



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

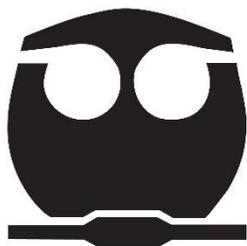
Bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas. Usos y
aplicaciones industriales potenciales.

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

JOCELYN SAMARA DOMÍNGUEZ LUNA



Ciudad Universitaria, CDMX.

2019



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: Carreño Ortiz Hugo Rubén

VOCAL: Quirasco Baruch Maricarmen

SECRETARIO: Montiel Pacheco Carmina

1° SUPLENTE: Cruces Martínez Ana Lilia

2° SUPLENTE: Juárez Arroyo Elsi Ideli

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO 312, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA,
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO. FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

ASESOR DEL TEMA

Jocelyn Samara Domínguez Luna

SUSTENTANTE

CONTENIDO

| | Pág. |
|---|-----------|
| A. Índice de Tablas..... | i |
| B. Índice de Figuras..... | iii |
| C. Siglas y abreviaturas..... | iv |
| 1. Objetivos..... | 1 |
| 1.1. Objetivo general..... | 1 |
| 1.2. Objetivos particulares..... | 1 |
| 2. Resumen..... | 2 |
| 3. Introducción..... | 3 |
| 3.1. Compuestos antimicrobianos..... | 3 |
| 3.1.1. Compuestos antimicrobianos sintetizados químicamente... | 4 |
| 3.1.2. Compuestos antimicrobianos de origen natural..... | 7 |
| 4. Bacterias ácido lácticas (BAL)..... | 10 |
| 4.1. Generalidades..... | 10 |
| 4.2. Uso de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas..... | 11 |
| 4.3. Efectos antimicrobianos de las BAL..... | 12 |
| 5. Bacteriocinas..... | 13 |
| 5.1. Características generales..... | 13 |
| 5.2. Clasificación de las bacteriocinas..... | 14 |
| 5.2.1. Bacteriocinas Clase I (Lantibióticos)..... | 14 |
| 5.2.2. Bacteriocinas Clase II (No lantibióticos)..... | 15 |
| 5.2.3. Bacteriocinas Clase III (Bacteriolisinas)..... | 16 |
| 5.3. Uso de bacteriocinas como bioconservadores..... | 18 |
| 5.4. Aplicaciones en la industria alimentaria..... | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 5.5. Aplicaciones biomédicas..... | 32 |
| 5.6. Aplicaciones en medicina veterinaria..... | 38 |
| 5.7. Aplicaciones en la industria de cosméticos y productos de cuidado personal..... | 42 |
| 5.8. Bacteriocinas de importancia industrial..... | 45 |
| 5.8.1. Nisina..... | 45 |
| 5.8.2. Pediocina PA-1..... | 47 |
| 5.8.3. Lacticina 3147..... | 48 |
| 5.8.4. Lacticina 481..... | 49 |
| 5.8.5. Sakacina P..... | 49 |
| 5.8.6. Enterocina AS-48..... | 49 |
| 5.8.7. HY 449..... | 50 |
| 6. Peptidoglucano hidrolasas (PGHs)..... | 51 |
| 6.1. Características generales..... | 51 |
| 6.2. Funciones fisiológicas..... | 53 |
| 6.3. Clasificación de las PGHs..... | 55 |
| 6.3.1. N-acetilglucosaminidasas..... | 57 |
| 6.3.2. N-acetilmuramididasas..... | 57 |
| 6.3.3. N-acetilmuramoil-L-alanina amididasas..... | 58 |
| 6.3.4. Peptidasas (Carboxipeptidasas y endopeptidasas)..... | 58 |
| 6.4. Aplicaciones en la industria alimentaria..... | 63 |
| 6.5. Aplicaciones biomédicas..... | 65 |
| 6.6. Peptidoglucano hidrolasas de importancia industrial..... | 67 |
| 6.6.1. Lisozima..... | 67 |
| 6.6.2. Lisostafina..... | 67 |
| 7. Aditivos alimentarios y su regulación en alimentos..... | 68 |
| 7.1. Aceptabilidad de un aditivo alimentario..... | 69 |
| 7.2. Evaluación de la seguridad de un aditivo..... | 70 |

| | |
|--|------------|
| 8. Aspectos regulatorios del uso de bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas..... | 71 |
| 8.1. Factores involucrados en la aprobación de bacteriocinas como aditivos..... | 75 |
| 8.2. Información requerida por la FDA..... | 77 |
| 8.3. Factores que afectan la aprobación regulatoria de cepas naturalmente productoras de bacteriocinas..... | 80 |
| 8.4. Factores que afectan la aprobación regulatoria de cepas genéticamente modificadas productoras de bacteriocinas..... | 81 |
| | |
| 9. Conclusiones..... | 84 |
| | |
| 10. Referencias..... | 87 |
| | |
| 11. Anexos..... | 100 |

A. Índice de Tablas

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Compuestos antimicrobianos sintetizados químicamente (Adaptado de Rodríguez-Sauceda 2011) | 6 |
| Tabla 2. <i>Compuestos antimicrobianos naturales de origen animal y microbiano...</i> | 9 |
| Tabla 3. Mecanismos de acción de compuestos producidos por bacterias ácido lácticas. (Adaptado de Vazquez et. al., 2009) | 12 |
| Tabla 4. Algunas bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas. (Adaptado de Monroy y Fernández, 2009) | 20 |
| Tabla 5. Ejemplos de bacteriocinas producidas por <i>Lactobacillus</i> . (Adaptado de Dallas y Hoover, 1993). | 22 |
| Tabla 6. Microorganismos de calidad alimentaria productores de bacteriocina comercialmente disponibles (Adaptado de Chikindas et. al., 2018) | 25 |
| Tabla 7. Bacteriocinas de interés en la industria de alimentos (Adaptado de Fallico et al., 2010) | 26 |
| Tabla 8. Eficacia de las bacteriocinas en alimentos: factores limitantes. (Adaptado de Gálvez et al., 2007) | 28 |
| Tabla 9. Patentes actuales que cubren el uso de la bacteriocinas alimentos | 28 |
| Tabla 10. Bacteriocinas con aplicaciones biomédicas potenciales. | 36 |
| Tabla 11. Patentes actuales que cubren el uso de bacteriocinas en tratamientos biomédicos. | 37 |
| Tabla 12. Bacteriocinas con aplicaciones potenciales en medicina veterinaria. ... | 39 |
| Tabla 13. Bacteriocinas con aplicaciones potenciales en cosméticos y productos del cuidado personal. | 44 |
| Tabla 14. Aplicaciones de Nisina en diferentes áreas de salud. (Adaptado de Shin, et al., 2016). | 46 |
| Tabla 15. Variantes naturales y por bioingeniería de nisina. (Adaptado de Shin et al., 2016) | 47 |
| Tabla 16. Funciones de las peptidoglucano hidrolasas (Adaptado de Vollmer et. al., 2008) | 54 |
| Tabla 17. Sitios de acción de las peptidoglucano hidrolasas (Vollmer et al., 2008; Layec et al., 2008) | 56 |



| | |
|---|----|
| Tabla 18. Enzimas con actividad de N-acetilglucosaminidasas | 59 |
| Tabla 19. Enzimas con actividad N-acetilmuramidasa..... | 60 |
| Tabla 20. Enzimas con actividad de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa | 61 |
| Tabla 21. Enzimas con actividad de carboxipeptidasas y endopeptidasas..... | 62 |
| Tabla 22. PGH con aplicaciones en alimentos..... | 64 |
| Tabla 23. PGH con aplicaciones biomédicas..... | 66 |
| Tabla 24. Información general solicitada por la FDA de la bacteriocina o PGH para ser evaluada como aditivo..... | 77 |



B. Índice de Figuras

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Estructura tridimensional de la bacteriocina de Clase I: nisina..... | 15 |
| Figura 2. Estructura tridimensional de la bacteriocina de Clase II: Sakacina P.... | 16 |
| Figura 3. Modo de acción de las bacteriocinas Clase I, Clase II y Bacteriolisinas. (Adaptado de Cotter et al., 2005) | 17 |
| Figura 4. Efecto bactericida de lacticina 3147 contra (A) <i>Staphylococcus aureus</i> DPC5245, (B) <i>S. aureus</i> DPC5246 y (C) <i>S. aureus</i> DPC5247. La concentración de lacticina 3147 en la suspensión bacteriana fue de 0 AU/mL (●), 2,560 AU/mL (▪) y 5,120 AU/mL (Δ) (Adaptado de Twomey et al., 2000). | 40 |
| Figura 5. Productos cosméticos que utilizan bacteriocinas como ingrediente activo. (Tomado de cellbiotechint.com) | 43 |
| Figura 6. Estructura del peptidoglucano. La parte marcada representa la subunidad tetrapéptido (monómero) de disacárido básico. (Adaptado de Vollmer et al. 2008). | 52 |
| Figura 7. Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Adapatado de Sharma et. al., 2016) | 53 |
| Figura 8. Estructura del peptidoglucano y sitios de acción de las peptidoglucano hidrolasas en la pared celular. (Adaptado de Sharma et al., 2016)..... | 55 |
| Figura 9. Sitios de acción en el peptidoglucano por (1) N-acetilglucosaminidasas, (2) lisozimas y (3) transglicosilasas líticas. (Adaptado de Vollmer et al., 2008) | 57 |



C. Siglas y Abreviaturas

| | |
|----------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| BAL | Bacterias Ácido Lácticas |
| BLIS | Bacteriocin Like Inhibitor Substances |
| CE | Comisión de Enzimas |
| COFEPRIS | Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios |
| CFR | Código de Regulaciones Federales |
| EFRV | <i>Enterococcus faecalis</i> resistente a vancomicina |
| EFSA | European Food Safety Authority |
| FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FD&C Act | Federal Food, Drug, and Cosmetic Act |
| GRAS | Generally Recognized as Safe |
| IUBMB | International Union of Biochemistry and Molecular Biology |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| JECFA | Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives |
| NAG | N-acetilglucosamina |
| NAM | N-acetilmurámico |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PGHs | Peptidoglucano hidrolasas |
| QPS | Qualified Presumption of Safety |
| RCSPS | Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios |
| SARM | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina |
| UI | Unidad Internacional |
| UE | Unión Europea |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |



1. Objetivos

1.1. Objetivo general

El objetivo de este trabajo es presentar los usos potenciales de las bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas producidas por bacterias ácido lácticas como una alternativa de compuestos antimicrobianos en diferentes aplicaciones industriales.

1.2. Objetivos particulares

- Describir bioquímicamente a las bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas.
- Presentar su clasificación, características y actividad antimicrobiana.
- Mostrar las perspectivas de aplicaciones industriales en las que se ha estudiado su posible uso.
- Describir los procesos para obtener la aprobación de las agencias regulatorias necesarias para su producción y posible uso a nivel industrial.



2. Resumen

Los compuestos antimicrobianos son una amplia variedad de sustancias o mezclas de sustancias que tienen la función de prevenir, retardar o detener las alteraciones causadas por microorganismos de una gran variedad de productos, incluidos los alimentos, medicamentos y productos de cuidado personal. Estos compuestos evitan la presencia de microorganismos que representan un riesgo para el consumidor, debido a que causan infecciones, intoxicaciones o toxiinfecciones. A pesar de que la mayor parte de los compuestos utilizados son de origen químico, existen diversos compuestos de origen natural que pueden ser utilizados como conservadores.

Dentro de estos se encuentran los compuestos producidos por microorganismos, los cuales utilizan varios mecanismos para ejercer su efecto antimicrobiano, como la producción de H_2O_2 , ácidos orgánicos y compuestos de naturaleza proteínica conocidos como bacteriocinas, BLIS (Bacteriocin Like Inhibitor Substances) y peptidoglucano hidrolasas ^{1,2}. Estos últimos compuestos se han considerado en aplicaciones biotecnológicas potenciales, debido a que presentan una gran serie de ventajas, como su origen natural, su fácil producción, su no toxicidad para células eucariotas y su amplio espectro de acción contra bacterias patógenas ³.

Por tal razón, estos compuestos se han convertido en un campo importante de investigación, por lo que el objetivo de este trabajo es revisar el concepto de bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas, su clasificación, actividad antimicrobiana, modo de acción y la importancia de la aplicación de dichos compuestos como agentes antimicrobianos naturales.

Además, mostrar las perspectivas de su aplicación como conservador comercial no sólo en alimentos, sino también aprovechar su máximo potencial en nuevas alternativas, por ejemplo en el tratamiento de algunas condiciones de salud, en cosméticos o en productos veterinarios.



3. Introducción

3.1. Compuestos antimicrobianos

Los compuestos antimicrobianos son definidos legalmente como “conservadores”, sin embargo, este término incluye también una amplia variedad de compuestos que tienen la función de conservar las propiedades químicas de los alimentos, como los compuestos que evitan el pardeamiento y los antioxidantes. Los cuales se utilizan para retardar o prevenir cambios en el color, sabor o textura, para retrasar la rancidez y la oxidación de ciertos sustratos biológicos como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos ^{4,5}.

En la industria de alimentos el uso de compuestos antimicrobianos empleados como aditivos es una práctica muy común, se han utilizado por años en una gran variedad de productos con el propósito de prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos, de alteración o deterioro ¹. En el sector médico y farmacéutico, se utilizan de manera común en medicamentos como el paracetamol, la insulina y algunos jarabes para la tos, con el fin de prevenir la contaminación microbiana, evitando la proliferación de microorganismos que puedan causar enfermedades o infecciones ⁵.

Además, su uso en cosméticos y productos de cuidado personal se ha favorecido para prevenir el crecimiento de microorganismos que puedan causar irritación o infecciones, en productos que van desde protectores solares, lociones y acondicionadores, hasta productos de limpieza, cremas dentales y maquillajes ⁵.

Estos compuestos antimicrobianos pueden ser sintetizados químicamente, o bien, pueden ser compuestos de origen biológico que pueden utilizarse comercialmente como aditivos.

A pesar de que la mayor parte de los compuestos utilizados son de origen químico, existen diversos compuestos de origen natural que son utilizados como conservadores (bioconservadores) ¹.



3.1.1. Compuestos antimicrobianos sintetizados químicamente

Actualmente la industria de alimentos utiliza una gran cantidad de compuestos antimicrobianos. La producción de estos compuestos genera una fuente de ingresos económicos importantes a nivel mundial, ya que se ha estimado que su consumo aumenta 4.1% anualmente, siendo los sorbatos, propionatos, y benzoatos los más utilizados ⁶.

Algunos antimicrobianos sintetizados químicamente como el ácido sórbico, ácido benzoico, parabenos, sulfitos, nitritos, diacetato de sodio, entre otros (Tabla 1), son reconocidos como sustancias seguras, ya que cuentan con la denominación GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) en la legislación norteamericana, la cual sólo es válida en Estados Unidos ^{1,6}.

El ácido sórbico se emplea en una gran cantidad de productos, como bebidas, pasteles, quesos, frutas y mermeladas. Además, comúnmente se utilizan las sales de sodio, potasio y calcio del ácido, ya que presentan la ventaja de ser más solubles en agua, facilitando su adición a una gran variedad de productos alimenticios. Su actividad antimicrobiana es eficaz contra las levaduras, los hongos y algunas bacterias ⁷.

En la industria alimentaria se utilizan las sales de metales alcalinos del ácido benzoico, en particular las de sodio, potasio y calcio, se utilizan generalmente en jugos de frutas y refrescos, ya que el ácido benzoico es poco soluble en agua ⁶. A pesar de que el ácido benzoico se encuentra naturalmente, como glucósido, en algunas frutas (como arándanos y ciruelas) y especias (como canela y clavo de olor), se produce principalmente de forma sintética para satisfacer la demanda del mercado. Su espectro de actividad antimicrobiana prevalece sobre hongos y levaduras, aunque también se da en menor medida en bacterias ⁷.

El dióxido de azufre y los sulfitos de sodio, potasio y calcio inhiben el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras. Se utilizan de manera general en alimentos ácidos, debido a que su acción aumenta con la disminución del pH por la acción del H_2SO_3 no disociado, el cual predomina a valores de pH menores a 3.



El uso de estos compuestos en la producción del vino es una práctica muy común, ya que se utilizan antes de la fermentación del mosto para evitar el crecimiento de microorganismos no deseados. También se utilizan a menudo en productos cárnicos, pescado, frutas y vegetales deshidratados, bebidas que contienen zumos de frutas y algunos tipos de cerveza ⁷.

Los nitratos y nitritos se utilizan como conservadores y también como fijadores de color en la industria cárnica, ya que además de utilizarse para inhibir a *Clostridium botulinum* en productos cárnicos, a menudo son agregados a las mezclas para obtener el color típico de la carne curada ⁷. Como inhibidores de *C. botulinum*, estos compuestos han contribuido de manera satisfactoria a prevenir los casos de botulismo.

Hasta ahora, los enfoques para reducir el riesgo de brotes de intoxicación en alimentos están basados en la adición de estos compuestos y en la aplicación de tratamientos físicos, como refrigeración, congelación, radiación, etc. Sin embargo, en los últimos años ha existido una preocupación por los posibles efectos secundarios que su consumo diario puede presentar.

Por esta razón, se han realizado ensayos aleatorios para probar de qué manera afecta la ingesta de estos compuestos. Un ejemplo de ello, es el ensayo realizado por *McCann et. al. en 2007*, en donde se evaluó como fue modificado el comportamiento de niños de 3 años después del consumo de una bebida con benzoato de sodio al 0.015%, dando como resultado un marcado aumento de la hiperactividad ⁸.

Por otra parte, se han investigado las posibles asociaciones entre el consumo de nitratos y nitritos con el riesgo de padecer cáncer gástrico debido a la formación de nitrosaminas. Sin embargo, no han arrojado resultados concluyentes, aunque se considera que un alto consumo de estos compuestos podría aumentar el riesgo ⁹.





Tabla 1. Compuestos antimicrobianos sintetizados químicamente (Adaptado de Rodríguez-Sauceda 2011)

| Compuesto antimicrobiano | Número de referencia | | Categoría de alimento | Espectro de acción | |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|---|---------------------------------------|
| | COFEPRIS | Unión Europea FDA | | | |
| Ácido sórbico y sorbatos | 7-87 | E 200 E 202 E 203 | 182.3089 182.3225 182.3640 | Crema, dulces a base de leche, helados, leche fermentada o acidificada, mantequilla, quesos frescos, madurados o procesados, productos cárnicos, ates, jaleas, mermeladas, productos de panificación, bebidas (zumos de fruta, vino y sidra). | Hongos, levaduras y algunas bacterias |
| Ácido benzoico y benzoatos | 7-14 | E 210 E 211 E 212 E 213 | 184.1021 184.1733 | Crema, dulces a base de leche, helados, leche fermentada o acidificada, mantequilla, quesos frescos, madurados o procesados, productos cárnicos, ates, jaleas, mermeladas, productos de panificación. | Hongos y levaduras. |
| Parabenos | 7-64 7-65 7-66 | E 214 a E 219 | 184.1490 184.1670 172.145 | Cerveza, frutas en conserva, ates, jaleas y mermeladas, bebidas saborizadas no alcohólicas, harina de maíz nixtamalizado, tortillas de maíz nixtamalizado. Productos de panificación | Hongos y levaduras |
| Dióxido de azufre y sulfitos | 7-92 | E 220 a E 228 | 182.3862 182.3798 | Leche fermentada o acidificada, frutas en conserva, ates, jaleas, mermeladas, jugos, vinos y sidra, cerveza, bebidas alcohólicas preparadas, productos de panificación, salsas preparadas o semipreparadas. | Bacterias, hongos y levaduras |
| Diacetato de sodio | 7-31 | E 262 (ii) | 184.1754 | Productos de panificación, productos cárnicos cocidos, curados madurados, curados crudos, desecados, salsas preparadas o semipreparadas, etc. | Hongos y levaduras |
| Nitrito de potasio, nitrito de sodio | 7-73 7-74 | E 249 E 250 | 181.33 181.34 | Quesos madurados, productos cárnicos cocidos, curados crudos y madurados. | <i>Clostridium botulinum</i> |

3.1.2. Compuestos antimicrobianos de origen natural

Muchos alimentos contienen compuestos naturales con actividad antimicrobiana, los cuales desempeñan la función de prolongar la vida útil de los alimentos, incluso muchos de ellos están siendo estudiados por su potencial uso como antimicrobianos directos ¹⁰. Estos compuestos naturales pueden clasificarse dependiendo su origen:

- Origen animal, que incluye proteínas, enzimas como la lisozima, y polisacáridos como el quitosán ^{3,10}.
- Origen vegetal, que incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores; ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas ³.
- Origen microbiano, que incluye compuestos producidos por microorganismos como la nisina ³.

Dentro de los compuestos antimicrobianos de origen natural más estudiados se encuentran los de origen vegetal, aquellos que se encuentran presentes en plantas, las cuales poseen un gran número de compuestos que se sabe tienen la capacidad de inhibir varias actividades metabólicas de bacterias, levaduras y hongos ¹¹. Los compuestos antimicrobianos en las plantas están comúnmente contenidos en la fracción de aceite esencial de las hojas (romero, salvia), flores y brotes de flores (clavo), bulbos (cebolla, ajo), frutas (pimiento, cardamomo) u otras partes de la planta ¹².

De los compuestos antimicrobianos de origen animal, la lisozima es el compuesto más estudiado. La lisozima se encuentra en muchos organismos: virus, insectos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, en los que se produce en multitud en tejidos y fluidos, incluyendo huevos de ave, leche humana, lágrimas y saliva ¹³.

