genetics and genomics*, 278, 371–383.
- Fukushima, T., Afkham, A., Kurosawa, S., Tanabe, T., Yamamoto, H. & Sekiguchi, J. (2006). A new D,L-endopeptidase gene product, YojL (renamed CwlS), plays a role in cell separation with LytE and LytF in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188, 5541–5550.
- Ghasemi, M., Najfpour, G., Rahimnejad, M., Beigi, P., Sedighi, M., Hashemiyeh, B. Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8. 081-084.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R., Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.
- García, I. (2013). Peptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis que para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Bioquímicas.
- García, M., Revah, S., & Gómez, L. (1998). Productos lácteos. En *Biología Alimentaria*. México: Limusa Noriega Editores.
- Goffin, C. & Ghuyssen, J.M. (1998). Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 1079–1093.
- Gordon, M.D. & O'Brien, L.C. (2006). Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 152, 3239-3244.

- Gopal, R., Altaf, Md., Naveena, B., Venkateshwar, M. & VijayKumar, E. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation- A review. *Biotechnology Advances*, 26 (1), 22-24.
- Heidrich, C., Templin, M.F., Ursinus, A. (2001). Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 41, 167–178.
- Heidrich, C., Ursinus, A., Berger, J., Schwarz, H. & Höltje, J.V. (2002). Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184, 6093–6099.
- Hernández-Mendoza, A., Robles, J.V., Angulo, J., De la Cruz, J., García, S.H. (2007). Preparation of a whey-bases probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. *Journal Food Technology, Biotechnological*, 45, 27-31.
- Hill, C., Okeeffe, T. & Ross, P. (2002). Antimicrobial factors produced by lactic acid bacteria. *Encyclopedia of Food Sciences and nutrition*, 14, 273-285.
- Hui, Y.H., Guerrero, I., Rosmini, M. (2006). *Ciencia y Tecnología de Carnes*, (pp. 521-562). México: Editorial Limusa.
- Höltje, J.V. & Tomasz, A. (1975). Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in pneumococcus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72, 1690–1694.
- Höltje, J.V. (1995). From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 164, 243–254.
- Horsburgh, G.J., Atrih, A. & Foster, S.J. (2003). Characterization of LytH, a differentiation-associated peptidoglycan hydrolase of *Bacillus subtilis* involved in endospore cortex maturation. *Journal of Bacteriology*, 185, 3813–3820.
- Huard, C., Miranda, G., Wessner, F., Bolotin, A., Hansen, J., Foster, S.J. & Chapot-Chartier, MP. (2003). Characterization of AcmB, an N-acetylglucosaminidase autolysin from *Lactococcus lactis*. *Microbiology*, 149, 695–705.
- Huard, C., Miranda, G., Redko, Y., Wessner, F., Foster, S.J. & Chapot-Chartier, M.P. (2004). Analysis of the peptidoglycan hydrolase complement of *Lactococcus lactis*: identification of a third N-acetylglucosaminidase, AcmC. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3493–3499.
- Jacobs, C., Joris, B., Jamin, M. (1995). AmpD, essential for both beta-lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Molecular Microbiology*, 15, 553–559.
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt, *LWT- Food Science and Technology*, 39, 1221–1227.
- Kakikawa, M., Yokoi, K.J., Kimoto, H., Nakano, M., Kawasaki, K., Taketo, A., Kodaira, K. (2002). Molecular analysis of the lysis protein Lys encoded by *Lactobacillus plantarum* phage phig1e. *Gene*, 299, 227-234.
- Karamanos, Y. (1997). Endo-N-acetyl-beta-D-glucosaminidases and their potential substrates: structure/function relationships. *Research in Microbiology*, 148, 661–671.