La lisozima es muy abundante en la clara de huevo, de donde se extrae para su uso comercial, ya que es reconocida por diversos organismos internacionales como no tóxica y por ello es utilizada en fines alimentarios, farmacológicos y terapéuticos. Se estima que más de 100 toneladas de lisozima son usadas anualmente para estos propósitos, y entre sus usos principales se encuentra la protección de quesos



madurados contra bacterias dañinas (Tabla 2), principalmente contra *Clostridium tyrobutyricum*, que provoca la hinchazón de los quesos ¹⁴.

Dentro de los compuestos antimicrobianos producidos por microorganismos se encuentran la nisina, que es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* la cual se ha utilizado como antimicrobiano en una gran variedad de productos por más de 30 años (Tabla 2), ya que se encuentra de manera natural en muchos productos lácteos ¹⁵.

Sin embargo, además de éstos, existen una gran variedad de compuestos naturales de los que aún no se han investigado sus usos potenciales y el posible efecto sobre los productos a los que se adicionen. La creciente demanda de los consumidores por productos frescos mínimamente tratados, favorece la búsqueda de aquellos compuestos antimicrobianos naturales que puedan sustituir a los sintetizados químicamente, siendo una alternativa de conservación natural que cubra las mismas propiedades antimicrobianas de los compuestos sintéticos.





Tabla 2. Compuestos antimicrobianos naturales de origen animal y microbiano.

| Compuesto antimicrobiano | Número de referencia | | | Categoría de alimento | Espectro de acción |
|--------------------------|-------------------------|---------------|----------|--|--|
| | COFEPRIS | Unión Europea | FDA | | |
| Lisozima | Coadyuvante ANEXO X 155 | E 1105 | GRAS | Quesos madurados | <i>Clostridium tyrobutyricum</i> y otras bacterias |
| Nisina | 7-70 | E 234 | 184.1538 | Quesos frescos, quesos madurados, quesos procesados, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche, huevo líquido refrigerado, huevo líquido congelado, productos cárnicos, aderezos de mayonesa, mayonesa. | <i>Clostridium botulinum</i> y otras bacterias |

4. Bacterias ácido lácticas

4.1. Generalidades

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representado por géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común.

En general se definen como cocos o bacilos Gram positivos, no móviles, no formadores de esporas, microaerófilos y anaerobios facultativos; oxidasa, y catalasa negativos, que según la fermentación de carbohidratos se clasifican en homofermentativas (produce sólo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico, CO₂, etanol y/o ácido acético) ^{16,17}.

Los principales géneros que conforman al grupo de las BAL son: *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Melissococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* ^{18,19}.

En la industria alimentaria las BAL son ampliamente utilizadas, ya que además de contribuir en la conservación de los alimentos, éstas tienen la capacidad de aumentar la calidad nutritiva de los alimentos y conferir diferentes características sensoriales (como textura, sabor y olor agradable) en la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales. También se emplean en la producción de una gran variedad de productos como el yogurt, queso, encurtidos, embutidos, etc., y son de gran utilidad en la producción de bebidas fermentadas como el vino ²⁰.

La mayoría de las BAL no representan un riesgo, ya que son reconocidas como bacterias GRAS por la FDA en Estados Unidos y QPS (Qualified Presumption of Safety) en la Unión Europea ²¹. Por lo que se han utilizado como agentes de conservación con el fin de contribuir a la inocuidad de los alimentos y de incrementar su vida de anaquel. Pueden estar presentes como parte de la microbiota natural, pueden ser inoculadas como cultivos iniciadores para favorecer la producción del compuesto antimicrobiano, o añadiendo el compuesto antimicrobiano previamente obtenido y purificado, como aditivo alimentario ².



4.2. Uso de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas

Durante muchos años el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) ha constituido un grupo de gran importancia en la producción comercial de alimentos fermentados. Los efectos que estos microorganismos confieren sobre el sabor, la textura, el aroma y el incremento del valor nutrimental ²², se atribuyen a la actividad metabólica que ejercen sobre los carbohidratos, proteínas y lípidos del alimento. Así mismo, este grupo presenta un efecto antagónico frente a diversos tipos de microorganismos patógenos y de descomposición ²³.

Este grupo de bacterias es probablemente uno de los más difundidos y abundantes en la naturaleza, debido a que poseen la capacidad de crecer en una gran variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas ²⁴.

En los alimentos, el uso de los carbohidratos disponibles y la reducción del pH a causa de la producción de ácidos orgánicos, son el principal mecanismo antimicrobiano de las BAL. Sin embargo, estas bacterias producen otro tipo de sustancias antagonistas dentro de las cuales destacan las bacteriocinas, peptidoglucano hidrolasas y otros metabolitos inhibidores, que derivan en beneficios para los sectores de la industria y la salud pública.

La aplicación de cepas bioconservadoras, así como de los extractos y metabolitos producidos por ellas, han demostrado tener control sobre diversos microorganismos no deseados, consiguiendo alargar la vida útil de los alimentos y dar seguridad contra bacterias que puedan afectar la salud del consumidor ²⁴.

Actualmente los compuestos producidos por las bacterias lácticas son los que tienen un mayor interés, ya que estas bacterias son consideradas como GRAS, y tanto ellas como sus metabolitos han sido consumidos en una gran variedad de alimentos por innumerables generaciones sin presentar efectos adversos en la población ¹⁷.



4.3. Efectos antimicrobianos de las BAL

Se ha explorado el potencial de las BAL como conservadoras naturales, debido a que se ha reportado que sus efectos antimicrobianos no sólo se atribuyen a la producción de ácidos orgánicos y a la competencia por los nutrientes, sino que también se atribuyen a la producción de compuestos de diferente naturaleza que ejercen una fuerte actividad mediante diversos mecanismos de acción contra muchos microorganismos patógenos, de alteración o deterioro. Algunos de estos compuestos son: peróxido de hidrogeno, dióxido de carbono, diacetilo, reuterina, reuteriicina (Tabla 3), y compuestos de naturaleza proteínica como BLIS (Bacteriocin Like Inhibitor Substances), bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas^{2,19}, siendo éstos últimos dos el objetivo de esta investigación.

Tabla 3. Mecanismos de acción de compuestos producidos por bacterias ácido lácticas. (Adaptado de Vazquez et. al., 2009)

| Compuesto antimicrobiano | Mecanismo de acción |
|--|--|
| Ácidos orgánicos (ácido láctico y acético) | La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos y el pH es combinada, siendo la fracción no disociada de los ácidos orgánicos la que posee una mayor actividad inhibitoria, ya que atraviesan la membrana celular y se disocian en el citoplasma, provocando el descenso del pH interno causando la desnaturalización de proteínas y desestabilización de los componentes estructurales. |
| Peróxido de hidrogeno (H ₂ O ₂) | Produce radicales libres que atacan los componentes celulares esenciales: lípidos, proteínas y ADN. |
| Dióxido de carbono (CO ₂) | Su formación crea un ambiente anaerobio y, además, como tal tiene actividad antibacteriana, ya que puede inhibir las descarboxilaciones enzimáticas. |
| Diacetilo | Reacciona con la proteína de unión a arginina que se acopla al transportador de tipo ABC, por lo que la célula no puede transportar arginina a su interior, interfiriendo con la utilización de este aminoácido. |
| Reuterina | Inhibe la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa, involucrada en la síntesis del ADN. |
| Reuteriicina | Funciona como un ionóforo; se distribuye dentro de la membrana citoplasmática, debido a su parte hidrofóbica, y disipa selectivamente el gradiente de pH transmembranal. |



5. Bacteriocinas

5.1. Características generales

Las bacteriocinas producidas por BAL son péptidos, producidos por síntesis ribosomal que son secretados al medio extracelular. La producción se da de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida ²⁴. Las bacteriocinas de bacterias lácticas son generalmente estables en rangos amplios de pH y son resistentes a tratamientos térmicos ². Poseen actividad en contra de bacterias estrechamente relacionadas, aunque también pueden actuar frente a otras especies bacterianas. Sin embargo, las células productoras son inmunes a sus propias bacteriocinas ^{17,25}.

Las bacteriocinas son péptidos sobre los cuales se han centrado diversos estudios de investigación en los últimos años en torno a su detección, producción, purificación, forma de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas, microorganismos inhibidos o sensibles, y aplicación en diversas matrices alimenticias ²⁴.

Se ha tomado un interés particular en el estudio de las bacteriocinas producidas por BAL, debido a que éstas son consideradas como microorganismos seguros para el consumo humano, lo que facilitaría su futura aplicación en diversas matrices y no sólo en el área de alimentos, también representan un potencial muy interesante para su aplicación en la industria biomédica.

De manera general, las bacteriocinas son péptidos catiónicos que exhiben propiedades hidrófobas o anfifílicas y la membrana bacteriana es en la mayoría de los casos el objetivo de su actividad. Dependiendo del organismo productor y los criterios de clasificación, las bacteriocinas se pueden clasificar en varios grupos ^{26,27}.



5.2. Clasificación de las Bacteriocinas

Diversos investigadores han buscado dar una clasificación a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas. A continuación se presenta la clasificación propuesta por Cotter et al., 2005. En la cual se dividen las bacteriocinas en clases distintas: Los lantibióticos (Clase I) que contienen lantionina y las bacteriocinas que no contienen lantionina (Clase II), mientras que los compuestos alto peso molecular con la capacidad de hidrolizar la pared celular se clasifican en una designación separada llamada “Bacteriolisinas” (Clase III).

5.2.1. Bacteriocinas Clase I (lantibióticos).

Son péptidos que tienen de 19 a 38 aminoácidos de longitud (<5 kDa), que poseen residuos de lantionina o β -metil-lantionina. Estos residuos forman puentes covalentes entre los aminoácidos, dando lugar a la formación de “anillos” internos que le brindan a los lantibióticos sus particulares características estructurales (Figura 1).

Los lantibióticos se pueden dividir en función de su estructura y modo de acción, aunque no se ha determinado un mecanismo de acción preciso para cada lantibiótico, éstos pueden actuar de dos formas: se pueden enlazar al lípido II o pueden utilizarlo como molécula de acoplamiento (Figura 3).

El lípido II es el mayor transportador de subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular, y al enlazarse, la bacteriocina evita la síntesis correcta de la pared, que tiene como consecuencia la muerte celular. Así mismo, al utilizar al lípido II como molécula de acoplamiento, logra insertarse en la membrana e iniciar la formación de poros, lo que conduce a una disipación del potencial de membrana y la salida de pequeños metabolitos de células sensibles, provocando una muerte rápida.

La actividad combinada de estos módulos ayuda a explicar la actividad tan alta de al menos algunos lantibióticos.



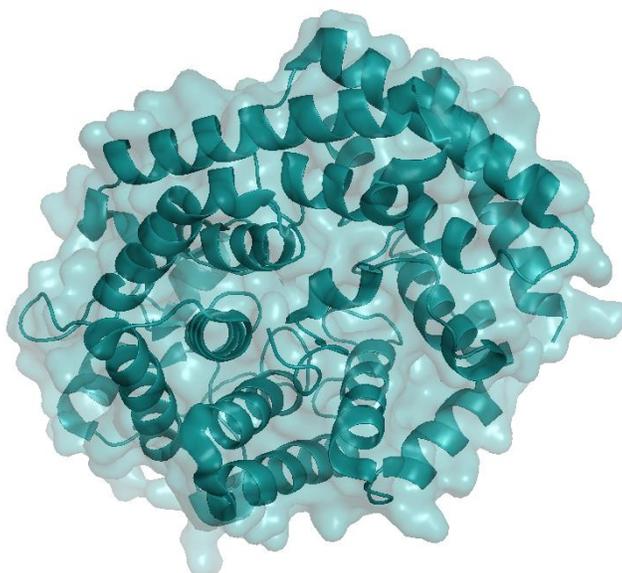


Figura 1. Estructura tridimensional de la bacteriocina de Clase I: nisina.

5.2.2. Bacteriocinas Clase II (No lantibióticos)

Son péptidos (<10 kDa) termoestables, ya que algunas soportan de 100-121°C durante 15-30 minutos. Éstos péptidos inducen la permeabilización de la membrana celular y la posterior fuga de moléculas de la bacteria (Figura 3). Están formadas por un grupo heterogéneo de moléculas, por lo que se clasifican en 4 subclases.

- Clase IIa, bacteriocinas que son activas contra *Listeria monocytogenes*.

Son bacteriocinas similares a pediocina, que tienen un espectro estrecho de actividad, y muestran una alta actividad específica contra el patógeno alimenticio *Listeria monocytogenes*. Uno de los representantes más característicos de este grupo es la sakacina P¹⁷ (Figura 2).

- Clase IIb, bacteriocinas de dos péptidos.

Este tipo de bacteriocinas requiere la actividad combinada de ambos péptidos, con un mecanismo de acción que implica nuevamente la disipación del potencial de



membrana, la fuga de iones y/o una disminución en las concentraciones de ATP intracelular.

- Clase IIc, bacteriocinas de estructura cíclica.

Estas bacteriocinas son agrupadas sobre la base de que sus extremos N y C están unidos covalentemente, dando como resultado una estructura cíclica.

- Clase II d, que generalmente comprende a las bacteriocinas restantes.

Las bacteriocinas más estudiadas de las BAL son las de las clases I y II, probablemente debido a que al ser termoresistentes son más adecuadas para ser empleadas como bioconservadores.

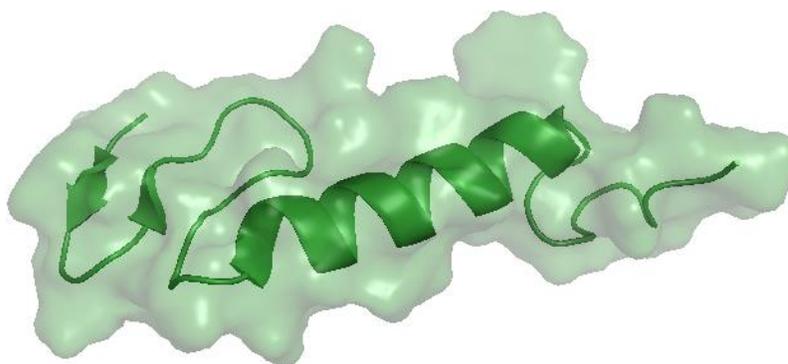


Figura 2. Estructura tridimensional de la bacteriocina de Clase II: Sakacina P.

5.2.3. Clase III (Bacteriolisinas)

Son proteínas termolábiles de alto peso molecular (>30 kDa) ¹⁷. Presentan una estructura en la que diferentes dominios tienen funciones para la translocación, unión al receptor y actividad letal.

Su mecanismo de acción es distinto al de las bacteriocinas (Clase I y II), ya que funcionan a través de la lisis de células catalizando la hidrólisis de la pared celular (Figura 3). Estas proteínas tienen un dominio catalítico en el extremo N-terminal que muestra homología con las endopeptidasas y un C-terminal que probablemente



represente el sitio de reconocimiento del objetivo, a diferencia de las otras clases de bacteriocinas, no siempre tienen genes de inmunidad a la bacteria productora.

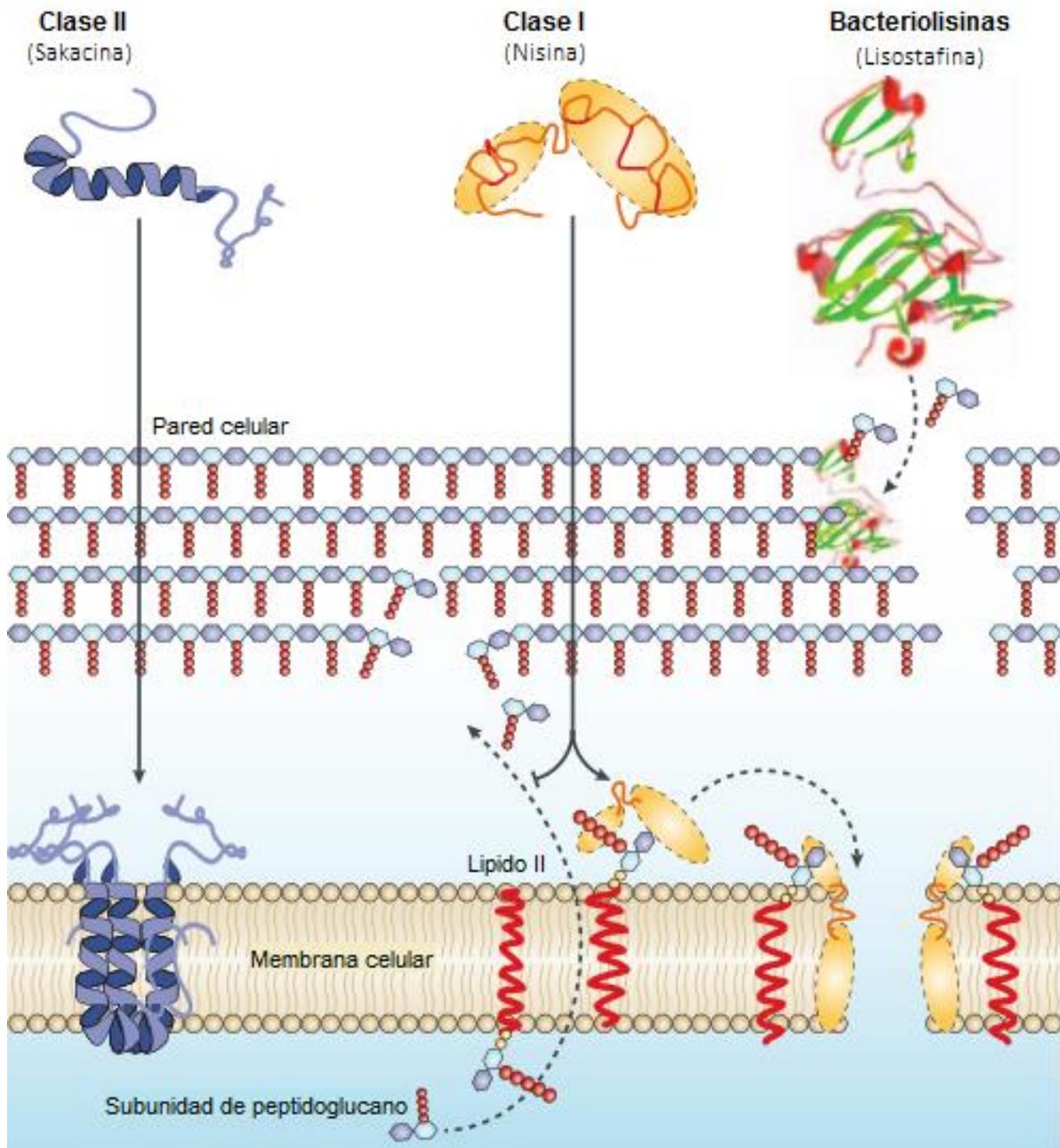


Figura 3. Modo de acción de las bacteriocinas. **Lantibióticos (Clase I)** Tienen dos métodos de acción: se pueden enlazar al lípido II o pueden utilizarlo como molécula de acoplamiento, interfiriendo en la síntesis de la pared celular o formando poros. **No-lantibióticos (Clase II)** Inducen la permeabilización de la membrana celular y la posterior fuga de moléculas de la bacteria. **Bacteriolisinas (Clase III)** Catalizan la hidrólisis de la pared celular de las bacterias, lo que lleva a la muerte y lisis de la bacteria. (Adaptado de Cotter et al., 2005)



5.3. El uso de bacteriocinas como bioconservadores

La creciente demanda de los consumidores por productos frescos, seguros y mínimamente procesados, ha favorecido el interés en la investigación de las bacteriocinas desde una perspectiva aplicada, por su potencial para ser empleadas como conservadores naturales ²⁸.

Las bacteriocinas de las BAL se han considerado debido a que presentan una serie de ventajas, como: su fácil producción, su no toxicidad para células eucariotas, su mayor inhibición comparada con las producidas por bacterias Gram negativas, y aunque únicamente la bacteriocina nisina, producida por *Lactococcus lactis*, es considerada GRAS de acuerdo a la FDA, se sabe que no forman compuestos secundarios al biodegradarse en el tracto gastrointestinal ²⁹.

De acuerdo con su definición, las bacteriocinas se inactivan, al menos, por una enzima proteolítica, como las de origen pancreático (tripsina y α -quimiotripsina) y gástrico (pepsina), lo que hace de estos péptidos sustancias seguras para ser incluidas como bioconservadores de alimentos, dado que serían inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal sin ser absorbidos como compuestos activos ²⁴. Además, su aplicación no sólo se enfoca como bioconservador en alimentos, se puede aprovechar su máximo potencial en beneficio del hombre en nuevas alternativas antibióticas ³⁰.

Estos compuestos pueden ser aplicados en diversos productos por diferentes métodos: *in situ* o *ex situ*, es decir, realizando la inoculación de la cepa productora de la bacteriocina en el producto, o por adición directa de la bacteriocina producida en forma pura o semipura ^{24,31}. En los casos *ex situ*, la producción de la bacteriocina puede llegar a ser una metodología más costosa, debido a que no sólo requiere las cepas iniciadoras, también depende de los medios de cultivo utilizados, los equipos empleados para el desarrollo de las cepas y la purificación de la bacteriocina. Adicionalmente, es necesario garantizar la actividad de cada extracto, y debe determinarse la concentración mínima inhibitoria contra microorganismos patógenos ²⁴.