- Keck, W., Van Leeuwen, A.M., Huber, M. & Goodell, E.W. (1990). Cloning and characterization of *mepA*, the structural gene of the penicillin-insensitive murein endopeptidase from *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 4, 209–219.
- Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O. & Kok, J. (2003). Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1589-1597.
- Korndorfer, I.P., Danzer, J., Schmelcher, M., Zimmer, M., Skerra, A. & Loessner, M.J. (2006). The crystal structure of the bacteriophage PSA endolysin reveals a unique fold responsible for specific recognition of *Listeria* cell walls. *Journal of Molecular Biology*, 364, 678–689.
- Korza, H.J. & Bochtler, M. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* LD carboxypeptidase, a serine peptidase with a Ser-His-Glu triad and a nucleophilic elbow. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 40802–40812.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I. & 148 other authors (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249-256.
- Liepinsh, E., Genereux, C., Dehareng, D., Joris, B. & Otting, G. (2003). NMR structure of *Citrobacter freundii* AmpD, comparison with bacteriophage T7 lysozyme and homology with PGRP domains. *Journal of Molecular Biology*, 327, 833–842.
- Lin, T & Chang, M. (2007). Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chemistry*, 100, 1419–1423.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic Acid Bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15 (2), 67-78.
- Lortal, S., Valence, F., Bizet, C. and Maubois, J.L. (1997). Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 *Lactobacillus* species. *Research in Microbiology*, 148, 461-474.
- Loessner, J.M. (2005). Bacteriophage endolysins — current state of research and applications. *Current Opinion in Microbiology*, 8, 480–487.
- Low, L.Y., Yang, C., Perego, M., Osterman, A. & Liddington, R.C. (2005). Structure and lytic activity of a *Bacillus anthracis* prophage endolysin. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 35433–35439.
- Lu, J.Z., Fujiwara, T., Komatsuzawa, H., Sugai, M. & Sakon, J. (2006). Cell wall-targeting domain of glycylglycine endopeptidase distinguishes among peptidoglycan cross-bridges. *The Journal of Biological Chemistry*, 281: 549–558.
- Ly, M.H., Covarrubias-Cervantes, M., Dury-Brun C., Bordet, S., Voilley, A., Le, T.M., Belin, J.-M., Wache, Y. (2008). Retention of aroma compounds by acid lactic bacteria in models food media. *Food hydrocolloids*, 22, 211-217.
- Magnusson, J. (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. Ph. D. dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences. (pp. 1-22)
- Maliničová, L., Píknová, M., Pristaš, P. & Javorský, P. (2010). Peptidoglycan hydrolases as novel tool for anti-enterococcal therapy. Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Šoltésovej 4-6, 04001 Košice, Slovakia

- Meng, X., Satnton, C., Fitzgerald, G., Daly, C., Ross, R. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, 106, 1406-1416.
- Messens, W. & De Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 31-43.
- Moreira, M., Abraham, A. & Antoni, G. (2000). Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at sub-optimal temperature. *Journal Dairy Science*, 83, 395-400.
- Moreno, M. & Polo, M. (2008). Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. *Food microbiology*, 25, 875-881.
- Monterroso, B., Lopez-Zumel, C., Garcia, J.L., Saiz, J.L., Garcia, P., Campillo, N.E. & Menendez, M. (2005). Unravelling the structure of the pneumococcal autolytic lysozyme. *Biochemical Journal*, 391, 41-49.
- Murray, R.P., Rosenthal, S.K. & Pfäuer, A.M. (2006). *Microbiologia medica*, (pp. 11-47). España: Elsevier.
- Nelson, D.E. & Young, K.D. (2001). Contributions of PBP 5 and DD-carboxypeptidase penicillin binding proteins to maintenance of cell shape in *Escherichia coli*. *Jornal of Bacteriology*, 183, 3055-3064.
- Odintsov, S.G., Sabala, I., Marcyjaniak, M. & Bochtler, M. (2004). Latent LytM at 1.3A resolution. *Journal of Molecular Biology*, 335, 775-785.
- Ostlie, H.M., Vegarud, G. & Langsrud, T. (2007). Autolysis of propionibacteria: detection of auto-lytic enzymes by renaturing SDS-PAGE and additional buffer studies. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 167-174.
- O'Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84, 593-604.
- Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.*, 21, 465-499.
- Panesar, P., Kennedy, J.F., Gandhi, D., Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production a review. *Food Chemistry*, 105, 1-14.
- Parente, E., Ricciardi, A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 628-638.
- Páres, R., Juárez A. (2002). *Bioquímica de los microorganismos*, (pp. 74-95, 115-130). 2da Edición, Barcelona España: Editorial Reverté.
- Ponting, C.P., Aravind, L., Schultz, J., Bork, P. & Koonin, E.V. (1999). Eukaryotic signalling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. *Journal of Molecular Biology*, 289, 729-745.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62, 597-635.