Así mismo, la utilización de estos sistemas de conservación requiere de estudios preliminares para determinar el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo donde se desarrollan (curvas de crecimiento) ²⁴, y la estandarización de las técnicas para lograr producirlas en cantidades suficientes.

Se ha encontrado que el uso de bacteriocinas producidas *in situ*, ofrece ventajas en comparación con la producción *ex situ*, relacionadas al aspecto legal y de costos.

En la producción *in situ*, el uso de cultivos de BAL productoras de bacteriocina, requiere una selección cuidadosa de cepas que se encuentren bien adaptadas al entorno en el que serán utilizadas, así mismo deben ser capaces de crecer en las condiciones de procesamiento y/o almacenamiento del producto, y producir cantidades de bacteriocina suficiente para inhibir la bacteria blanco o de descomposición. Por lo tanto, necesariamente deben implementarse enfoques experimentales adecuados para la selección de cepas productoras de bacteriocina que sean las adecuadas para su uso en la producción industrial ³².

Las bacteriocinas producidas por BAL ofrecen varias propiedades deseables que las hacen aptas como bioconservadoras, tales como ^{27,32}:

- Las BAL y sus metabolitos se reconocen como sustancias seguras.
- Las bacteriocinas son inactivas y no tóxicas en células eucariotas.
- No provocan cambios en la microbiota intestinal porque están inactivadas por la digestión de proteasas (debido a su naturaleza proteínica).
- Son estables a diferentes pH y temperaturas utilizadas en diversos procesamientos.
- Tienen un amplio espectro antimicrobiano.
- Muestran un mecanismo de acción bactericida, ya que actúan sobre la membrana citoplasmática bacteriana.
- Pueden actuar de forma sinérgica con otras bacteriocinas, e incluso con otros compuestos antimicrobianos.
- Sus determinantes genéticos suelen codificarse en plásmidos, lo que facilita la manipulación genética.



Se han encontrado algunas bacteriocinas producidas por diversos géneros de BAL (Tabla 4) las cuales han sido aisladas principalmente de alimentos. Sin embargo, no todas han sido estudiadas y caracterizadas.

Tabla 4. Algunas bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas. (Adaptado de Monroy y Fernández, 2009)

| Microorganismo productor | Bacteriocina |
|--|-------------------------|
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> | Nisina |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> | Lacticina 3147 |
| <i>Leuconostoc gelidium</i> | Leucocina A |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | Mesenterocina 5 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | Mesenterocina 52 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | Mesentericina Y105 |
| <i>Leuconostoc paramesenteroides</i> | Leucocina S |
| <i>Leuconostoc carnosum</i> | Carnocina 54 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | Enterocina A |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Enterocina AS-48 |
| <i>Pediococcus pentosaccous</i> | Pediocina A |
| <i>Pediococcus acidilaticus</i> | Pediocina PA-1 |
| <i>Pediococcus acidilaticus</i> | Pediocina ACH |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | Mesentericina Y105 |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | Curvalicina |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | Acidocina J1132 β |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | Plantaricina S β |
| <i>Lactococcus lactis</i> | Bacteriocina J46 |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus lactis</i>) | Lacticina 481 |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> | Lactocina-705 |
| <i>Lactobacillus plantar</i> | Plantaricina C19 |
| <i>Lactobacillus sake</i> | Lactocina-S |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp (<i>Streptococcus lactis</i>) | Lactococcina MMFII |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | Curvacina-A |
| <i>Lactobacillus sakei</i> | Sakacina-A, Sakacina-P |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | Reutericina |

Además, se ha propuesto que la inhibición de patógenos transmitidos por alimentos por bacteriocinas de *Lactobacillus* pueden tener un gran interés, en especial en el área de alimentos mínimamente procesados ³³.



Las bacteriocinas de *Lactobacillus* usualmente inhiben bacterias estrechamente relacionadas con la cepa productora o que compiten por el mismo nicho ecológico. Por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii* produce dos bacteriocinas, lacticina A y B, las cuales tienen como objetivo inhibir otras especies de *L. delbrueckii* asociadas con productos lácteos fermentados, mientras que plantaricina A, es una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum*, la cual inhibe varias BAL, incluyendo otras cepas de *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Leuconostoc paramesenteroides*, normalmente asociados con vegetales fermentados.

Otras bacteriocinas de *Lactobacillus* que han demostrado tener un espectro de actividad amplio, incluyen la inhibición las especies de *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* y *Aeromonas hydrophila*³³ (Tabla 5).



Tabla 5. Ejemplos de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus*. (Adaptado de Dallas y Hoover, 1993).

| Microorganismo Productor | Bacteriocina | Espectro de actividad | Características |
|--------------------------|----------------------------|---|---|
| <i>L. acidophilus</i> | Lactacina B | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus leichmannii</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> | Su masa molecular se estima en 6.3 kDa. |
| | Lactacina F | <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> . | Tiene una masa molecular de 6.3 kDa Estable al calor hasta de 121°C por 15 min. |
| | Acidophilucina A | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> | Inactivado por tripsina y actina Termolábil a 60°C por 10 min. |
| <i>L. brevis</i> | Brevicina 37 | <i>Pediococcus damnosus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus oenos</i> . | Termoestable, 121°C por 1 hora, activa en un rango de pH 2-10, inactivada por cloroformo. |
| | Caseicina 80 | <i>Lactobacillus casei</i> | 40 kDa, pI= 4.5; termoestable a 60°- 10 min, activa en un rango de pH 3-9, inducida por mitomicina C. |
| <i>L. delbrueckii</i> | Lacticina A Lacticina B | <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Delbrueckii</i> . | Termolábil a 60°C por 10 min |
| | Lactocina 27 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> | Complejo de lipoproteína-carbohidrato de gran peso molecular >200 kDa. |
| <i>L. helveticus</i> | Helveticina J | <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i> y <i>bulgaricus</i> | Complejo agregado de >300 kDa. |
| | Plantaricina A | <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> | ----- |
| <i>L. plantarum</i> | Bacteriocina | <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> . | Sensitivo a proteasas, α-amilasa y lipasa. Termoestable a 100°C por 30 min. |
| | Sakacina A | <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus divergens</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium botulinum</i> (esporas), <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> . | ----- |
| <i>L. sake</i> | Lactocina S | <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> | 33 aminoácidos, activa en un rango de pH de 4.5 – 7.5 |



5.4. Aplicaciones en la industria alimentaria

La demanda de alimentos libres de microorganismos patógenos, alimentos con una larga vida de anaquel y alimentos que no contengan conservadores químicos, son algunos de los desafíos a los que se enfrenta actualmente la industria. Las bacteriocinas pueden ser una opción atractiva para solucionar estos problemas, por los beneficios que presentan. En la actualidad, sólo la nisina y la pediocina PA-1/ACH han ganado amplio uso comercial como bioconservadores de alimentos no sólo en su producción *in situ*, también se utilizan sus preparaciones en polvo y su uso está cubierto por diversas patentes norteamericanas y europeas ^{24,34}.

La mayoría de las aplicaciones de alimentos que involucran bacteriocinas pueden dividirse en tres categorías: bacteriocinas parcialmente purificadas (Nisaplin[®], que contiene 2.5% de nisina), productos lácteos y otros productos fermentados de grado alimenticio que contienen bacteriocinas en forma de un fermentado crudo (MucroGARD[®]), y cultivos protectores productores de bacteriocinas (Tabla 6).

Algunas de las bacteriocinas más prometedoras en la industria de alimentos son: lacticina 3147, enterocina AS-48, lacticina 481 y sakacina P ³⁵ (Tabla 7). Las cuales han demostrado tener actividad contra los principales microorganismos patógenos, de alteración o deterioro de alimentos, como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. faecalis*, algunas cepas de *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Salmonella* entre otros, y se ha estudiado su aplicación en diversas matrices alimentarias, principalmente en productos lácteos y cárnicos con resultados satisfactorios, que varían según el tiempo de aplicación del tratamiento y la concentración de bacteriocina empleada.

Por ejemplo, en 2001 se realizó una serie de pruebas en las que se demostró que la adición del 10% de polvo de la bacteriocina lacticina 3141 al yogurt natural dio como resultado una reducción del 98% de *L. monocytogenes* (10^4 UFC/mL) en 5 minutos a 30°C, y después de 60 minutos a las mismas condiciones no se detectaron células viables. Cuando se probaron los mismos parámetros en requesón, las células viables de *Listeria* se redujeron en un 40% en 5 min y en un 85% en 120 min a 30°C.



Así mismo, se probó el efecto de esta bacteriocina contra *Bacillus cereus* (10^5 UFC/mL) en sopa, en donde se encontró que una concentración del 5% de la bacteriocina fue suficiente para eliminar completamente el patógeno en 1 h, mientras que una preparación al 1% redujo la población de este patógeno en un 80% en 3 h ³⁵.

Otro ejemplo es la bacteriocina plantaricina NC8 expresada de forma heteróloga en *E. coli* BL21, la cual ha demostrado tener un amplio espectro de inhibición, especialmente contra *Salmonella spp.* y algunas de sus subespecies, tales como *S. typhimurium*, *S. paratyphi-A*, y *S. paratyphi-B*, cuando se emplea en una concentración de 0.15 µg/mL. Además de esta bacteriocina, la enteriocina E-760 producida por *Enterococcus durans* inhibe *S. entérica*, con una concentración mínima inhibitoria que va de 0.2 a 0.4 µg/mL ³⁶.

Esta información demuestra que las bacteriocinas, particularmente aquellas producidas por BAL, podrían ofrecer grandes aplicaciones potenciales para controlar e inhibir a una gran variedad de patógenos alimentarios incluyendo a los más importantes, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*, en la industria de alimentos.





Tabla 6. Microorganismos de calidad alimentaria productores de bacteriocina comercialmente disponibles (Adaptado de Chikindas et. al., 2018)

| Producto | Microorganismo | Bacteriocina | Productor | Aplicación |
|--------------------|---|---|----------------------------------|--|
| BioSafe™ | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BS-10 | Nisina A | Chr. Hansen | Queso cottage, feta y quesos madurados, prevención de olores y sabores extraños debidos a <i>Clostridium</i> . |
| HOLDBAC™ | <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> DSM 706 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM 7061 | Bacteriocinas indefinidas. Patente: US20150150150298 A1. | Dupont Nutrition Biosciences Aps | Inhibición de hongos y bacterias psicrófilas en queso cottage. |
| Bactoferm™ F-LC | <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Staphylococcus xylosum</i> | <i>L. curvatus</i> es productor de Sakacina A y <i>P. acidilactici</i> produce pediocina PA-1/AcH | Chr. Hansen | Control de <i>Listeria monocytogenes</i> y como un iniciador en carne. |
| ALCMix® | <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Staphylococcus carnosus</i> | Produce plantaricina y carnicina | Danisco DuPont | Cultivos anti-listeriales para el fermentado de salchichas y jamón cocido |
| Bactoferm™ B-SF-43 | <i>Leuconostoc carnosum</i> | Leucocina | Chr. Hansen | Control de <i>Listeria</i> en vacío y atmosferas modificadas de productos cárnicos. |
| Bactoferm™ B-2 | <i>Lactobacillus sakei</i> | Sakacina | Chr. Hansen | Control de <i>Listeria</i> en vacío y atmosferas modificadas de productos cárnicos. |
| Bactoferm™ B-FM | <i>Lactobacillus sakei</i> y <i>Staphylococcus xylosum</i> | Sakacina | Chr. Hansen | Control de <i>Listeria</i> en vacío y atmosferas modificadas de productos cárnicos. |

Tabla 7. Bacteriocinas de interés en la industria de alimentos (Adaptado de Fallico et al., 2010)

| Bacteriocina | Microorganismo productor | Actividad | Alimento |
|------------------|--|--|--|
| Nisina | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> . | Queso cheddar Leche fermentada Carne |
| Enterocina | <i>Enterococcus faecium</i> | <i>Micrococcus luteus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> | Leche Queso |
| Lacticina 3147 | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DPC3147 | Espectro de acción muy parecido al de la nisina. Dentro de los que destacan los patógenos: <i>Listeria</i> , <i>Clostridium Staphylococcus</i> y especies de <i>Streptococcus</i> . Además algunas cepas que muestran sensibilidad reducida: <i>S. aureus</i> resistente a meticilina <i>Enterococcus faecalis</i> resistente a vancomicina | Yogurt Requesón Carne de cerdo picada Queso cheddar |
| Enterocina AS-48 | <i>Enterococcus faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> S-48 | Presenta un amplio espectro de inhibición, siendo altamente activo contra la mayoría de bacterias Gram-positivas y algunas Gram-negativas. Actividad bactericida rápida contra las especies: <i>Bacillus</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Enterococcus</i> , y en algunas cepas de <i>Corynebacterium</i> . | Salchichas, postres a base de soya tipo yogurt, pudín de gelatina, en descontaminación de vegetales crudos y procesados. En todos contra <i>L. monocytogenes</i> |
| Lacticina 481 | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CNRZ 481 | Muestra un efecto bactericida en muchas especies de <i>Lactococcus</i> , y en algunas de <i>Lactobacillus</i> y <i>Leuconostoc</i> . Muestra actividad contra <i>Clostridium tyrobutyricum</i> , y controla el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> | Queso tipo Emmental |
| Sakacina P | <i>Lactobacillus sakei</i> L TH 673 | Inhibe el crecimiento de varias bacterias Gram positivas, que incluyen especies de patógenos alimentarios (<i>L. monocytogenes</i> y <i>E. faecalis</i>) y de descomposición (<i>Carnobacterium</i>) | Salmon ahumado en frío |
| Pediocina PA-1 | <i>Pediococcus acidilactici</i> PAC1.0 | Presenta acción bactericida frente a varias bacterias patógenas, incluyendo <i>Listeria monocytogenes</i> . | Requesón, crema, queso, productos cárnicos, como salchichas, y en productos cárnicos fermentados |



La aplicación de estas bacteriocinas puede ofrecer diversos beneficios además de prolongar la vida útil de los alimentos, por ejemplo: disminuir el riesgo de la transmisión de microorganismos patógenos, mejorar las pérdidas económicas debidas a alimentos deteriorados, reducir la aplicación de compuestos antimicrobianos sintetizados químicamente, la aplicación de tratamientos térmicos menos agresivos que permitan la conservación de vitaminas y nutrientes, manteniendo las cualidades organolépticas sin comprometer la inocuidad del producto, además, pueden servir para satisfacer las demandas industriales y de los consumidores por alimentos más naturales, seguros, de sabor fresco, listos para comer y mínimamente procesados ³².

Con la intención de optimizar su uso en productos alimenticios, es necesario conocer aquellos factores limitantes que influyen en la eficacia de las bacteriocinas. Algunas investigaciones que se han realizado en alimentos, revelan que la eficacia de las bacteriocinas disminuye en los mismos, debido a que depende en gran medida de una serie de factores que en su mayoría implican la interacción con componentes alimenticios, precipitación, inactivación o distribución desigual de la bacteriocina en la matriz alimentaria (Tabla 8) ^{32,37}.

Las bacteriocinas de amplio espectro presentan usos potenciales más amplios, mientras que las de espectro reducido pueden utilizarse de manera específica para inhibir selectivamente ciertas bacterias de alto riesgo en alimentos como *L. monocytogenes* sin afectar la microbiota nativa del producto ³². Actualmente el interés por la inhibición de este patógeno alimentario ha tomado particular importancia, por lo que se ha patentado el uso de nisina en la elaboración de queso Feta (WO 2015/089029), en donde la bacteriocina es incorporada directamente a la leche empleada como materia prima (Tabla 9).

La patente publicada como WO 96/32482, cubre el uso de lacticina 3147 capaz de inhibir a *Listeria monocytogenes* en quesos cremosos cuajados, y también su uso como iniciador, controlando el crecimiento de BAL no iniciadoras en queso cheddar. De manera importante, los productos lácteos fermentados fabricados con cultivos



Tabla 8. Eficacia de las bacteriocinas en alimentos: factores limitantes. (Adaptado de Gálvez et al., 2007)

| Factores relacionados con los alimentos | Microbiota del alimento | Bacteria de interés |
|--|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Condiciones de procesamiento • Temperatura de almacenamiento • pH, y estabilidad de la bacteriocina a los cambios de pH • Inactivación por enzimas del alimento • Interacción con aditivos o ingredientes • Adsorción de la bacteriocina en los compuestos del alimento • Baja solubilidad y falta de distribución en la matriz alimentaria • Estabilidad limitada de la bacteriocina durante la vida útil del producto | <ul style="list-style-type: none"> • Carga microbiana • Diversidad microbiana • Sensibilidad a la bacteriocina • Interacciones microbianas en el sistema alimentario | <ul style="list-style-type: none"> • Carga microbiana • Sensibilidad a la bacteriocina (Gram, especies, cepas) • Etapa fisiológica (células en crecimiento, en reposo, viables pero no cultivables, endosporas, etc.) • Protección por barreras fisicoquímicas (microcolonias, biopelículas) • Desarrollo de resistencia/adaptación |

Tabla 9. Patentes actuales que cubren el uso de la bacteriocinas alimentos

| Patente | Fabricante | Aplicaciones | Solicitud * |
|--|---|--|---------------------------|
| Elaboración de Queso Feta resistente a <i>L. monocytogenes</i> | KRAFT FOOD GROUP BRANDS LLC | Se realiza la incorporación de nisina y/o el cultivo productor de la bacteriocina a la leche y posteriormente se da el proceso convencional de fabricación del queso. | WO 2015/089029 |
| Biopelícula para la conservación de la carne fresca | UNIV NORTHEAST FORESTRY | Uso de una envoltura o biopelícula elaborado con quitosano y nisina para la inhibición del crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> y otros microorganismos patógenos o de descomposición en productos cárnicos. | CN106261464 |
| Método para mantener las morchellas frescas | FOSHAN TUIQI AGRICULTURAL RES INSTITUTE | El método comprende una serie de pasos, entre las que destacan la inmersión de las morchellas frescas en una solución de nisina de 16 a 20 segundos para aumentar su vida de anaquel. | CN20171695625 20170814 |
| Uso de lacticina 3147 en quesos cremosos cuajados | TEAGASC | La adición de la bacteriocina tiene la finalidad de inhibir a <i>L. monocytogenes</i> en quesos cremosos cuajados y controlar las BAL no inadoras en queso cheddar. | WO 96/32482 |

(*) PATENTSCOPE – International and National Patent Collections <https://patentscope.wipo.int/>



iniciadores que producen lacticina 3147 se han considerado también como aplicación potencial de la bacteriocina ³⁸.

También se han desarrollado nuevas alternativas en la conservación de alimentos que incluyen el envasado activo, en el que se han combinado los avances en tecnología alimentaria, biotecnología, envasado y ciencia de materiales, en un esfuerzo por cumplir con las demandas de los consumidores por “productos frescos”.

La incorporación de un compuesto antimicrobiano en un envase polimérico, es un desarrollo que ha ido tomando un gran interés, ya que permite a la industria combinar una función protectora física y antimicrobiana. Este tipo de envase interactúa con el producto o con el espacio de cabeza generado dentro del envase para reducir, inhibir o retardar el crecimiento de microorganismos que puedan estar presentes en las superficies de los alimentos ³⁹.

El envasado activo se puede desarrollar mediante tres métodos diferentes ⁴⁰: (1) la incorporación directa de péptidos en el polímero; (2) el recubrimiento peptídico sobre la superficie polimérica; y (3) la inmovilización de péptidos dentro del polímero.

Los dos primeros métodos de aplicación, incorporación directa de péptidos y recubrimiento en polímeros, dan como resultado la migración del compuesto desde el envase al alimento. Por otro lado, la inmovilización de péptidos en el polímero, da como resultado un envase activo no migratorio, en el que los componentes activos están fijos en el material de envasado.

Existen publicaciones que demuestran la efectividad del primer método, el cual se utilizó para desarrollar películas basadas en aislados de proteína de suero y pediocina. Estas biopelículas fueron efectivas en la inhibición del crecimiento de *L. innocua* y *Salmonella sp.*, con una reducción de 2 y 0.5 ciclos logarítmicos en comparación con el control ⁴¹.

Actualmente, en el laboratorio se está trabajando con un tipo de envasado activo con películas elaboradas con almidón y glicerol, en la cual se encuentran



inmovilizados los péptidos producidos por *E. faecalis* FAIR E-77, el cual se sabe que produce la enterocina AS-48. Hasta ahora, se ha demostrado que la actividad antimicrobiana *in vitro* de las películas contra microorganismos patógenos como: *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica* y *S. typhimurium*, ha sido satisfactoria. Además, se ha observado que su actividad sigue estando presente tras 7 días de almacenamiento a 4 °C.

La patente CN106261464 cubre el uso de nisina en la elaboración de un empaque bioactivo para la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* en la conservación de la carne fresca y productos cárnicos.

Además, actualmente se está desarrollando esta bacteriocina en una forma seca por pulverización, con la ventaja de que dicho polvo bioactivo puede aplicarse como un ingrediente en formulaciones de leche infantil ⁴². Sin embargo, aún no es obvio que posea la consistencia suficiente para resistir el procedimiento de secado por pulverización, por lo que existe la posibilidad de que el secado resulte en una pérdida importante de actividad de la bacteriocina.

Otra bacteriocina de interés es la pediocina PA-1, debido a su actividad inhibitoria altamente específica contra *Listeria monocytogenes*, se ha estudiado su uso en diversos productos lácteos, donde se ha observado una disminución en los recuentos de *L. monocytogenes* en requesón, crema y queso ⁴³. Además, se ha demostrado la inhibición de este patógeno en queso cottage, crema y en salsa de queso cheddar en un rango de pH de 5.5 a 7.0, donde fue efectiva en un periodo de dos semanas a 32 °C, lo que muestra su efectividad como conservador en este tipo de alimentos ³³.

Así mismo, al igual que nisina, se ha estudiado la función de la pediocina PA-1 en el control del crecimiento de *Listeria* en productos alimenticios después de su procesamiento, en donde la pediocina PA-1 se incorpora a los materiales poliméricos para proporcionar al envase la acción antimicrobiana ³¹.



Actualmente, se está estudiando la inoculación de alimentos con cepas productoras de pediocina PA-1 como una alternativa útil en la conservación de productos cárnicos, como salchichas, y en productos cárnicos fermentados, como el chorizo, ya que se ha demostrado que esta bacteriocina es más efectiva que nisina en el tratamiento de algunos de los patógenos transmitidos por alimentos, principalmente contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*, debido a que presenta mayor estabilidad en un amplio rango de temperatura y pH ³¹.

Estas aplicaciones sitúan a las bacteriocinas como una gran alternativa frente a las demandas de alimentos libres de patógenos y que no contengan conservadores sintetizados químicamente.

La aplicación de cepas bioconservadoras, así como de los extractos y metabolitos producidos por ellas, han demostrado que tienen control sobre una gran variedad de microorganismos patógenos y no deseados en alimentos. Por lo que el uso de bacteriocinas en combinación con otros métodos de conservación son una opción interesante en la industria de alimentos.



5.5. Aplicaciones biomédicas

Recientemente se ha estudiado el potencial de las bacteriocinas en aplicaciones de terapias biomédicas, su actividad dirigida hacia bacterias patógenas las hace de particular interés en el tratamiento de patógenos resistentes a antibióticos, y se ha demostrado que diversas bacteriocinas muestran actividad contra bacterias de importancia médica ⁴⁴ (Tabla 10). Por ejemplo, la bacteriocina lacticina 3147 producida por *L. lactis* ha mostrado actividad *in vitro* en contra de *S. aureus* resistente a meticilina, entetococos resistentes a vancomicina, diversas cepas de estreptococos, *Clostridium botulinum* y *Propionibacterium acnes*. Así mismo, diversos experimentos *in vivo* utilizando modelos de animales han mostrado resultados positivos del uso de mersacidina en el tratamiento de infecciones causadas por *S. pneumoniae* y *S. aureus* resistente a meticilina ³⁴.

Las bacteriocinas son particularmente útiles en el tratamiento de una variedad de infecciones bacterianas, ya que además de los mecanismos de acción que presentan y su actividad en contra de patógenos resistentes a antibióticos convencionales, el desarrollo de resistencia a las bacteriocinas se da con menor frecuencia que el desarrollo de resistencia a los antibióticos, lo que las convierten en una opción atractiva como posibles agentes antimicrobianos ³⁴.

Las bacterias productoras de bacteriocinas tienen un sistema de protección en contra de su propia bacteriocina, al cual se le conoce como inmunidad. De manera muy general, para cada bacteriocina hay una proteína de inmunidad específica que se expresa junto con ella ⁴⁵. Por esta razón, para que una bacteria logre adquirir inmunidad a cierta bacteriocina, se requiere una transformación genética, en la cual, la bacteria blanco capte las moléculas de ADN libre y las incorpore a su genoma.

Este proceso sucede con poca frecuencia, ya que se requiere que en las moléculas de ADN libre que se capte, se encuentre completa la secuencia de ADN que codifique para esta proteína de inmunidad.



Por otro lado, los mecanismos de resistencia a los antibióticos pueden ser adquiridos por mutación o mediante la transferencia del material genético contenido en plásmidos entre células bacterianas de especies relacionadas o diferentes ⁴⁶.

Esto quiere decir, que los mecanismos de resistencia a las bacteriocinas no se confieren tan fácilmente de una bacteria a otra, ya que a diferencia de los mecanismos de resistencia a los antibióticos, las secuencias genéticas que codifican para producción de la proteína de inmunidad no están codificadas en plásmidos.

La propagación de bacterias resistentes a los antibióticos representa una gran amenaza para la salud pública tanto a nivel nacional como internacional. Esta situación está empeorando a medida que el progreso actual en el desarrollo de nuevos antibióticos es limitado y presentan la característica de que surjan cepas resistentes ⁴⁷. Por lo que el uso de bacteriocinas puede representar una ventaja sobre el uso de algunos de los antibióticos convencionales, ya que su mecanismo de acción es diferente de la mayoría de los antibióticos, que a menudo actúan como inhibidores enzimáticos de las principales vías metabólicas.

Las bacteriocinas rompen la integridad de la membrana, provocando la fuga de solutos intracelulares y la muerte celular, debido a sus diferentes modos de acción, las bacteriocinas no discriminan entre bacterias resistentes a antibióticos y sensibles y muestran actividad antimicrobiana en concentraciones que van de pico a nanomolares ⁴⁸.

Debido a estos mecanismos de acción que presentan y sus diferentes espectros de acción, ofrecen la posibilidad de utilizarlas en la inhibición del crecimiento de diversas bacterias patógenas en humanos y animales ⁴⁹. Muchas bacteriocinas tienen una alta actividad específica contra objetivos clínicos (Tabla 10), se han identificado potentes bacteriocinas de espectro estrecho que pueden controlar patógenos específicos sin afectar negativamente a las poblaciones comensales ⁵⁰. Tal es el caso de la mutacina 1140 y su uso en terapias bucales, debido a su eficacia en el desplazamiento de cepas cariogénicas nativas de *S. mutans*.



Otro ejemplo, es el uso de nisina, mersacidina y lacticina 3147 en el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). Lo que ha consolidado el empleo de las bacteriocinas frente a infecciones bacterianas como alternativa a la falta de compuestos que logren inhibir este tipo de microorganismos.

En este sentido, se han patentado algunas composiciones farmacéuticas y sus métodos de tratamiento antimicrobiano ⁵¹. Ejemplo de ello son las patentes existentes presentadas en la Tabla 11, que protegen el uso de bacteriocinas en tratamientos de higiene bucal (MX 199578 B, CN107753931) y de composiciones de bacteriocinas para el tratamiento de trastornos gastrointestinales (MX 188025 B). Además, se han encontrado aplicaciones interesantes de nisina, como las patentadas por la Universidad de Jiangsu, las cuales proponen la incorporación de la bacteriocina en un gel anti-inflamatorio (CN201711137811) y un enjuague bucal (CN201711137239), para la limpieza oral y el tratamiento de úlceras bucales.

Las aplicaciones potenciales para las bacteriocinas son muy extensas, recientemente se publicó un estudio donde se utilizan los efectos antimicrobianos de una mezcla de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus rhamnosus* como tratamiento de las infecciones ortopédicas post-operatorias causadas por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. En donde se utilizó un modelo *in vivo* con conejos para probar la eficiencia de esta mezcla de bacteriocinas.

Los resultados de este estudio muestran que la formación de biopelículas disminuye en los implantes después del tratamiento con las bacteriocinas. Lo que es un avance importante ya que las infecciones ortopédicas, son una complicación importante que pueden llegar a comprometer la salud del paciente, y pueden causar retrasos en la recuperación, por lo que estos resultados destacan un método novedoso para el tratamiento de infecciones de implantes *in vivo* ⁵².

Finalmente, algunas bacteriocinas como la cinamicina podrían tener aplicaciones biomédicas diferentes, desde una perspectiva médica no antimicrobiana, ya que esta bacteriocina inhibe la función de la enzima fosfolipasa A2 y la enzima



convertidora de angiotensina, involucradas en el sistema inmune y en la regulación de la presión sanguínea (Tabla 10) ³⁴.

Esta información sugiere que el uso de bacteriocinas en terapias antimicrobianas alternativas es viable, por lo que estos péptidos pueden proveer parte de la solución en búsqueda de nuevos tratamientos contra bacterias de origen clínico, ya que sus beneficios en el área clínica son notorios.





Tabla 10. Bacteriocinas con aplicaciones biomédicas potenciales.

| Bacteriocina | Microorganismo productor | Espectro de inhibición | Aplicaciones potenciales | Referencias |
|----------------|--|---|--|-------------|
| Nisina | <i>Lactococcus lactis</i> | Inhibe bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo <i>Helicobacter pylori</i> y <i>S. aureus</i> resistente a meticilina | Higiene bucal, tratamiento de SARM, infecciones enterococales, formulaciones tópicas, tratamiento de úlceras pépticas y enterocolitis. | 15 |
| Mersacidina | <i>Bacillus subtilis</i> HIL Y-85,54728 | Actividad antibacteriana contra patógenos Gram-positivos, incluyendo cepas de bacilos, estafilococos y estreptococos. | En modelos animales, ha mostrado valor terapéutico en septicemia en el tratamiento de SARM e infecciones estreptococales. | 96,97 |
| Cinnamicina | <i>Streptomyces cinnamoneus</i> | Inhibidor de fosfolipasa A2, enzima convertidora de angiotensina y virus de herpes simple | Disminución de la inflamación, regulación de la presión sanguínea y tratamiento por infecciones virales | 34 |
| Lacticina 3147 | <i>Lactococcus lactis</i> | Inhibe <i>S. aureus</i> resistente a meticilina, enterococos resistentes a vancomicina, estreptococos, <i>Clostridium botulinum</i> y <i>Propionibacterium acné</i> . | Tratamiento de SARM e infecciones estreptococales. | 44 |
| Mutacina 1140 | <i>Streptococcus mutans</i> | Inhibe a <i>S. mutans</i> | Uso en terapias bucales, debido a que desplaza cepas cariogénicas nativas de <i>S. mutans</i> | 44 |

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina



Tabla 11. Patentes actuales que cubren el uso de bacteriocinas en tratamientos biomédicos.

| Patente | Fabricante | Aplicaciones | Solicitud * |
|---|--------------|--|----------------|
| Composición para el tratamiento de higiene bucal | AMBI, INC. | Composiciones para el cuidado oral o bucal que comprenden una bacteriocina, para su utilización en el tratamiento o profilaxis de la placa o sarro, enfermedades periodontales e infecciones micóticas orales. | MX 199578 B |
| Composiciones farmacéuticas de bacteriocinas | AMBI, INC | Composición farmacéutica para tratar trastornos gastrointestinales causados por bacterias Gram negativas | MX 188025 B |
| Elaboración de un gel compuesto para medicina oral | UNIV JIANGSU | Gel compuesto con propiedades anti inflamatorias y antibacterianas, con efecto en la restauración rápida de la herida de ulcera oral. | CN107753931 A |
| Preparación farmacéutica de un gel anti-inflamatorio bacteriano | UNIV JIANGSU | Utilizando 0.01 % de nisina como sustancia antimicrobiana natural para suprimir con eficacia bacterias en la cavidad oral. Cuyo objetivo es proporcionar un gel bacteriostático para limpiar la actividad oral, mientras ejerce funciones anti-inflamatorias, que puede ser empleado también en el tratamiento de úlceras bucales como tratamiento local. | CN20171113781 |
| Enjuague bucal | UNIV JIANGSU | Enjuague bucal con propiedades anti-inflamatorias con la ventaja de una rápida restauración de la herida de úlceras bucales | CN201711137239 |

(*) PATENTSCOPE – International and National Patent Collections <https://patentscope.wipo.int/>

5.6. Aplicaciones en medicina veterinaria

Como resultado de la creciente preocupación del uso de antibióticos en el tratamiento y prevención de enfermedades en animales, se ha investigado el uso de las bacteriocinas como una alternativa potencial. Tal es el caso de la bacteriocina lacticina 3147, la cual se ha estudiado en la prevención de la mastitis bovina ⁴⁴.

El tratamiento de la mastitis generalmente implica el uso de antibióticos, lo que representa algunas desventajas, como la aparición de residuos de medicamentos en la leche de las vacas tratadas, y la aparición y diseminación de patógenos resistentes a los antibióticos entre animales ⁵³.

A pesar de que en los últimos años se han implementado programas de manejo de la mastitis, las infecciones causadas por *S. aureus* aún persisten como causa de esta enfermedad. Los estafilococos pueden transmitirse fácilmente en los cuartos de lactancia de vacas. Las vacas no lactantes son particularmente susceptibles a infecciones estafilocócicas y frecuentemente se administran antibióticos para prevenir la contaminación ⁵³. Sin embargo, su uso se ha considerado debido a su conexión percibida con la aparición de bacterias resistentes a antibióticos, particularmente con el aumento de SARM.

Estas preocupaciones han obligado a emitir recomendaciones sobre tratar de reducir el uso de antibióticos, y es posible que las terapias con antibióticos en los animales sean restringidas en un futuro.

Las alternativas que existen actualmente para reducir el uso de antibióticos incluyen bacteriocinas como nisina y lacticina 3147, ya que son sustancias antimicrobianas de calidad alimentaria con un amplio espectro de acción contra bacterias Gram positivas ⁵³.

La lacticina 3147 ha demostrado ser eficaz en la inhibición de *S. aureus* ATCC25923 y *S. thermophilus* HA y ST112 (Tabla 12), por esta razón despertó un interés en el tratamiento de la mastitis bovina, que es posiblemente la más costosa en la industria láctea. Por lo que se han iniciado estudios para investigar su capacidad para inhibir una variedad de aislados clínicos obtenidos a partir de animales infectados ³⁸.



Twomey *et al.*, (2000) propone la incorporación de la bacteriocina a las preparaciones de selladores de pezones, que actúan como una barrera física en la vaca contra la infección. Por lo que la bacteriocina proporcionará una barrera antimicrobiana adicional sobre la física proporcionada por el propio sello. En este estudio se demostró que aquellos sellos de pezones que contienen la bacteriocina resultan efectivos, en general, los animales toleraron los sellos que contienen la bacteriocina presentando bajos recuentos de células somáticas asociadas.

Esto además muestra atractivos obvios en la industria láctea, ya que el uso de bacteriocinas en el tratamiento de la mastitis puede significar que no se requerirá un descarte de leche o retención de carne, como sería el caso con un tratamiento basado en antibióticos.

Tabla 12. Bacteriocinas con aplicaciones potenciales en medicina veterinaria.

| Bacteriocina | Microorganismo productor | Espectro de inhibición | Aplicaciones potenciales | Referencias |
|----------------|--------------------------------|---|--|-------------|
| Lacticina 3147 | <i>Lactococcus lactis</i> | Inhibe a <i>S. aureus</i> ATCC2593, <i>S. thermophilus</i> HA y ST112 | Prevención y control de la mastitis bovina. Elaboración de un sello para pezón | 53 |
| Nisina | <i>Lactococcus lactis</i> | Inhibe bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo <i>Helicobacter pylori</i> | Mastitis bacteriana | 44 |
| Nukacina 3299 | <i>Staphylococcus simulans</i> | Muestra actividad contra diversas cepas de <i>S. aureus</i> | Prevención y tratamiento de infecciones bacterianas, incluida la mastitis bovina | 54 |

En la Figura 4 se muestra la evaluación de la actividad de la bacteriocina en experimentos *in vivo* realizada por Twomey y colaboradores (2000), en donde se inocularon los pezones de las vacas 18 horas antes del ordeño, para posteriormente



evaluar la leche ordeñada. Esta figura muestra el efecto de lacticina 3147 inhibiendo diversas cepas de *S. aureus* aisladas clínicamente de animales infectados.

Los resultados obtenidos muestran que a mayor concentración de la bacteriocina se presenta una disminución en ciclos logarítmicos de las bacterias, por lo que lacticina 3174 es efectiva en la inhibición de dichas cepas patógenas.

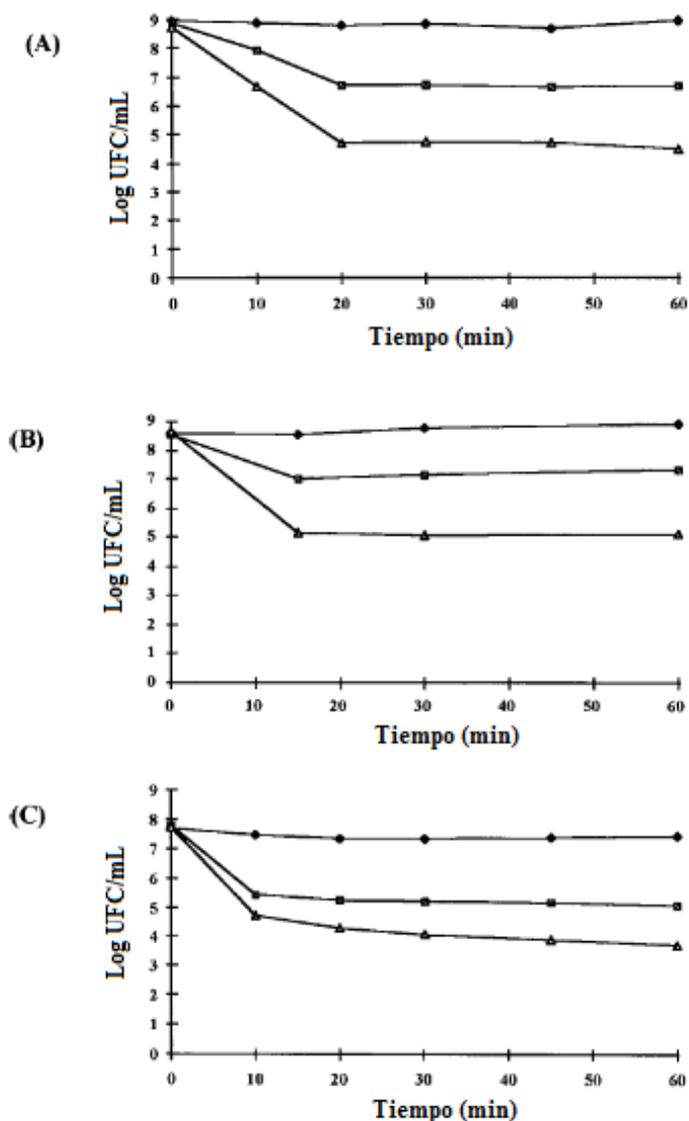


Figura 4. Efecto bactericida de lacticina 3147 contra (A) *Staphylococcus aureus* DPC5245, (B) *S. aureus* DPC5246 y (C) *S. aureus* DPC5247. La concentración de lacticina 3147 en la suspensión bacteriana fue de 0 AU/mL (●), 2,560 AU/mL (■) y 5,120 AU/mL (Δ) (Adaptado de Twomey et al., 2000).



Además, recientemente la compañía ImmuCell ha sacado a la venta el producto *Wipe Out® Dairy Wipes*, que consiste en una toallita húmeda que se utiliza para la limpieza del área de la tetilla (especialmente en su abertura) ⁵⁵, cuyo ingrediente activo es nisina, que controla dos de las principales bacterias que causan la mastitis, *S. aureus* y *S. agalactiae*.

Estos tratamientos con bacteriocinas presentan la ventaja de proporcionar una barrera adicional contra bacterias patógenas Gram positivas, que pueden ser introducidas de manera no intencional durante el ordeñamiento. La principal ventaja es que ninguno de los componentes de estos nuevos productos contienen antibióticos, y, por lo tanto, no comprometen sus aplicaciones actuales.

Por lo que la eficiencia del sello pezón con lacticina 3147 y la toallita húmeda con nisina presentan alternativas atractivas en el tratamiento de mastitis en bovinos, por lo que actualmente se está investigando como ampliar su aplicación.



5.7. Aplicaciones en la industria de cosméticos y productos de cuidado personal

En el área de cuidado personal, el acné es una de las enfermedades cutáneas más comunes, la cual provoca comezón y lesiones inflamatorias graves en la cara, espalda y tórax ⁵⁶. *Staphylococcus epidermidis* y *Propionibacterium acnes* se han reconocido como las principales bacterias de la piel causantes de acné.

En este sentido, se pensó en el uso de las bacteriocinas como un ingrediente activo en los cosméticos, con el fin de controlar el crecimiento de bacterias patógenas y proporcionar protección contra la inflamación microbiana en la piel, ya que para ser apropiado para los cosméticos de la piel, el ingrediente activo debe ser no tóxico, hipoalérgico y no irritante, además, se desea que sea biodegradable, y las bacteriocinas cumplen con todos estos requisitos.

En el área cosmética las composiciones que integran bacteriocinas, presentan la ventaja de evitar el desarrollo de resistencias por patógenos que colonizan e infectan la piel. Por esta razón existen algunas publicaciones sobre la habilidad que presentan algunas bacteriocinas para inhibir a *P. acnes* (Tabla 13), reduciendo las lesiones inflamatorias causadas por esta bacteria. Tal es el caso de las producidas por *Lactococcus sp.* HY 449 y *Enterococcus faecalis* SL-5 ⁵¹.

En el caso de la Enterocina L50 producida por *E. faecalis* SL-5, se ha patentado su uso ya que ha sido registrada como *Lactopad*TM por Cell Biotech Co. Ud. (KOSDAQ) con el objetivo de utilizarla con propósitos cosméticos, en las capas superiores de la piel. Actualmente, la compañía ofrece tres productos cosméticos bajo la marca *LACTOClear*, para el cuidado y salud de la piel: *Face wash*, *Skin renewal cleanser* y *Bio-active cream* ⁵⁷ (Figura 5). Donde la producción de la bacteriocina se da *in situ*, ya que mencionan que la bacteria ácido láctica es la que es empleada como probiótico.

La importancia de la aplicación de las bacteriocinas en el tratamiento de esta condición, se debe a que el acné es la infección cutánea más común, aproximadamente el 85% de los adolescentes padecen en algún grado este



problema como una respuesta multifactorial que incluye mecanismos hormonales, microbiológicos e inmunológicos ⁵¹.