- Reedy, G., Altaf Md., Naveena, B.J., Venkateshwar, M., Kumar, E. (2007). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation a review. *Biotechnology advances*, 32, 456-463.
- Reis J, Paula A, Casarotti S. (2012). Lactic Acid Bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*. 4: 124-140.
- Riley, M.A. & Wertz, J.E. (2002). Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review of Microbiology*, 56, 117-137.
- Rodriguez, J., Martinez, M.I., Horn, N., Dodd, H.M. (2003). Review Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 101-116.
- Rojan, P., Anisha, G., Madhavan, K. & Pandey, A. (2009). Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnology Advances*, 27(2), 145–152.
- Romeis, T. & Holtje, J-V. (1994). Penicillin-binding protein 7/8 of *Escherichia coli* is a DD-endopeptidase. *European Journal of Biochemistry*, 224, 597–604.
- Ross, P., Morgan, S.Y., HILL, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present y future. *International Journal of Food Microbiolog*, 79, 3-16.
- Ruiz-Larrea, F., Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Navarro, L., Díez, L., Cauré, C.B., Zarazaga, M., & Torres, C. (2007). Bacteriocins for wine microbiological control and reduction of SO₂ levels. *Office Internacional de la Vigneeet du vin. Bulletin-revue internationales (Bulletin deof the OIV)*, 80, 445-457.
- Saeed, M., Ali Khan, W., Shabbir, A., Khan, M., Randhawa, M., Yasmin, I. (2014). Bacteriocins as a natural antimicrobial agent in food preservation: A review. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 24, 244-255.
- Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A., (2012). *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Fuctional Aspects*, (pp 2-14, 286-311). 4th Ed., U.S.A: Marcel Dekker.
- Sao-Jose, C., Parreira, R., Vieira, G., Santos, MA. (2000). The N-terminalregion of the *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 lysinbehaves as a bona fide signal peptide in *Escherichia coli* andas a cis-inhibitory element, preventing lytic activity onoenococcal cells. *Journal of Bacteriology*, 182, 5823-5831.
- Sauvage, E., Duez, C., Herman, R. (2007). Crystal structure of the *Bacillus subtilis* penicillin-binding protein 4a, and its complex with a peptidoglycan mimetic peptide. *Journal of Molecular Biology*, 371, 528–539.
- Sauvage, E., Charlier, P., Terrak, M. & Ayala, J.A. (2008). The penicillinbinding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 234–258.
- Savadogo, A., Ouattara, A.T., Bassole, I., Traore, A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria - a mini review. *African Journal of Biotechnology*, 5, 678-683.
- Shene, C. & Bravo, S. (2006). Whey fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* for exopolisaccharide production in continuous culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 10, 1006-1015.