Por lo que las composiciones que integran bacteriocinas, presentan la ventaja de evitar el desarrollo de resistencias por patógenos que pueden llegar a colonizar e infectar la piel. Por este motivo se ha incrementado el estudio y el número de publicaciones sobre la habilidad de algunas bacteriocinas para inhibir a *P. acnés*, reduciendo lesiones inflamatorias causadas por esta bacteria.



Figura 5. Productos cosméticos que utilizan bacteriocinas como ingrediente activo. (Tomado de cellbiotechint.com)





Tabla 13. Bacteriocinas con aplicaciones potenciales en cosméticos y productos del cuidado personal.

| Bacteriocina | Microorganismo productor | Espectro de inhibición | Aplicaciones potenciales | Referencias |
|---|-----------------------------------|---|--|-------------|
| Nisina | <i>Lactococcus lactis</i> | Inhibe bacterias Gram positivas y Gram negativas | Desodorantes y cosméticos | 44 |
| CBT-SL5 | <i>Enterococcus faecalis</i> SL5 | Inhibe a <i>P. acnes</i> | Tratamiento de acné | 98 |
| Epidermina | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Inhibe <i>P. acnes</i> , estafilococos, estreptococos | Tratamiento de acné, folliculitis, impétigo. | 34,44 |
| HY 449 | <i>Lactococcus</i> sp. | Inhibe el crecimiento de un amplio espectro de bacterias patógenas tales como estafilococos y algunas cepas de listeria. <i>E. coli</i> A2 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 <i>L. monocytogenes</i> <i>P. acnes</i> <i>S. aureus</i> <i>A. epidermidis</i> | Controlar la inflamación de la piel causada por microorganismos y como tratamiento de acné | 56 |
| AS-48 | <i>Enterococcus</i> | <i>P. acnes</i> y <i>S. aureus</i> | Composiciones para el tratamiento de infecciones bacterianas de la piel con compuestos antibacterianos | 35,62 |
| Enterocina L50 (L50 A y L50B) Enterocina P Enterocina Q | <i>Enterococcus faecium</i> L50 | Muestra actividad contra diversos patógenos Gram positivos, específicamente contra <i>P. acnes</i> . <i>Lactobacillus brevis</i> y <i>Pediococcus damnosus</i> | Se ha patentado el uso de la enterocina L50 como ingrediente cosmético | 57 |

5.8. Bacteriocinas de importancia industrial

5.8.1. Nisina

Es la bacteriocina mejor caracterizada producida por *Lactococcus lactis subsp. lactis*, es un péptido bioactivo de 34 aminoácidos y 3.4 kDa de peso molecular. Es empleada de manera común como aditivo en la industria de alimentos para prevenir la descomposición ocasionada principalmente por *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* ³⁰, ya que es la única bacteriocina reconocida por la FDA como GRAS y se encuentra en la lista positiva de aditivos alimentarios de la Unión Europea (E234) con potencial reconocido para su uso clínico, debido a que no presenta toxicidad, es degradada por enzimas digestivas y es ausente de color y sabor ^{15,44}.

La nisina nativa presenta un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, y también se ha encontrado que es efectiva contra las esporas bacterianas resistentes al calor de *Clostridium botulinum* ⁵⁸, lo que la hace adecuada para una serie de aplicaciones diferentes. Sin embargo, presenta muy poca o nula actividad contra algunas bacterias Gram negativas y levaduras ⁴⁴.

Es más eficaz en alimentos con pH ácido y bajo contenido en proteínas y grasas, en el caso de los alimentos con pH mayores a 6 presenta una eficiencia limitada debido a su poca solubilidad. Se vende comercialmente en forma de polvo bajo la marca Nisaplin® que contiene 2.5% de nisina en balance de cloruro de sodio y sólidos de leche (Aplin y Barrett, Towbridge, Wiltshire, Reino Unido). Se comercializa con una actividad estandarizada de 1×10^6 UI/g, mientras que 1g de nisina pura contiene 40×10^6 UI, y es utilizado en la conservación de alimentos ⁴⁹.

No sólo ha sido aceptada como segura y como conservador natural en diferentes áreas de la industria de alimentos, también se ha empleado en diferentes tratamientos para algunas condiciones de salud (ulceras estomacales, infecciones de colon, etc.), cosméticos y productos veterinarios ¹⁵ (Tabla 14).



Así mismo, se han realizado estudios en los que se ha demostrado que la nisina sola o en combinación con otros antibióticos puede ser eficaz contra patógenos Gram-negativos ⁴⁹.

Tabla 14. Aplicaciones de Nisina en diferentes áreas de salud. (Adaptado de Shin, et al., 2016).

| Condición de Salud | Aplicaciones |
|--|---|
| Infecciones asociadas con patógenos resistentes a los medicamentos | La nisina mostró efectos bactericidas contra bacterias Gram positivas, incluyendo SARM, <i>S. pneumoniae</i> y enterococos. Así mismo, se encontró que presenta efectos contra aislados clínicos de <i>S. pneumoniae</i> , incluyendo las cepas resistentes a penicilina. Se encontró también que la Nisina es altamente bactericida contra <i>C. difficile</i> , no es absorbida por el tracto intestinal y no presenta actividad indiscriminada contra la microbiota intestinal. |
| Infecciones gastrointestinales | La nisina puede ser adecuada para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, ya que no altera la integridad epitelial intestinal y es insensible a la degradación por los componentes del quimo del yeyuno. |
| Infecciones respiratorias | Se ha realizado un estudio en ratas y ratones, en los que se utiliza nisina para controlar la infección por <i>S. aureus</i> intranasal y para prevenir la muerte en los animales infectados con <i>S. pneumoniae</i> . |
| Infecciones de piel de tejidos blandos | Se elaboraron vendajes para heridas con nanofibras que contienen nisina, y se encontró que éstos redujeron significativamente las infecciones cutáneas inducidas por <i>S. aureus</i> . |
| Mastitis | Se empleó la administración de nisina intramamaria y se encontró que fue efectiva para el tratamiento de la mastitis en vacas lecheras lactantes. |
| Cáncer | La nisina fue empleada en el estudio de tumorigénesis de células HNSCC. Se encontró que induce la apoptosis preferencial y la detención del ciclo celular. |
| Salud Bucal | Se realizaron estudios en monos, en los que la nisina redujo el número de estreptococos en la placa dental en aquellos que recibieron nisina en sus alimentos. Posteriormente, se elaboró un enjuague bucal a base de nisina, y se administró a perros Beagle, en donde se encontró que el compuesto logró prevenir la acumulación de placa y la inflamación gingival. |



Adicionalmente, se han encontrado variantes de Nisina, que difieren en uno o más residuos de aminoácidos y la ingeniería genética ha permitido el desarrollo de nuevas variantes con el objetivo de mejorar la eficacia y la estabilidad en diferentes condiciones fisiológicas y mejorar sus propiedades farmacocinéticas para una variedad de aplicaciones biológicas (Tabla 15) ⁵⁹.

Tabla 15. Variantes naturales y por bioingeniería de nisina. (Adaptado de Shin et al., 2016)

| Variantes Naturales | Variantes modificadas genéticamente |
|---------------------|-------------------------------------|
| Nisina A | Nisina A S29A |
| Nisina Z | Nisina A S29D |
| Nisina F | Nisina A S29 E |
| Nisina Q | Nisina A S29G |
| Nisina H | Nisina A K22T |
| Nisina U | Nisina A M21V |
| Nisina U2 | Nisina Z N20K |
| Nisina P | Nisina Z M21K |

Como se mencionó anteriormente, hoy en día el uso de nisina se encuentra cubierto por diferentes patentes, entre las que destacan su aplicación como conservador en diversos productos alimenticios como quesos frescos, productos enlatados, postres lácteos, leche deshidratada.

5.8.2. Pediocina PA-1

La pediocina es una bacteriocina perteneciente a la clase IIa producida por *Pediococcus spp.*, que consta de 44 aminoácidos y 4.84 kDa de peso molecular. Posee la característica de inhibir *L. monocytogenes*. Sin embargo, *Pediococcus spp.* no puede fermentar la lactosa, por lo que para permitir su uso en productos lácteos, mediante ingeniería genética se realizó la producción heteróloga de la bacteriocina, utilizando como huéspedes bacterias ácido lácticas.⁶⁰

La pediocina PA-1 es una bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, que tiene acción bactericida frente a varias bacterias patógenas, incluyendo *Listeria monocytogenes* ⁶¹, ha sido bien caracterizada para ser utilizada



en la industria alimentaria como bioconservador. Tiene una masa molecular de 4.6 kDa y su punto isoeléctrico es de 9.6. Además, la actividad antimicrobiana de esta bacteriocina se mantiene a 100 °C, se reduce a 121 °C, y se presenta de manera más evidente en valores de pH entre 4 y 7, perdiendo sustancialmente su actividad biológica a valores de pH inferiores a 3 o mayores a 9. También se sabe que esta bacteriocina permanece activa después de los tratamientos con lipasa, fosfolipasa C, lisozima, DNasa o RNasa; sin embargo, es susceptible a las enzimas proteolíticas (como tripsina, papaína, ficina y α -quimiotripsina) ^{31,39}.

5.8.3. Lacticina 3147

La lacticina 3147 es una bacteriocina codificada en plásmido producida por *L. lactis* subsp. *lactis* DPC 3147, está compuesta por dos péptidos (LtnA1 y LtnA2) cuya actividad sinérgica es necesaria para la actividad antimicrobiana completa. LtnA1 es un péptido de 30 aminoácidos con una masa molecular de 3.306 kDa, mientras que LtnA2 consta de 29 aminoácidos con una masa molecular de 2.847 kDa. Son codificados como péptidos precursores de 59 (LtnA1) y 62 (LtnA2) aminoácidos que posteriormente se procesan para formar los péptidos biológicamente activos. Por lo que esta bacteriocina se clasifica como miembro de lantibióticos de Clase I ³⁵.

Presenta gran actividad contra una diversidad de bacterias Gram positivas, entre las que destacan los patógenos *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y especies de *Streptococcus*, además, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (EFRV) muestran una sensibilidad reducida a esta bacteriocina ³⁵. Dado que muchos de estos organismos se han identificado como agentes de descomposición y patógenos en alimentos, los desarrollos de sistemas basados en esta bacteriocina presentan atractivos obvios.

La lacticina 3147 tiene una gran variedad de aplicaciones potenciales, como ya se mencionó anteriormente, su uso en el tratamiento de la mastitis bovina es la mayor aplicación en la que se ha estudiado, sin embargo, también se han probado varias cepas de *Streptococcus* orales con el fin de determinar su sensibilidad a lacticina



3147, para investigar su uso en aplicaciones como enjuagues bucales y productos dentales ⁴².

5.8.4. Lacticina 481

Es una bacteriocina lantibiótica de espectro estrecho, es producida por cepas de *L. lactis subsp.* CNRZ 481 y también es llamada lactococcina y lactococcina DR.

Tiene una masa molecular de 2.901 kDa y es sintetizada ribosomalmente, ejerce un efecto bactericida en especies de *Lactococcus*, algunas cepas de *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Así mismo, es activa contra *Clostridium tyrobutyricum* y el patógeno alimentario *L. monocytogenes* ³⁵.

5.8.5. Sakacina P

Es una pequeña bacteriocina de clase IIa de 43 aminoácidos y 4.73 kDa de peso molecular, es producida por ciertas cepas de *Lactobacillus sakei*, el cual es considerado GRAS. La producción máxima de esta bacteriocina puede obtenerse mediante el cultivo de la cepa productora en un medio completamente definido, a 20 °C y sin control de pH.

Se sabe que su modo de acción es similar al de pediocina. Y que inhibe el crecimiento de varias bacterias Gram positivas, incluyendo especies de patógenos y de descomposición, como *L. monocytogenes*, *E. faecalis* y *Carnobacterium* ³⁵.

5.8.6. Enterocina AS-48

La enterocina AS-48 es una bacteriocina codificada por plásmidos, su actividad se identificó por primera vez en *Enterococcus faecalis subsp. liquefaciens* S-48.

Es un péptido circular constituido por 70 aminoácidos, tiene una masa aproximada de 7.15 kDa y su naturaleza es fuertemente anfipática, lo que le permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales. En soluciones acuosas, AS-48 adopta una forma dimérica en donde expone sus dominios hidrófilos, sin embargo, en condiciones hidrofóbicas, adopta una nueva forma en la que expone sus dominios hidrófobos, lo que explica su fácil inserción en membranas fuertemente cargadas



negativamente como las de las bacterias, pero sin actividad frente a células eucariotas ⁶².

Presenta un amplio espectro de actividad antimicrobiana, principalmente contra la mayoría de bacterias Gram positivas, incluyendo los patógenos *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium spp.*, *Bacillus cereus* y algunas bacterias Gram negativas; sin embargo, estas últimas requieren concentraciones muy altas de la bacteriocina o tratamientos combinados que deterioren la capa externa de lipopolisacáridos ³⁵. También, mantiene su estabilidad en un rango de valores de pH que van de 3 a 8, es estable a temperaturas de hasta 80°C, a tratamientos con surfactantes (gracias a sus características estructurales) y es sensible a las proteasas digestivas, lo que la hace una prometedora alternativa como conservador natural ^{35,62}.

Tiene un gran potencial como conservador en una gran variedad de sistemas alimentarios, sin embargo, su eficacia disminuye de manera notable en las matrices alimentarias en comparación con los medios de laboratorio, debido su interacción con los componentes del sistema ⁶³.

5.8.7. HY 449

HY 449 es una bacteriocina producida por *Lactococcus spp.* HY 449, esta bacteriocina presenta una gran estabilidad frente al calor, alto pH y tratamiento con surfactantes, tiene un peso molecular de 3.6 kDa. La producción máxima de esta bacteriocina puede obtenerse mediante el cultivo de la cepa productora en medio BHI (Infusión cerebro corazón, por sus siglas en inglés) a 37°C ⁶⁴.

Además, tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de un amplio espectro de bacterias patógenas, entre las que destacan los estafilococos y algunas especies de *Listeria* ⁵⁶. También se ha estudiado su efecto en *P. acnes* ATCC 6919, y se encontró que la capacidad de esta bacteriocina para causar la lisis celular de *P. acnes* ATCC 6919 fue altamente eficiente, por esta razón se ha propuesto el uso de HY 449 como un agente antimicrobiano eficiente como ingrediente cosmético.



6. Peptidoglucano hidrolasas

6.1. Características generales

Al igual que las bacteriocinas, las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) son producidas por diversas BAL, éstas son un gran y diverso grupo de enzimas hidrolíticas que tienen la capacidad de hidrolizar enlaces del componente principal de la pared celular bacteriana, el peptidoglucano ⁶⁵. Se encuentran en organismos de todos los taxones principales, incluyendo animales, plantas, bacterias y virus, sin embargo sus funciones varían.

Por ejemplo, las lisozimas de origen animal son una barrera de defensa inmune que brinda protección contra bacterias patógenas. Las PGHs de origen bacteriano se conocen comúnmente como autolisinas, ya que se encuentran involucradas en una variedad de procesos fisiológicos en el ciclo de vida bacteriano. En los bacteriófagos, son conocidas como lisinas o endolisinas y desempeñan funciones cruciales en el ciclo de infección viral del huésped bacteriano ⁶⁶.

En este trabajo se describirán las PGHs de origen bacteriano, que como ya se mencionó, se encuentran involucradas en diversos procesos fisiológicos que incluyen la lisis del peptidoglucano.

El peptidoglucano es una molécula compleja que forma una estructura que cubre a la membrana plasmática, la cual es responsable de mantener la forma y morfología de la célula, y su principal función es brindarle protección contra los cambios de presión osmótica del medio que la rodea ⁶⁷. Consiste en cadenas de residuos alternados de N- acetilglucosamina (NAG) y ácido N- acetilmurámico (NAM) unidos por enlaces β 1-4, entrecruzados entre sí por péptidos cortos de L- y D- aminoácidos (Figura 6). Los primeros dos péptidos de la cadena tetra-peptídica generalmente consisten en L-alanina y D-glutamina o isoglutamina y el último residuo es generalmente D-alanina. El tercer residuo del péptido del tallo varía a lo largo de las bacterias, en bacterias Gram positivas es lisina y en las bacterias Gram negativas, y en muchas bacterias Gram positivas como *Listeria* y especies de *Bacillus* es el mesodiaminopimelato (mDAP) ⁶⁸.



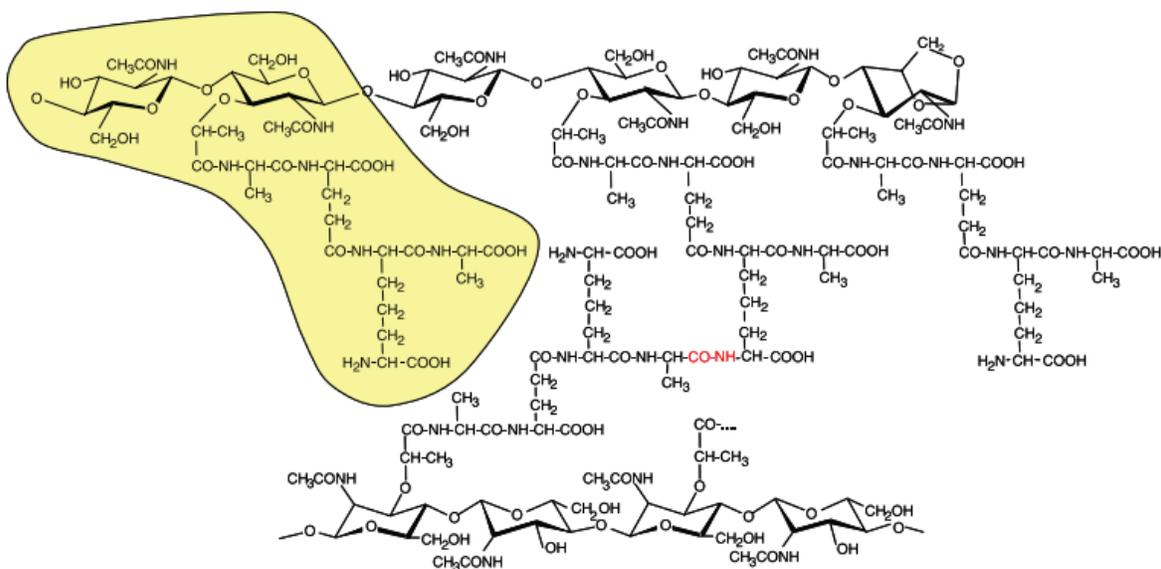


Figura 6. Estructura del peptidoglucano. La parte marcada representa la subunidad tetrapéptido (monómero) de disacárido básico. (Adaptado de Vollmer et al. 2008).

El peptidoglucano es el principal componente de la pared celular en bacterias Gram positivas (Figura 7), donde forma múltiples capas y presenta una conformación tridimensional que origina una pared celular fuerte y rígida. Por el contrario, en las bacterias Gram negativas constituye una sola capa delgada. Esta capa de peptidoglucano es altamente dinámica durante el crecimiento celular y se remodela en la división celular ⁶⁸.

Las PGHs son producidas durante el crecimiento bacteriano, cuando la pared celular se renueva y expande de manera continua, ya que son las enzimas responsables de hidrolizar los enlaces en la cadena de peptidoglucano y las ramas de las cadenas laterales, por lo tanto, son responsables de mantener el recambio global de peptidoglucanos de la pared celular. Durante el crecimiento, para la inserción de nuevos precursores y la separación de las células hijas, se requiere una escisión limitada de la molécula de peptidoglucano, por lo que estas enzimas se consideran potencialmente letales. Sin embargo, están estrechamente reguladas por mecanismos que permanecen en gran parte desconocidos para evitar la lisis celular accidental, fenómeno por el que también se conocen como autolisinas ^{67,69}.



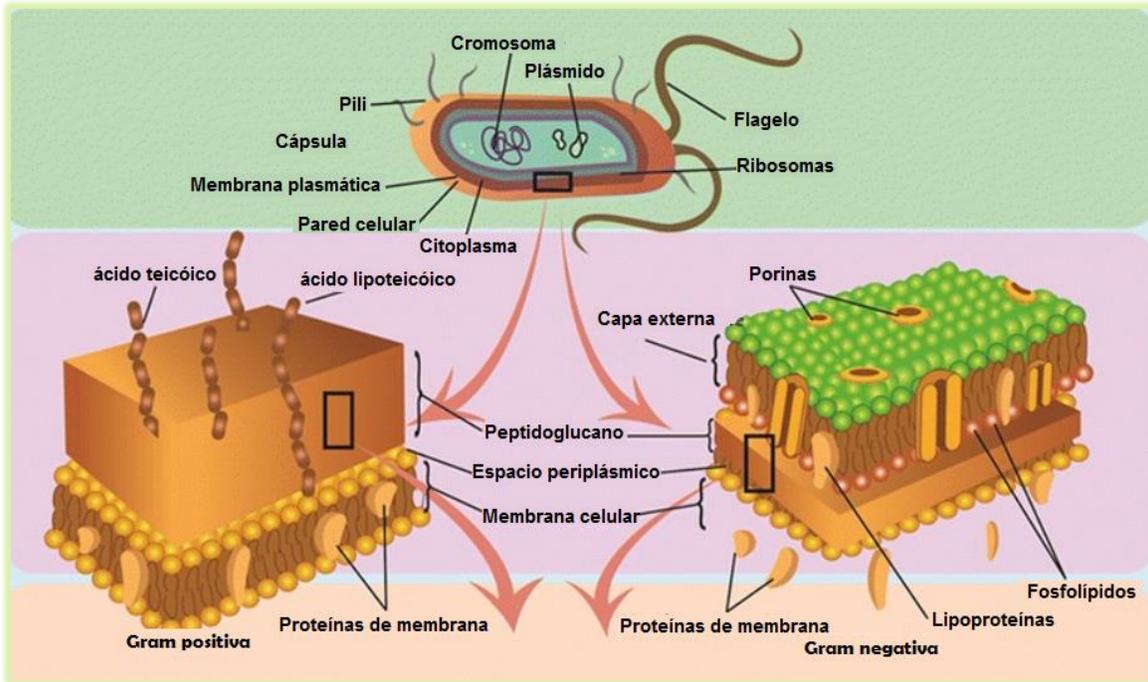


Figura 7. Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Adaptado de Sharma et. al., 2016)

Las PGHs se han propuesto como una alternativa potencial como agentes antimicrobianos debido a su propiedad única de romper la pared celular de peptidoglucano presente en bacterias Gram positivas y Gram negativas. En este escenario, las peptidoglucano hidrolasas pueden emplearse como alternativas potenciales al uso de compuestos antimicrobianos sintetizados químicamente en la industria de alimentos o al uso de antibióticos en el tratamiento de algunas condiciones de salud ⁶⁸.

6.2. Funciones fisiológicas

Como se mencionó anteriormente, estas enzimas están involucradas en una gran variedad de funciones celulares (Tabla 16) que también incluyen además del intercambio de unidades de peptidoglucano durante el crecimiento, la formación de flagelo (en algunos casos) y la autólisis, que generalmente es inducida cuando se presentan ambientes poco favorables para el crecimiento de la célula, por ejemplo, la falta de nutrientes ^{70,71}.



Tabla 16. Funciones de las peptidoglucano hidrolasas (Adaptado de Vollmer et. al., 2008)

| Funciones | Observaciones |
|---|--|
| Regulación del crecimiento de la pared celular | Ruptura de enlaces para permitir la expansión de la red de peptidoglucano durante el crecimiento celular |
| Recambio de peptidoglucano | Liberación de fragmentos solubles de peptidoglucano durante el crecimiento |
| Producción de moléculas de señalización | Inducción de la β -lactamasa por productos de recambio de peptidoglucano |
| Reciclaje de productos de recambio | Ruptura de productos de recambio para reutilizarlos en la síntesis de peptidoglucano |
| Separación celular durante/después de la división celular | Ruptura de la pared celular durante la división celular en bacterias Gram-negativas. Ruptura del entrecruzamiento después de la división en bacterias Gram-positivas |
| Juegan un papel en la esporulación y germinación | Digestión del peptidoglucano de la célula madre para liberar la endospora. Digestión del peptidoglucano de esporas durante la germinación |
| Montaje de pili y flagelo | Enzimas especializadas para la ruptura del peptidoglucano en el ensamblaje de flajelos o montaje de pili |
| Reanimación de células latentes | Estimulación de la división celular para salir del estado latente |
| Lisis de células blanco | Secreción de PGHs para degradar el peptidoglucano de células blanco |
| Formación de biopelículas | Las PGH son necesarias para la construcción inicial de células con superficies hidrofóbicas |

Además, algunas PGHs tienen la función de agrandar los poros en el peptidoglucano para el ensamblaje de grandes complejos transmembranales de envoltura (pili, flagelos, sistemas de secreción), o cortan específicamente el peptidoglucano durante la esporulación o la germinación de las esporas. También, están implicadas en fenómenos de lisis, donde su actividad está altamente regulada,



y se sabe que la presencia o ausencia de ciertos compuestos que se encuentran en la pared celular (como ácidos teicóicos, ácidos lipoteicóicos, etc.) inhiben la actividad de las PGHs de muchas especies Gram-positivas ⁶⁷.

6.3. Clasificación de las PGHs

Las PGHs pueden ser agrupadas en tres clases principales, las glucosidasas que rompen el esqueleto de glucano (N-acetilglucosidasas y N-acetilmuramidasa), las amidasa que rompen el péptido de cadena lateral (N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa) y las peptidasas (endopeptidasas y carboxipeptidasas) que cortan dentro de la cadena lateral del péptido, que se dividen en función de su sitio de corte ^{67,68,72}.

La representación de los diferentes sitios de acción de las PGHs se presenta en la Figura 8 y se detalla en la Tabla 17.

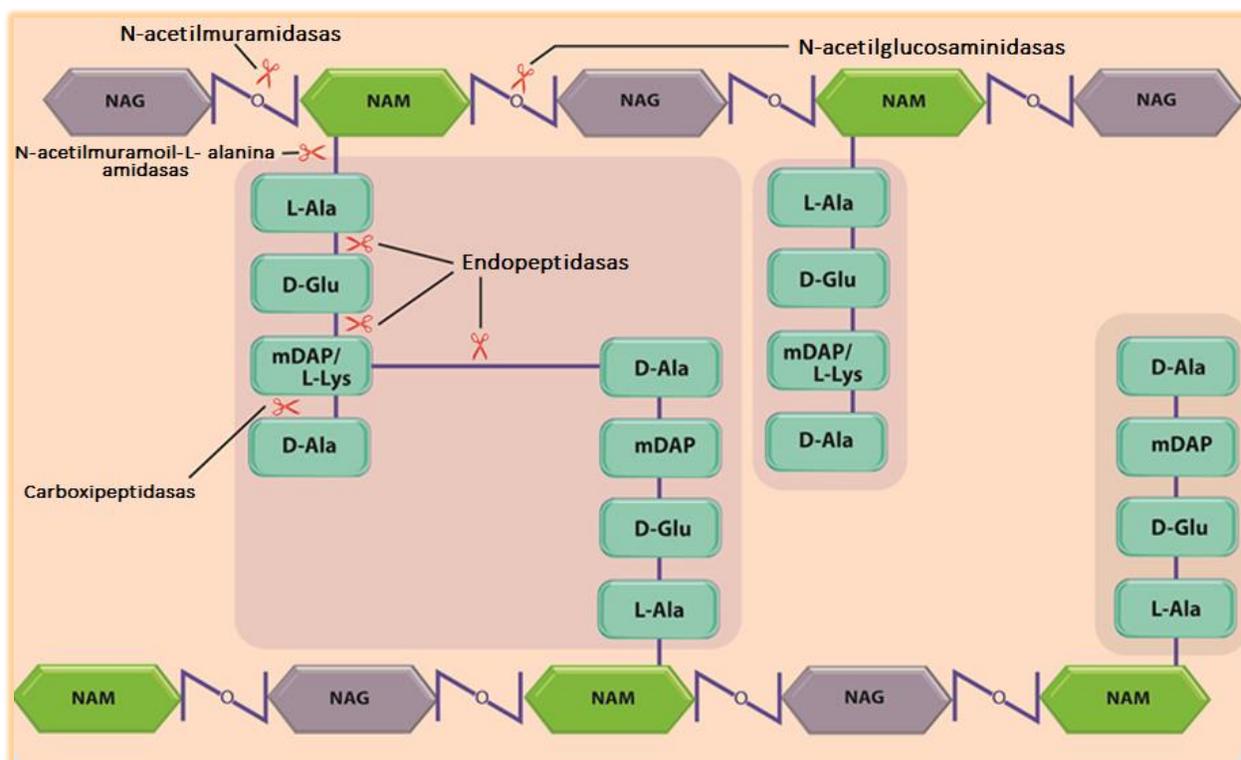


Figura 8. Estructura del peptidoglucano y sitios de acción de las peptidoglucano hidrolasas en la pared celular. (Adaptado de Sharma et al., 2016)





Tabla 17. Sitios de acción de las peptidoglucano hidrolasas (Vollmer et al., 2008; Layec et al., 2008)

| Clases | Enzimas | Reacción química |
|---------------------|------------------------------------|--|
| Glucosidasas | N-acetilglucosaminidasas | Hidrolizan el enlace glucosídico entre residuos de NAG y monosacáridos adyacentes en diferentes sustratos de oligosacáridos. |
| | N-acetilmuramidasa | Hidrolizan el enlace β 1-4 glucosídico entre los residuos de NAM y NAG en el peptidoglucano, pudiendo dejar libre un extremo de NAM reductor, llamadas lisozimas, o formando un anillo 1,6-anhidro en el residuo de NAM, conocidas como transglucosilasas líticas. |
| Amidasas | N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa | Hidrolizan el enlace amida entre NAM y L-alanina |
| Peptidasas | Carboxipeptidasas y endopeptidasas | Cortan los enlaces amida entre aminoácidos en el peptidoglucano, dependiendo de su especificidad, las peptidasas se clasifican como carboxipeptidasas (rompen el enlace C-terminal en una cadena peptídica) o endopeptidasas (rompen el enlace amida entre dos residuos de aminoácidos en una cadena peptídica). |

6.3.1. N-acetilglucosaminidasas

Las N-acetilglucosaminidasas son las encargadas de hidrolizar el enlace glucosídico β 1-4 entre el NAG y NAM en el peptidoglucano, dejando un extremo NAG reductor (Figura 9), por esta razón también son conocidas como endo-N-acetil- β -D-glucosaminidasas ⁶⁷.

Se han reconocido una gran variedad de enzimas producidas por diversos géneros de bacterias que presentan esta actividad (Tabla 18). Siendo las más conocidas: LytB producida por *Streptococcus pneumoniae*, AtlA y AtlD producidas por *Enterococcus faecalis*, Acd la cual es producida por *Clostridium difficile*, y las producidas por *Bacillus subtilis* LytD y LytG. Así mismo, *Lactococcus lactis* tiene tres conocidas AcmA, AcmB y AcmC y una hipotética AcmD.

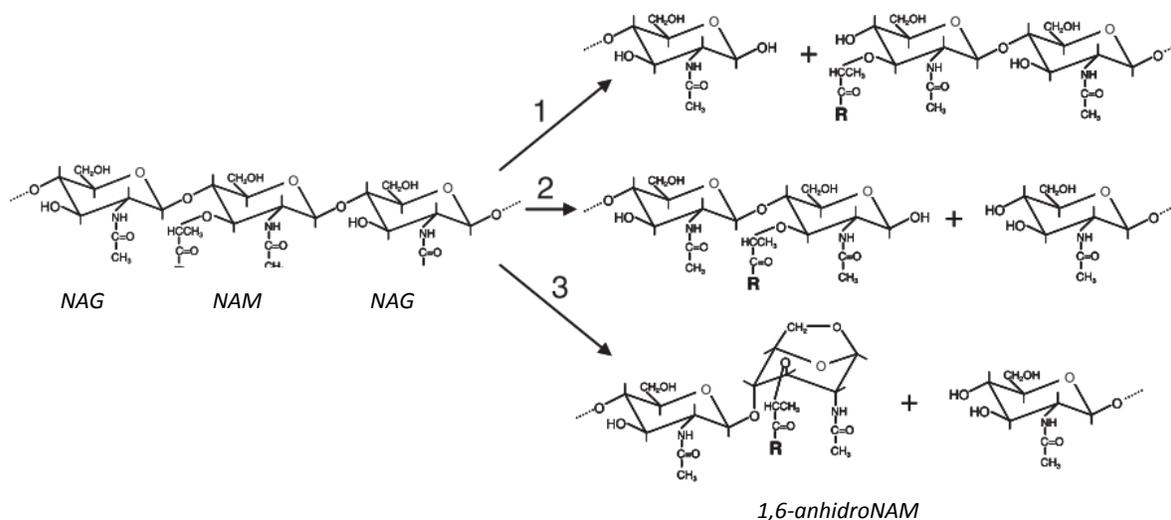


Figura 9. Sitios de acción en el peptidoglucano por (1) N-acetilglucosaminidasas, (2) lisozimas y (3) transglicosilasas líticas. (Adaptado de Vollmer et al., 2008)

6.3.2. N-acetilmuramididasas

Son conocidas también como N-acetil- β -D-muramididasas, y estas enzimas son las encargadas de hidrolizar el enlace glucosídico β 1-4 entre los residuos de NAM y NAG en el peptidoglucano. Este enlace puede dividirse de dos maneras diferentes (Figura 9): las lisozimas, que hidrolizan el enlace glucosídico dando como resultado un NAM reductor, y las transglicosilasas líticas, que rompen el enlace con una



reacción de transglicosilación intramolecular, dando como resultado la formación del anillo 1,6-anhidro en el residuo NAM ⁶⁷.

Hay muy pocas enzimas bien caracterizadas que presentan esta actividad, ejemplo de ellas son las presentadas en la Tabla 19. Siendo una de las más conocidas LytC producida por *Streptococcus pneumoniae*, la cual se sabe que está involucrada en la autólisis celular de este microorganismo, además, contiene un sitio de unión a colina, lo que permite mediar su unión a la pared celular mediante los ácidos teicoicos, lo que es esencial para su actividad ⁷³.

6.3.3. N- acetilmuramoil-L- alanina amidasas

Las N-acetilmuramoil-L-alanina amidasas cortan el enlace amida entre NAM y el residuo de L-alanina terminal del péptido del tallo. Estas enzimas también se conocen como peptidoglucano amidasas, peptidoglucano amidohidrolasas o simplemente amidasas. Se sabe que en la mayoría de los casos, estas enzimas contienen un péptido señal en sus extremos N que permiten su transporte a través de la membrana citoplasmática ⁶⁷.

Algunas de las enzimas producidas por bacterias con actividad de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasas de las que se tiene información actualmente, se presentan en la Tabla 20, dentro de esta clase de enzimas las más conocidas son: LytA, Sk1, Millericina B, CwIC, producidas por *S. pneumoniae*, *S. mitis SK13*, *S. milleri NMSCC061* y *B. thuringiensis* respectivamente.

6.3.4. Peptidasas (Carboxipeptidasas y endopeptidasas)

Estas enzimas son las encargadas de hidrolizar los enlaces amida entre aminoácidos en el peptidoglucano, y dependiendo de su especificidad, se clasifican como carboxipeptidasas (si rompen el enlace C-terminal) o endopeptidasas (si rompen el enlace dentro del péptido). Además, dependiendo del enlace que rompen entre los aminoácidos, las endopeptidasas y las carboxipeptidasas se denominan DD-peptidasas si rompen el enlace entre el D-aminoácido, y se denominan DL o LD-peptidasas si rompen el enlace entre los D- y L- aminoácidos ⁶⁸.





Tabla 18. Enzimas con actividad de N-acetilglucosaminidasas

| Enzima | Microorganismo productor | Información general | Referencias |
|-------------------------|---------------------------------|--|-------------|
| LytB | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Es una proteína de unión a colina, se sabe que es la enzima clave para la separación de células hijas y se cree que desempeña un papel patógeno crítico, facilitando la propagación bacteriana durante la infección. | 99 |
| AcmA, AcmB, AcmC y AcmD | <i>Lactococcus lactis</i> | Se ha demostrado que AcmA participa en la separación celular y en la autólisis, mientras que AcmB sólo contribuye a la autólisis celular. AcmD se cree que está involucrada en la separación celular. | 100 |
| AtIA | <i>Enterococcus faecalis</i> | Es la principal PGH de <i>E. faecalis</i> . Tiene un peso molecular de 72 kDa y otra forma activa de 62 kDa. | 71 |
| AtID | <i>Enterococcus faecalis</i> | Esta PGH presenta dos dominios líticos (N-acetilglucosaminidasa y CHAP), tiene un peso molecular de 62-75 kDa y su punto isoelectrico es de 4.8, su pH y temperatura óptimos son entre 6-7 y 50 °C respectivamente. Mostró actividad antibacteriana contra <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> y cepas enterocócicas de origen clínico. | 78 |
| Acd | <i>Clostridium difficile</i> | Es la primera autolisina conocida involucrada en la hidrólisis de peptidoglucano de <i>C. difficile</i> . | 101 |
| Chb | <i>Serratia marcescens</i> | Es una proteína de 885 aminoácidos. Se ha clonado y expresado en <i>E. coli</i> . | 102 |
| Exo | <i>Bacillus subtilis</i> | Es producida durante la fase de crecimiento logarítmico tardío. La enzima está asociada en parte con la bacteria, pero no se acumula dentro del organismo antes de la liberación. | 103 |
| LytD | <i>Bacillus subtilis</i> | Es una de las principales autolisinas del crecimiento vegetativo. Su actividad autolítica reside dentro de la región C-terminal. | 104 |
| LytG | <i>Bacillus subtilis</i> | Tiene un peso molecular de 32 kDa y es producida durante el crecimiento vegetativo. Se sabe que es la principal glucosaminidasa responsable de la determinación estructural de peptidoglucano durante el crecimiento vegetativo. Está involucrada en la división y lisis celular. | 105 |
| Acp | <i>Clostridium perfringens</i> | Es producida principalmente durante el crecimiento vegetativo y muestra actividad lítica en las paredes celulares de varias especies de bacterias Gram-positivas. En general está implicada en el crecimiento vegetativo y en la autólisis producida por estrés. | 106 |



Tabla 19. Enzimas con actividad N-acetilmuramidasa

| Enzima | Microorganismo productor | Propiedades | Referencia |
|-----------------|--|--|------------|
| Lisozima B | <i>Bacillus licheiformis</i> TIB320 | Presenta un amplio espectro de acción contra varias cepas bacterianas estándar. Tiene una actividad eficiente en un rango de temperaturas de 20 a 60 °C y en un rango de pH de 3 a 9. Es resistente a la pepsina y tripsina en cierta medida a 40 °C, y su producción se ha optimizado utilizando diversas estrategias de expresión en <i>B. subtilis</i> WB800. | 107 |
| Lisozima marina | <i>Bacillus sp.</i> | Tiene un peso molecular de 15.8 kDa. Fue aislada y purificada a partir de un bacilo marino en el Instituto de Investigaciones Pesqueras del Mar Amarillo (YSFRI, por sus siglas en inglés). Se encontró que esta enzima tiene propiedades diferentes a la lisozima extraída de la clara de huevo, como un rango amplio de pH, temperatura y un espectro de acción más amplio. | 81 |
| LytC | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Pertenece al sistema autolítico de <i>Streptococcus pneumoniae</i> y realiza una autólisis lenta con una actividad óptima a 30 °C. | 73 |
| Lisozima SP098 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Consta de 266 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 30 kDa. | 108 |
| Muramidasa-1 | <i>Enterococcus hirae</i> | Tiene un peso molecular de 87 kDa. | 109 |
| Muramidasa-2 | <i>Enterococcus hirae</i> | Esta enzima presenta dos formas activas, una de 125 kDa y otra de 75 kDa. | 109 |
| M-1 y M-2 | <i>Streptomyces globisporus</i> 1829 | Ambas enzimas son diferentes en composición de aminoácidos, propiedades inmunológicas y modos de acción. La enzima M-1 está compuesta por 186 aminoácidos, dentro de los cuales se encuentra cisteína. La enzima M-2 está compuesta por 99 residuos de aminoácidos sin cisteína. La actividad de M-2 se ve comprometida por la presencia de grupos O-acetilo, mientras que la actividad de M-1 es independiente. | 110 |
| AtIB y AtIC | <i>Enterococcus faecalis</i> | Representan las principales actividades hidrolíticas en <i>E. faecalis</i> | 69 |

Tabla 20. Enzimas con actividad de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasas

| Enzima | Microorganismo productor | Información general | Referencias |
|------------------------------|---------------------------------------|--|-------------|
| Cw1B | <i>Bacillus thuringiensis</i> | Tiene un peso molecular 24.5 kDa, y muestra actividad óptima a 37 °C. Se localiza en la envoltura celular de <i>B. thuringiensis</i> , y se sabe que esta enzima participa principalmente en la lisis de las células madre. | 111 |
| AmiA AmiB AmiC AmiD | <i>Escherichia coli</i> | Las tres primeras enzimas tienen una localización periplásmica, mientras que AmpD es citoplasmática. Después de su actividad AmiA, AmiB y AmiC son solubles en el periplasma, mientras que AmiD se sintetiza como pre-lipoproteína para convertirse en una lipoproteína anclada en la membrana externa. | 67 |
| LytA | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Tiene un peso molecular de 36.5 kDa. Es la principal autolisina de <i>S. pneumoniae</i> y para ejercer su actividad requiere de la presencia de residuos de colina en los ácidos teicóicos de la pared celular. Muestra gran eficacia en la desintegración de las biopelículas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> , sin embargo, no destruye las biopelículas formadas por <i>S. pseudopneumoniae</i> o <i>S. oralis</i> . | 80,112 |
| AmiE | <i>Bacillus subtilis</i> 168 | Hidroliza el enlace N-acetilmuramoil-L-alanina de los péptidos del ácido N-acetilmurámico que libera N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurámico y péptidos, pero no hidroliza este enlace de los muropeptidos que contienen N-acetilglucosamina en el extremo no reductor. | 113 |
| SleC | <i>Clostridium perfringens</i> S40 | Se sabe que está involucrada en la hidrólisis de la espora bacteriana durante su germinación. Sin embargo, poco se sabe sobre los detalles de dicho proceso hidrolítico. | 114 |
| Amidasa B | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Muestra actividad óptima a una temperatura de 25 °C y un pH de 6.5. Ha sido clonada y sobre expresada con éxito en <i>E. coli</i> . | 115 |
| Sk1 | <i>Streptococcus mitis</i> SK13 | Muestra actividad óptima a 30 °C y a un pH de 6.5. Su sustrato son las paredes celulares que contienen colina, ya que contiene un dominio cisteína, amidohidrolasas/peptidasas dependientes de histidina (CHAP). Sk1 representa el primer miembro caracterizado de una nueva subfamilia de proteínas que se unen a la colina que contienen CHAP. | 116 |
| Aea | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Se identificó como una proteína asociada a la superficie de 35 kDa, tiene actividad bacteriolítica y se una a la vitronectina. | 117 |
| Millericina B | <i>Streptococcus milleri</i> NMSCC061 | Tiene un peso molecular de 28 kDa, y muestra un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram positivas. Sin embargo, no es activa contra <i>Bacillus subtilis</i> W23, <i>Escherichia coli</i> ATCC486 o su propia cepa productora. | 118 |
| CwC | <i>Bacillus thuringiensis</i> 168 | Es una PGH esencial para la lisis de células madre de <i>B. thuringiensis</i> durante la esporulación. Tiene un peso molecular de 27.9 kDa | 119 |





Tabla 21. Enzimas con actividad de carboxipeptidasas y endopeptidasas

| Enzima | Microorganismo productor | Información general | Referencias |
|--------|---|--|-------------|
| VanY | <i>Enterococcus faecium</i> BM4147 | Es una enzima con una masa molecular de 34.8 kDa. Es codificada por el gen vanY, el cual pertenece a un grupo de genes de resistencia a vancomicina de alto nivel. Es una DD-carboxipeptidasa. | 120 |
| LdcA | <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> D SM 12444 | Es una LD-carboxipeptidasa, la cual cataboliza el enlace entre los dos últimos residuos de aminoácidos L y D en el tetrapéptido para formar el tripeptido. | 121 |
| Pgp2 | <i>Campylobacter jejuni</i> | Es una DL-carboxipeptidasa, la cual influye en la forma helicoidal de este microorganismo, lo que impacta directamente en sus atributos patógenos. | 122 |

6.4. Aplicaciones en la industria de alimentos.

En los últimos años el uso de enzimas con actividad lítica como agentes antibacterianos en la industria de los alimentos ha ido incrementando, debido a que provee diversas ventajas al producto y al consumidor. Dentro de estas ventajas está la eliminación de la colonización bacteriana de las membranas de la mucosa del aparato digestivo, el tratamiento en infecciones provocadas por bacterias y el control de bacterias patógenas en alimentos ⁷⁴.