- Scheurwater, E., Reid, C.W. & Clarke, A.J. (2007). Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(4), 586-91.
- Scheurwater, E., Pfeffer, M.J., Clarke, J.A. (2007). Production and purification of the bacterial autolysin N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase B from *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expression and Purification*, 56, 128–137.
- Shockman, G.D. & Höltje, J.V. (1994). Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. Ghuyssen, J-M. & Hakenbeck, R. (Eds), *Bacterial Cell Wall* (pp. 131–166). Amsterdam: Elsevier.
- Serna, L., & Rodriguez, S. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico. Estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 1, 55-65.
- Smith, T.J., Blackman, S.A. & Foster, S.J. (1996). Peptidoglycan hydrolases of *Bacillus subtilis* 168. *Microbial Drug Resistance*, 2, 113-118.
- Smith, T.J., Blackman, S.A. & Foster, S.J. (2000). Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzyme with multiple functions. *Microbiology*, 146, 249-262.
- Steen, A., Buist, G., Horsburgh, G.J., Venema, G., Kuipers, O.P., Foster, S.J. & Kok, J. (2005). AcmA of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning. *The FEBS Journal*, 272, 2854–2868.
- Stiles, M. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 331-345.
- Thunnissen, A.M., Dijkstra, A.J., Kalk, K.H., Rozeboom, H.J., Engel, H., Keck, W. & Dijkstra, B.W. (1994) Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 367, 750–753.
- Thunnissen, A.M., Isaacs, N.W. & Dijkstra, B.W. (1995). The catalytic domain of a bacterial lytic transglycosylase defines a novel class of lysozymes. *Proteins*, 22, 245–258.
- Tsuyoshi, U. & Thomas, G.B. (2011). More than just lysins: peptidoglycan hydrolases tailor the cell wall. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 698–703.
- Turner, M.S., Hafner, L.M., Walsh, T. & Giffard, P.M. (2004). Identification, characterization and specificity of a cell wall lytic enzyme from *Lactobacillus fermentum* BR11. *FEM Microbiology Letters*, 238, 9-15.
- Uehara, T. & Park, J.T. (2007). An anhydro-N-acetylmuramyl-L-alanine amidase with broad specificity tethered to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189, 5634–5641.
- Vázquez, S.M., Macedo, E.M., & Carneiro, D.J. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), 64-71.
- Vendramin, A.S. (2013). Actividad proteolítica intracelular de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis que para obtener el título de Licenciado en Química de Alimentos.
- Vollmer, W., Pilsl, H., Hantke, K., Höltje, J.V. & Braun, V. (1997). Pesticin displays muramidase activity. *Journal of Bacteriology*, 179, 1580–1583.

- Vollmer, W. (2007). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 287–306.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. & Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 259–286.
- Vötsch, W. & Templin, M.F. (2000). Characterization of a beta-Nacetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and elucidation of its role in muropeptide recycling and beta-lactamase induction. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 39032–39038.
- Vukov, N., Moll, I., Blaesi, U., Scherer, S., Loessner, M.J. (2003). Functional regulation of the *Listeria monocytogenes* bacteriophage A118holin by an intragenic inhibitor lacking the first transmembrane domain. *Molecular Microbiology*, 48, 173-186.
- Hang, Y., Junping, Y. & Hongping, W. (2014). Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. *Frontiers in Microbiology*, 5, Article 542.
- Young R. (1992). Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiological Reviews*, 56, 430–481.
- Zhou, G.H., Xu, X.L., Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat. *Meat Science*, 86, 119-128.

Normas.

EUA FDA, CFR 21 parte 110 (2016) - “Buenas Prácticas de Fabricación, empaque o embalaje de alimentos para consumo humano” (US Food & Drug Administration - Code of Federal Regulations, Title 21, part 110, “CURRENT GOOD MANUFACTURING PRACTICE IN MANUFACTURING, PACKING, OR HOLDING HUMAN FOOD”)

Guías

EUA FDA, ICHQ9 Quality Risk Management, Guidance for Industry, June 2006

Páginas de internet

<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/es/> consultada el día 14-Abril-2017

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/nisinfromlactococcuslactis335407141445511?lang=es®ion=MX> consultada el día 14-Abril-2017

<http://ferbera.com/> consultada el día 19-Agosto-2017

<http://www.brenntag.com/latin-america/es/localidades/mexico/prd-nisina-2.jsp> 19-Agosto-2017