En la industria de alimentos, la lisozima representa el uso más concreto de peptidoglucano hidrolasas, esta enzima presenta actividad de N-acetilmuramidasa y es considerada como un excelente bioconservador debido a que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y no se considera como aditivo. Sin embargo, la lisozima proveniente del huevo de gallina es la más utilizada como conservador en alimentos como carnes, embutidos, pescado, verduras, frutas, vino y leche en polvo ⁷⁵.

La lisozima es eficaz en la mayoría de problemas de deterioro causados por bacterias Gram positivas, sin embargo, su actividad es menor contra bacterias Gram negativas por la protección de la capa de peptidoglucano por la membrana externa. Esta es una limitación importante de la aplicación no sólo de la lisozima, sino de todas las PGHs como conservantes de alimentos ⁶⁶. La principal aplicación de la lisozima en la industria de alimentos es la protección de quesos semiduros contra *Clostridium tyrobutyricum*, y en el control de la actividad bacteriana en algunas clases de vinos ^{66,76}.

Actualmente, el interés en las PGHs y los nuevos avances en técnicas moleculares, han hecho posible la identificación y caracterización de nuevas enzimas, sin embargo, no han sido probadas como posibles bioconservadores de alimentos.

Las BAL son consideradas por diversos autores como una fuente importante de la producción de PGHs, y pueden tener un uso potencial en el control de patógenos en la industria alimentaria por su categoría GRAS ⁷⁰.

En general las PGHs de amplio espectro pueden ser interesantes para utilizarse en



aquellos alimentos en los que se requiere lograr una prolongación general de la vida útil, mientras que las PGHs de espectro estrecho pueden ser útiles en la eliminación o el control de patógenos y organismos de deterioros específicos ^{66,74}.

Un ejemplo de la aplicación en alimentos, es el uso de lisostafina en leche de vaca, donde se ha demostrado que puede resistir el proceso de pasteurización, por lo que puede tener un amplio efecto durante el almacenamiento de la leche hasta su consumo, además se ha demostrado que tiene un efecto bactericida contra *S. aureus* en diversos tipos de alimentos (Tabla 22) ⁷⁷.

Tabla 22. PGH con aplicaciones en alimentos

| Enzima | Espectro de inhibición | Aplicaciones potenciales |
|--------------------|---|--|
| Lisostafina | <i>S. aureus</i> | Se ha demostrado su efectividad en varios alimentos, como leche, ensalada de mayonesa y carne de cerdo |
| Lisozima | <i>L. monocytogenes</i> <i>Salmonella anatum</i> <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | Muestras de salmón ahumado y quesos semiduros |

Otra enzima interesante es la AtID producida por *Enterococcus faecalis*, ya que muestra actividad contra varias bacterias patógenas alimenticias como *L. monocytogenes* y *S. aureus*, además, al ser aislada de una fuente natural, favorece su fácil adaptación a diversas matrices alimentarias, en donde podría emplearse como aditivo ⁷⁸.

Actualmente, un campo de desarrollo es la incorporación de la lisozima en un nuevo modelo de material de envasado de alimentos “activo”, en aquellos productos alimenticios que se encuentran intactos de una sola pieza o que pueden estropearse fácilmente en su superficie ⁶⁶.



6.5. Aplicaciones Biomédicas

La propagación de cepas resistentes a antibióticos, como ya se ha mencionado, se ha convertido en un problema mundial, se trata de uno de los problemas de salud pública más importantes en la actualidad, ya que se han encontrado cepas que muestran resistencias múltiples, por lo que los tratamientos con antibióticos convencionales, no han logrado solucionar el problema. Las PGHs se han propuesto como una alternativa, sin embargo pocas investigaciones hay al respecto.

Dentro de las aplicaciones en el área biomédica se encuentra el uso de PGHs en el tratamiento contra infecciones causadas por *S. aureus*, como ya es bien conocido, *Staphylococcus aureus* es el mayor patógeno causante de enfermedades nosocomiales incluyendo endocarditis, osteomielitis, neumonía, síndrome de shock tóxico e intoxicaciones alimentarias ⁷⁹. En este sentido se han centrado diversos estudios que han mostrado la efectividad de la lisozima y la lisostafina en el tratamiento contra este patógeno (Tabla 23).

Otro microorganismo patógeno común, es *Streptococcus pneumoniae*, quien es el causante principal de neumonía y meningitis. En el tratamiento contra este patógeno se ha propuesto que LytA (la cual es codificada por este microorganismo), ha sido muy útil para destruir células de *S. pneumoniae* in vitro ⁸⁰, lo que podría ser una interesante aplicación en el área biomédica .

En general, las PGHs de amplio espectro pueden ser interesantes en situaciones en las que se debe controlar una amplia gama de bacterias para lograr una prolongación general de la vida útil, mientras que las PGHs de espectro estrecho, pueden resultar útiles en la eliminación o control de patógenos específicos sin alterar el ecosistema microbiano ⁶⁶, por ejemplo, en el control de patógenos en el tracto gastrointestinal.

Estos estudios, muestran la posibilidad del uso de PGHs como agentes antimicrobianos en varias aplicaciones, incluidas las terapéuticas ⁸¹.





Tabla 23. PGH con aplicaciones biomédicas

| Bacteriocina | Microorganismo productor | Espectro de inhibición | Aplicaciones potenciales | Referencias |
|--------------|---|------------------------|--|-------------|
| Lisozima | <i>Gallus gallus</i> | <i>S. aureus</i> | Tratamiento de la piel y en las infecciones de las mucosas, además, se emplea como ingrediente en algunos ungüentos para curar heridas | 13 |
| Lisostafina | <i>Staphylococcus simulans</i> | SARM | Prevención y control de infecciones en humanos y animales causados por SARM | 84 |
| Zoocina A | <i>Streptococcus zooepidemicus</i> 4881 | <i>S. aureus</i> | Es una PGH similar a lisostafina. Es eficaz en el tratamiento de infecciones causadas por <i>S. aureus</i> . Además, inhibe el crecimiento de <i>S. pyogenes</i> y <i>S. zooepidemicus</i> . | 118 |
| SKl | <i>Streptococcus mitis</i> SK137 | <i>S. pneumoniae</i> | Se han realizado investigaciones que muestran a esta enzima como un posible agente anti neumocócico. | 116 |
| LytA | <i>S. pneumoniae</i> | <i>S. pneumoniae</i> | gran eficacia en la desintegración de las biopelículas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 112 |

SARM: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

6.6. Peptidoglucano hidrolasas de importancia industrial

6.6.1. Lisozima (E.C. 3.2.1.17)

Se trata de una enzima antimicrobiana caracterizada por una sola cadena polipeptídica. Está clasificada como GRAS por la FDA y como aditivo alimentario por la Unión Europea con actividad bacteriostática, bacteriolítica y bactericida ⁸².

Su principal aplicación es en la industria quesera para la protección en los quesos frente a bacterias dañinas como *Clostridium tyrobutyricum*, que provoca la hinchazón de los quesos. Sin embargo, también se utiliza para conservar otros alimentos como pepinillos, pescado, carne, frutas y fideos.

La acción antimicrobiana de la lisozima está mediada por su actividad muramidasa, que cataliza la hidrólisis de los enlaces β 1-4 de NAM y NAG ¹³. Presenta un mayor espectro de acción en bacterias Gram positivas, debido a que el 90% de su pared celular está compuesta por peptidoglucano, lo que las hace muy susceptibles a la actividad antimicrobiana de la lisozima, pero también muestra actividad contra algunas bacterias Gram negativas a través de diversos mecanismos que involucran un efecto sinérgico con otros compuestos que le permitan acceder al peptidoglucano que se encuentra protegido contra la membrana externa ^{82,83}.

Naturalmente, la lisozima se encuentra en muchos organismos como virus, insectos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, se produce en tejidos y fluidos, sin embargo es de la clara de huevo de donde se obtiene para su uso industrial ¹⁴.

6.6.2. Lisostafina (E.C. 3.5.1.28)

Es una de las PGHs más estudiadas recientemente, es producida por *Staphylococcus simulans* y se sabe que es altamente específica a *S. aureus*. Esta enzima es una metaloproteasa dependiente de Zn^{2+} , y tiene un peso molecular de 27 kDa ⁸⁴. El objetivo natural de la lisostafina es el enlace interpeptídico pentaglicina, por esta razón su actividad se limita a *Staphylococcus aureus* y microorganismos relacionados.



7. Aditivos alimentarios y su regulación en alimentos

Por definición del acuerdo publicado por la Secretaria de Salud en el Diario Oficial de la Federación el 16 de Julio del 2012, se entiende como aditivo alimentario *«cualquier sustancia que en cuanto a tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición al producto con fines tecnológicos en sus fases de producción, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del producto o un elemento que afecte a sus características (incluidos los organolépticos). Esta definición no incluye "contaminantes" o sustancias añadidas al producto para mantener o mejorar las cualidades nutricionales»* ⁸⁵.

A nivel Nacional, la dependencia encargada de la regulación de aditivos es la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios) bajo la supervisión de la Secretaria de Salud, mediante el acuerdo publicado en el Diario Oficial de la Federación el 16 de Julio del 2012. En el cual se establece un listado referente a partir del cual pueden establecerse los límites máximos de aditivos en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios ⁸⁵.

A nivel mundial el órgano responsable de la evaluación de riesgos de los aditivos para la salud humana es el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), que es un grupo internacional e independiente de expertos científicos que es administrado por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura) y la OMS (Organización Mundial de la salud) ^{86,87}.

Este comité se encarga de comprobar la inocuidad de los aditivos dando su aprobación a aquellos que no presentan algún riesgo sanitario apreciable para los consumidores ^{87,88,89}.

En Estados Unidos, la FDA (Food and Drug Administration) es el órgano responsable de proteger la salud pública mediante la regulación de alimentos (tanto para personas como para animales), medicamentos de uso humano y veterinario,



cosméticos, vacunas y otros productos biológicos. Y en Europa su uso es regulado por la EFSA (European Food Safety Authority) que es una agencia financiada por la Unión Europea ⁹⁰, la cual dispone de una lista de aditivos permitidos para su uso en alimentos, la cual es aceptada en todos los países miembros, aunque también se admite que cada país incorpore alguno dentro de sus fronteras. A cada una de las sustancias incluidas en esta lista se le asigna un “Número E”, para su identificación inequívoca ⁹¹.

7.1. Aceptabilidad de un aditivo alimentario

Las listas de aditivos permitidos, prohibidos o restringidos en México, pueden ser modificadas para la adición de nuevos aditivos a petición de cualquier interesado, de conformidad con el artículo 208 del RCSPS (Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios), o cuando se proporcionen a la Secretaría de Salud las evaluaciones y probaciones del JECFA, el *Codex Alimentarius*, la Unión Europea y/o de los Estados Unidos de América ⁸⁵.

De acuerdo al artículo 208 del RCSPS para la aprobación de un aditivo se debe proporcionar a la Secretaría de salud la siguiente información:

- I. Nombre genérico y común, si se trata de una sustancia química, o el género y especie, si se trata de un producto derivado de un vegetal o animal.
- II. Cuando proceda, la fórmula química condensada y estructural, si se conoce.
- III. Justificación de su función tecnológica.
- IV. Estudios toxicológicos de origen nacional o extranjero, a corto, mediano y largo plazo en los que se incluya la DL₅₀ en animales mamíferos de laboratorio y la ingestión diaria admisible (IDA) para evaluar su inocuidad, especialmente en relación con el cáncer y sus efectos teratogénicos, si es el caso.
- V. Métodos analíticos para determinar su identidad, pureza y contaminantes.



- VI. Los productos en los que se propone su empleo y proporción, de manera que ésta no rebase los márgenes de seguridad, a fin de determinar si su uso representa un riesgo para la salud del consumidor.

7.2. Evaluación de la seguridad de un aditivo ⁸⁸

Para determinar la aceptabilidad de un aditivo nuevo, se deben tener estos conceptos fundamentales que sirven de guía para aceptar la sustancia como tal:

- Cumple un fin tecnológico en la producción, procesamiento, acondicionamiento, envase, transporte o almacenamiento del alimento.
- Contribuye a mantener la calidad nutritiva del alimento, previniendo la destrucción de compuestos importantes del mismo.
- Contribuye a mejorar y/o mantener las características organolépticas, la conservación y/o estabilidad del alimento.

Así mismo, para establecer si una sustancia propuesta como aditivo puede utilizarse como tal, se requiere conocer:

- La estructura química y las propiedades físicas (solubilidad, densidad, etc.) y químicas de la sustancia, para que su determinación cualitativa y cuantitativa sean factibles.
- Verificar que el aditivo cumple con las normas de identidad y pureza fijadas por JECFA, siendo necesario también establecer la naturaleza y cantidad de las impurezas que pueden acompañar al aditivo.
- Evaluación de la toxicidad, la cual no debe deducirse únicamente de la consideración de la estructura química y las propiedades de la sustancia. Bajo este contexto se debe determinar su clasificación en:
 - a) Tóxicos que actúan a cierta concentración. Por debajo de una dosis límite son desdoblados y excretados sin causar daños.
 - b) Tóxicos que actúan por acumulación en ciertos tejidos o componentes del organismo, que provocan daños al alcanzar cierta concentración.
 - c) Tóxicos que actúan por suma de las dosis ingeridas de manera que al alcanzarse cierta dosis total, se produce la aparición del daño.



8. Aspectos regulatorios del uso de bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas ⁹²

Con la aprobación de nisina y lisozima como compuestos antimicrobianos de origen natural, hay un reciente interés por la aprobación de diferentes bacteriocinas y PGHs producidas por bacterias.

En la base de datos de JECFA se pueden encontrar las monografías de nisina y lisozima (Anexo I y II), en las que se pueden observar las especificaciones de identidad y pureza establecidas por este comité de expertos científicos. Estas monografías tienen como objetivo asegurar que las evaluaciones de inocuidad del comité se aplican con un alto grado de fiabilidad, a todos los aditivos alimentarios.

Para la elaboración de las monografías, el comité solicita información sobre la sustancia que se requiera revisar como nuevo aditivo. La formulación de las especificaciones requiere que se ponga a disposición del comité información detallada sobre el método de fabricación del compuesto, incluida la información sobre las materias primas y su caracterización química ⁹³.

En el caso de las bacteriocinas se consideran como aditivos que *no son preparados enzimáticos ni aromatizantes*, por lo que sus especificaciones deben incluir los siguientes datos ⁹³:

1. Título: Se debe elegir el que, en opinión del JECFA, mejor identifique a la sustancia o sustancias especificadas.
2. Sinónimos: Se enumerarán los nombres, acrónimos y siglas con los que se conoce de manera común a la sustancia, aparte del utilizado en el título.
3. Definición: Esta sección deberá contener información sobre las materias primas utilizadas en la fabricación del compuesto, junto con una breve descripción de los aspectos más destacados del método de fabricación.
 - Denominación química: Si existe una denominación de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) para un aditivo se deberá incluir.



- Número o números CAS: Se presentará el número de registro del CAS del compuesto.
 - Fórmulas químicas y estructurales del compuesto.
 - Peso del preparado: El cual corresponde al peso molecular, calculado a partir de los valores que proporciona la IUPAC en su tabla de pesos atómicos normalizados.
 - Análisis: Se especificará el contenido mínimo admisible o el intervalo del contenido máximo admisible del compuesto.
4. Descripción: En esta sección se proporcionará la información sobre el aspecto físico y otras propiedades importantes, por ejemplo estabilidad y olor.
 5. Usos funcionales: Se debe incluir la función tecnológica del aditivo, puede tener más de una.
 6. Características
 - Identificación: Se proporcionan los criterios de identificación que suelen incluir la solubilidad en agua, la solubilidad en disolventes orgánicos, reacciones cromáticas, espectros de absorción y valores de pH.
 - Pureza: Se proporcionan los aspectos relacionados con la pureza del compuesto, tales como los límites de impurezas, los cuales se basan en la información disponible sobre el proceso de fabricación del compuesto. Así mismo, si corresponde, se incluyen los criterios de pureza microbiológica.
 7. Pruebas
 - Pruebas de identificación: Son los principios básicos del método de análisis, en los cuales se incluye normalmente la parte narrativa, junto con los detalles de los apartados y los reactivos, el procedimiento analítico y el método para calcular los resultados.
 - Pruebas de pureza: En esta sección se describen a detalle los procedimientos de prueba a los que se ha hecho referencia en la sección “Características de pureza”, se incluyen los detalles de los



equipos y reactivos, el procedimiento analítico y el método para calcular los resultados.

8. Método de análisis: Éste debe incluir una descripción de sus principios, una enumeración de los equipos y reactivos necesarios, detalles del procedimiento analítico y el método para calcular los resultados.

En el caso de nisina, en su monografía se muestran todos los requisitos antes descritos. Se presenta la definición del compuesto y el microorganismo del cual proviene: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Además, de manera muy general se mencionan las condiciones de su producción, purificación y presentación comercial. Posteriormente, se encuentran su fórmula química, su forma estructural, peso molecular y análisis.

En el caso de las peptidoglucano hidrolasas, éstas pueden considerarse como *preparados enzimáticos*, por lo que deben cumplir las *Especificaciones y consideraciones generales para preparados enzimáticos utilizados en la elaboración de alimentos*. Los preparados enzimáticos deben satisfacer los criterios de las especificaciones que figuran en las distintas monografías, las cuales suelen incluir los apartados que se enumeran a continuación ⁹³:

1. Título: Se incluye el nombre dado al preparado enzimático, que normalmente coincide con el de la actividad o actividades enzimáticas que caractericen al preparado con mayor precisión.
2. Sinónimos: Esta sección incluye nombres y siglas por los que se conoce comúnmente a la sustancia, a parte de los utilizados en el título.
3. Origen: En esta sección se identifica el origen (animal, vegetal o microbiano) de la materia de la que se ha derivado el preparado enzimático. También se deberán indicar, si corresponde, las especies, cepas o variantes, los números de cepa y los números de plásmido, cuando proceden de colecciones o depositarios de cultivo reconocidos (por ejemplo, la ATCC). En los casos en que el organismo de origen ha sido obtenido mediante técnicas de ADN recombinante, se incluye una descripción de este proceso y la identificación del organismo huésped.



- Principios activos: Aquí se enumerarán las principales actividades enzimáticas que presenta el preparado.
 - Denominaciones y números sistemáticos: Si existen, se enumerarán las denominaciones sistemáticas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, por sus siglas en inglés) y los números de la Comisión de Enzimas (CE) para cada principio activo.
 - Reacciones catalizadas: Esta sección incluye la descripción de los sustratos sobre los cuales actúa el preparado enzimático, las reacciones catalizadas y los productos resultantes.
 - Actividades enzimáticas secundarias: Se enumerarán, si corresponde, las actividades secundarias que se pueden presentar.
4. Descripción: Ésta incluye información sobre el aspecto físico, junto con otra información sobre la solubilidad en agua, la solubilidad en disolventes orgánicos y los detalles pertinentes del proceso de fabricación. También, se incluye en esta sección información sobre los diluyentes, portadores, estabilizadores, conservantes y agentes de inmovilización que puedan estar presentes en productos comerciales.
 5. Usos funcionales: Se exponen las funciones tecnológicas, principales y secundarias, del preparado enzimático tal como se utiliza en los alimentos.
 6. Características
 - Identificación: Se enumeran las actividades enzimáticas de los principios activos.
 7. Pruebas: Aquí se incluyen los métodos de análisis aplicables a las actividades enzimáticas de los principios activos enumeradas en la sección de características.

En el caso de la enzima lisozima, únicamente podemos encontrar su definición. En la cual se dice que es obtenida de la clara de huevo, su peso molecular, número de aminoácidos por el cual está compuesta y la especificidad de su actividad hidrolítica.



En ambas monografías podemos encontrar su uso funcional y sus características de identificación, en la de nisina, además de las características de identificación, también se presentan sus características de pureza.

La reglamentación y los requisitos del uso de estos compuestos como aditivos alimentarios, no se encuentran regulados por algún organismo en México. Sin embargo, se puede encontrar información detallada sobre su regulación en Estados Unidos, la cual se encuentra cubierta principalmente por la FDA. Esto tendría la ventaja de que al cumplir con sus requisitos sanitarios y fitosanitarios se podrían exportar alimentos con esta tecnología a Estados Unidos, además, al proporcionar a la Secretaría de Salud la evaluación y aprobaciones de este organismo, se podría modificar la lista de aditivos permitidos en México.

Algunos requisitos importantes para documentar la seguridad y la aprobación del uso de bacteriocinas o PGH genéticamente modificadas o derivadas de la fermentación como conservantes naturales en los alimentos se presentan en este capítulo.

8.1. Factores involucrados en la aprobación de bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas como aditivos ⁹²

Las disposiciones que afectan principalmente a la seguridad de los alimentos están incluidas en el Código de Regulaciones Federales (CFR) número 21, sección 402. Por lo que la FDA puede tomar medidas contra un alimento si establece que un compuesto añadido puede volverlo dañino para la salud. Desde 1958 se enmendó la Ley Federal de alimentos, medicamentos y cosméticos (FD&C Act, por sus siglas en inglés), para exigir la aprobación previa a la comercialización de sustancias químicas que se agregarían a los alimentos para efectos técnicos, tales como dulzor, textura y conservación. La aprobación de aditivos alimentarios naturales está sujeta a dos estándares de seguridad:

1. Científicos considerados como expertos calificados reconocen la seguridad del uso propuesto de la sustancia.



2. La historia del uso de la sustancia depende del uso seguro documentado en los alimentos antes de 1958.

Las bacteriocinas o PGHs purificadas que se agregarán a los alimentos como conservadores deben ser reguladas por la FDA como aditivos alimentarios o sustancias GRAS. En este caso, si la bacteriocina o PGH es una sustancia para la cual no se pudo establecer el historial de su uso anterior a 1958, el fabricante deberá presentar una petición de aditivos alimentarios, la cual debe contener información extensa de las propiedades físicas y químicas de la sustancia, su uso previsto y su seguridad. Si la FDA al realizar la evaluación acepta que el uso propuesto es seguro, emitirá una reglamentación que describirá el aditivo y las condiciones en las que está aprobado su uso. Por otro lado, si se puede documentar la presencia de la bacteriocina o PGH en la ingesta de alimentos antes de 1958 y se ha consumido de forma segura, el fabricante puede presentar una petición GRAS y solicitar que la FDA afirme su uso como GRAS.

Bajo estas condiciones, en el caso de las bacteriocinas o PGHs que se han consumido de forma segura durante generaciones, se puede argumentar que son ingredientes GRAS y solicitar su aprobación como tal por la FDA.



8.2. Información requerida por la FDA ⁹²

Cuando se presenta una petición de aditivos alimentarios o una afirmación de GRAS, la FDA requerirá información general sobre la bacteriocina o PGH que se quiera aprobar (Tabla 24).

Tabla 24. Información general solicitada por la FDA de la bacteriocina o PGH para ser evaluada como aditivo

| | |
|--|---|
| Identidad y uso propuesto | Nombre formal y sinónimos Estructura Formula química Peso molecular pureza Sensibilidad a pH, temperatura y enzimas |
| Descripción del proceso de Fabricación | Microorganismo productor Proceso de fermentación Purificación del compuesto Estandarización del producto final |
| Métodos analíticos | Presencia Potencia Estabilidad de la bacteriocina |
| Eficacia como agente antimicrobiano | Espectro de inhibición |
| Ingesta estimada | Índice de Ingesta Diaria Admisible (IDA) |
| Evaluaciones de seguridad y pruebas de toxicidad | Propiedades toxicológicas y alergénicas |

- **Identidad y uso propuesto.**

Se debe definir la identidad y el efecto técnico de la bacteriocina o PGH. La FDA solicitará el nombre formal y sinónimo del compuesto, estructura y fórmula química, peso molecular, pureza y límites de impurezas de la preparación de la bacteriocina o PGH para agregar a los alimentos, y su sensibilidad al pH, temperatura y la digestión proteolítica.

- **Descripción del proceso de fabricación**

La seguridad de las bacteriocinas o PGHs producidas por fermentación dependerá de todos los pasos del proceso, tales como:



- i. *Bacteria productora*. Las características y como se ha desarrollado para realizar su función prevista.
- ii. *Proceso de fermentación*. Incluyendo los sustratos, el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento.
- iii. *Purificación*. Los procedimientos de aislamiento y todos los pasos en el proceso de purificación.
- iv. *Estandarización del producto final*.

Las buenas prácticas de fabricación deben ser fundamentales en el proceso de producción, se deben identificar las impurezas y establecer las especificaciones para cada producto.

- **Métodos analíticos**

El fabricante debe proporcionar las descripciones detalladas de los procedimientos analíticos utilizados para determinar la presencia, potencia y estabilidad de la bacteriocina o PGH y sus productos de degradación en los alimentos.

Los métodos analíticos proporcionados por el fabricante deben ser específicos, precisos y confiables.

- **Eficacia**

Se debe proporcionar evidencia de que la bacteriocina o PGHs actúa como agente antimicrobiano contra patógenos transmitidos por alimentos específicos u organismos de deterioro a los niveles esperados de adición. La bacteriocina o PGH deberá ser probada en varios niveles de adición en aquellos productos alimenticios para los cuales se solicitará su aprobación.

- **Ingesta Estimada**

Se debe determinar el consumo diario estimado de la bacteriocina o PGHs en los productos alimenticios a complementar. Si el compuesto se utilizará en varios productos alimenticios diferentes, se debe proporcionar una estimación de cuánto debe ingerir el consumidor típico de todas las fuentes.



- ***Evaluaciones de seguridad y pruebas de toxicidad***

Aunque las bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas se han consumido naturalmente durante años sin presentar efectos adversos en la salud de los consumidores, la FDA podría presentar cierta preocupación sobre las propiedades toxicológicas y alergénicas que podrían estar asociadas con la cantidad elevada del compuesto en los productos alimenticios. Por lo que la cantidad de bacteriocina o PGH que deberá agregarse a los alimentos para su conservación, debe compararse con la cantidad producida de manera natural por los microorganismos. Si el nivel que debe agregarse es significativamente más alto que el que se produce naturalmente, puede ser necesaria una evaluación de la seguridad adicional.



8.3. Factores que afectan la aprobación regulatoria de las cepas productoras de bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas ⁹²

Los microorganismos que se utilizan en los alimentos, como las bacterias utilizadas en la producción de lácteos fermentados, carne y productos vegetales, son considerados GRAS, debido a que se consideran un componente integral de estos alimentos y, aunque se han utilizado con seguridad para un propósito, deben estar documentados de forma segura si se van a utilizar para un propósito diferente.

Por ejemplo, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* se considera GRAS en la producción de ciertos productos lácteos fermentados, sin embargo, puede no ser considerada GRAS si se utiliza como conservador en ensaladas refrigeradas no fermentadas o si se usa en la producción de un compuesto que se agregará a los alimentos.

La legislación GRAS señala que es el uso de la sustancia y no la sustancia en sí misma lo que es elegible para un certificado GRAS. Es decir, el estatus GRAS no se otorga ni a una institución o persona, ni a una sustancia determinada. GRAS se otorga a un “*uso específico de una sustancia*”. Para otros usos de esa misma sustancia se deberá solicitar otro GRAS ⁹⁴.

Dicho esto, si los microorganismos productores de bacteriocina o PGH se van a utilizar para un nuevo propósito, se deben considerar muchas de las condiciones descritas anteriormente para ingredientes puros.

En el caso de que únicamente se aumente la capacidad de producción del compuesto en un microorganismo (ya sea mediada por plásmidos o mediante mutagénesis química), la mejora genética por métodos tradicionales no requiere aprobación reglamentaria si el microorganismo se utilizará para un propósito donde ha sido aprobado, aunque el resultado sea un aumento de las concentraciones de la bacteriocina o PGH en el producto alimenticio final y una mayor exposición a los consumidores.



8.4. Factores que afectan la aprobación regulatoria de cepas genéticamente modificadas productoras de bacteriocinas o peptidoglucano hidrolasas ⁹²

Como ya se ha mencionado anteriormente, se ha empleado ingeniería genética como una estrategia alternativa para la construcción de cultivos iniciadores productores de bacteriocinas o PGHs, como el caso de la pediocina PA-1. Hasta la fecha, la FDA no ha promulgado nuevas pautas regulatorias para organismos genéticamente modificados. Las aplicaciones se han manejado caso por caso aplicando las regulaciones ya en uso. Dentro de las consideraciones de evaluación de seguridad específicas de la FAO/OMS se encuentran las siguientes:

- ***Caracterización de la modificación genética***

La secuencia de ADN que se vaya a insertar al microorganismo huésped debe estar completamente caracterizada, para asegurar que no codifica para una sustancia nociva. Se favorece el uso de ADN aislado de microorganismos utilizados previamente en alimentos, ya que es menos preocupante que el ADN aislado de un microorganismo no consumido.

De igual manera, se debe detallar la estrategia general de construcción. En el caso de las bacteriocinas o PGHs, la secuencia de ADN que la codifique debe documentarse y confirmarse mediante análisis de secuencia, mapeo de restricción y técnicas de hibridación para asegurar que no esté presente ADN adicional. Todos los organismos que se usan para donar material genético o que se utilizan como huéspedes intermediarios también deben estar bien caracterizados.

- ***Origen e identidad del microorganismo huésped***

Se prefiere el uso de microorganismos que se haya demostrado que son seguros para su uso en alimentos. Se debe confirmar la identidad taxonómica, particularmente si el microorganismo está aislado del entorno natural. Esto con el fin de poder predecir la posible presencia de toxinas, factores de virulencia o impurezas que deben evaluarse.



- **Vectores**

Deben estar bien caracterizados, para garantizar que no se produzcan sustancias nocivas, ya que la construcción final se convertirá en un parte integral de los alimentos y será consumido. Por lo que son deseables aquellos vectores de calidad alimentaria derivados de microorganismos reconocidos por tener un historial de uso seguro en alimentos. Estos vectores no contienen marcadores que codifiquen resistencia a antibióticos utilizados terapéuticamente. Así mismo, es deseable que se mantengan en forma estable y que la transferencia de rasgos a otros microorganismos sea mínima.

- **Marcadores de selección**

Los marcadores de resistencia a antibióticos son los más utilizados por ser más útiles, sin embargo, no son aceptables para la ingeniería genética de cultivos microbianos iniciadores. Esto se debe a que el ADN que codifica la resistencia a los antibióticos puede transferirse a microorganismos patógenos en el intestino, haciéndolos resistentes a la terapia clínica.

Además de los marcadores de la resistencia antibióticos, existen los marcadores de genes que codifican una enzima que lleva acabo una reacción identificada con facilidad, por ejemplo, una enzima clave en la síntesis de un aminoácido (marcador auxotrófico). Cuando se utiliza un marcador auxotrófico, la célula huésped es capaz de crecer en un medio de cultivo pobre en nutrientes que no contenga dicho aminoácido ⁹⁵.

- **Efectos pleiotrópicos**

La inserción de material genético en un huésped bacteriano podría causar efectos pleiotrópicos no intencionales.

- **Patogenicidad y toxicidad**

Los microorganismos destinados a ser empleados en el procesamiento de alimentos, deben ser microorganismos que se conocen o que se ha demostrado mediante pruebas que están libres de rasgos que confieren patogenicidad. Si el



microorganismo huésped tiene historial de uso seguro, y la fuente de ADN proviene de un microorganismo de grado alimentario, hay pocas posibilidades de que el ADN introducido codifique un tipo de toxina. Sin embargo, en casos diferentes, el ADN introducido puede examinarse para determinar la ausencia de secuencias del tamaño y el patrón de las toxinas conocidas, y en casos de duda, utilizarse ensayos *in vivo* e *in vitro* para confirmar la ausencia de las toxinas.

- ***Alergenicidad***

Ciertas proteínas y glicoproteínas provocan respuestas alérgicas en individuos sensibles, sin embargo, se sabe que la mayoría de ellas son digeridas en el tracto gastrointestinal, por lo que es importante documentar la susceptibilidad de la bacteriocina o PGH específica a la escisión proteolítica por enzimas digestivas.

- ***Nivel de ingesta***

Debe determinarse la evaluación de los cambios en la dieta o en los patrones de exposición resultantes del uso de un cultivo iniciador productor de bacteriocina o PGH genéticamente modificado. Se deben identificar los grupos de población que se podría esperar que consuman niveles altos del producto donde se empleará.



9. Conclusiones

Las bacteriocinas y PGHs presentan aplicaciones potenciales muy interesantes en diversas áreas de la industria, que van desde su aplicación como aditivo alimentario, hasta la aplicación de estas tecnologías en medicina, veterinaria, cosméticos, etc.

Sin embargo, el empleo de estos péptidos producidos por BAL frente a infecciones bacterianas, aún no es del todo estudiado, apenas se están estableciendo las bases para emplearlos como alternativa a la falta de compuestos debido a la resistencia que muchas bacterias han desarrollado a los antibióticos.

Las bacteriocinas, en particular, han demostrado ser eficaces en el control de diversos microorganismos y han tenido una exitosa aplicación en los alimentos, donde la bioconservación que brindan se considera una tecnología de barrera que combinada con otros métodos de conservación, como la refrigeración, y junto con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) pueden ser una opción interesante para disminuir la adición de conservadores químicos, proporcionando alimentos seguros. Además, están siendo el centro de atención de numerosos estudios frente a patógenos comunes en clínica como terapias antimicrobianas alternativas, en donde estos péptidos pueden proveer parte de la solución, por lo que se están estableciendo como una tendencia en el campo de las composiciones farmacéuticas y en los métodos de tratamiento antibacteriano.

En el caso de las PGHs, una de las características interesantes que presentan es que generalmente no dañan a otros microorganismos, ya que el peptidoglucano se produce exclusivamente en las bacterias. Las investigaciones han dado lugar a una amplia gama de PGHs, sin embargo sus posibles aplicaciones no se han estudiado, únicamente se han propuesto.

En el caso de la industria de alimentos, muchas bacterias que son causantes de deterioro o patógenas son Gram negativas, lo que es un obstáculo para las PGHs por la presencia de su capa externa de lipopolisacárido. Sin embargo, pueden considerarse estrategias diferentes para eliminar esta posible barrera, que favorezca que las bacterias Gram negativas puedan sensibilizarse a las PGHs por



compuestos específicos que favorezcan la permeabilización de la membrana externa, y las bacteriocinas pueden ser una opción atractiva para favorecer un efecto sinérgico.

La aplicación de bacteriocinas y PGHs, o sus microorganismos productores puede ser interesante y muy deseable, teniendo en cuenta que la confianza de los consumidores en los compuestos sintetizados químicamente es cuestionada.

Sin embargo, presentan diversas desventajas en la industria, como que su uso es altamente regulado por diversas instituciones nacionales e internacionales, así mismo que la composición de la matriz en la que estos compuestos deseen emplearse, las propiedades y los procesos tecnológicos empleados, pueden influir en la estabilidad y actividad de estos compuestos, por lo que su uso debe estar especificado para cada aplicación.

Hoy en día, los estudios de las aplicaciones de las bacteriocinas o PGHs solas o en combinación entre ellas u otros compuestos químicos, con métodos físicos que permitan actuar de forma sinérgica frente a bacterias patógenas y/o de deterioro se está esclareciendo, ya que la aplicación de múltiples barreras (físicas, químicas y biológicas) en el control de microorganismos, puede tener un efecto inhibitor aditivo o sinérgico, sobre todo si actúan sobre distintas áreas del microorganismo. En este caso el uso de bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas en conjunto, puede ser una aplicación interesante, ya que, mientras las bacteriocinas forman poros en la membrana celular, la actividad por la acción de las peptidoglucano hidrolasas se puede ver favorecida.

Otra metodología que resulta interesante es la identificación de las secuencias genéticas que codifican la producción de estos compuestos antimicrobianos, ya que mediante ingeniería genética se pueden clonar en varios géneros de BAL, por ejemplo en: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sakei*, lo que resultaría prometedor en la conservación de diversos productos de alimentos.

En este sentido, el uso de estos compuestos representa beneficios notorios, por lo que el conocer los sistemas que regulan la expresión de los genes involucrados en



la producción de estas moléculas puede llevar a la generación de cepas sobreproductoras, las cuales se pueden emplear para su uso directo o para la producción únicamente.

Esta revisión bibliográfica demuestra que existen otras bacteriocinas y PGHs además de nisina y lisozima que pueden emplearse con éxito en la industria de alimentos, y además su aplicación puede verse extendida a otras áreas de la industria. Además, se espera que proporcione perspectivas interesantes para el desarrollo de nuevos productos funcionales basados en bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas.



10. Referencias

1. Barboza-Corona, J. E., Vázquez-Acosta, H., Salcedo-Hernández, R. & Bautista-Justo, M. Probióticos y Conservadores Naturales en Alimentos. *Acta Univ.* **14**, 32–38 (2004).
2. Olvera-garcía, M., Serrano-Maldonado, C. & Quirasco, M. Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. *BioTecnología* **19**, 25–43 (2015).
3. Beuchat, L. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. *Microbial Food Contamination* (Wilson, C. & Droby, S.) 149–169 (CRC Press, 2000).
4. Davidson, P. M., Taylor, T. M. & Schmidt, S. E. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* 765–801 (ASM Press, 2013).
5. Chemical Safety Facts. Conservadores. (2018). Available at: <https://www.chemicalsafetyfacts.org/es/conservantes/>.
6. Rodríguez-Sauceda, E. N. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai* **7**, 153–170 (2011).
7. Silva, M. M. & Lidon, F. C. Food preservatives - An overview on applications and side effects. *Emirates J. Food Agric.* **28**, 366–373 (2016).
8. Mccann, D. *et al.* Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet* **370**, 1560–1567 (2007).
9. Song, P., Wu, L. & Guan, W. Dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines intake and the risk of gastric cancer: A meta-analysis. *Nutrients* **7**, 9872–9895 (2015).
10. Raybaudi, R., Soliva, R. & Martín, O. Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas. *Ra Ximhai* **7**, 153–170 (2006).



11. García-García, R. M. & Palou-García, E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas Sel. Ing. Aliment.* **2**, 41–51 (2008).
12. López-Malo, A. La preservación multiobjetivo de alimentos: efecto de factores tradicionales emergentes en la respuesta de *Aspergillus flavus*. *Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires* (2011).
13. Carrillo, W. Lisozima: Actividad antibacteriana y alergenicidad. *Actual. en Nutr.* **14**, 314–326 (2013).
14. Mine, Y., Ma, F. & Lauriau, S. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 1088–1094 (2004).
15. Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, E. J. & Hugenholtz, J. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek* **69**, 193–194 (1996).
16. Carr, F. J., Chill, D. & Maida, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**, 281–370 (2002).
17. Monroy, C. & Fernández, F. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS* **73**, 63–72 (2009).
18. Salminen, S., Von Wright, A. & Ouwehand, A. Lactic Acid Bacteria (BAL). in *Microbiological and Functional Aspects* **3**, 375–398 (2012).
19. Noordiana, N., Fatimah, A. B. & Mun, A. S. Antibacterial agents produced by lactic acid bacteria isolated from Threadfin Salmon and Grass Shrimp. *Int. Food Res. J.* **20**, 117–124 (2013).
20. Ramírez, J. C., Ulloa, P., Velázquez, M., Ulloa, J. & Arce, F. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Rev. Fuente año 2* **7**, 1–16 (2011).
21. Peterbauer, C., Maischberger, T. & Haltrich, D. Food-grade gene expression



- in lactic acid bacteria. *Biotechnology* **6**, 1147–1161 (2011).
22. Concha-Meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C. & Fuentes, R. Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control* **22**, 485–489 (2011).
 23. Fernández Villa, K. J., Chanci Echeverri, I. C., Wilches López, L. & Cardona Arias, J. A. Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibidor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. *Rev. Biosalud* **13**, 45–61 (2014).
 24. Vásquez, S.; Suárez, H. y Zapata, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev. Chil. Nutr.* **36**, 64–71 (2009).
 25. Muhialdin, B. J., Hassan, Z. & Sadon, S. Biopreservation of food by lactic acid bacteria against spoilage fungi. *Food Sci. Technol.* **12**, 45–57 (2011).
 26. Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A. & Dicks, L. M. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **49**, 23–28 (2018).
 27. McAuliffe, O., Ross, R. P. & Hill, C. Lantibiotics: structure , biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 285–308 (2001).
 28. Martínez, J., Kok, J., Sanders, J. & Hernández, P. Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: Detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3543–3549 (2000).
 29. Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F. & Vallejo-Cordoba, B. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia* **42**, 340–346 (2017).
 30. Dolz, M. C. Bacteriocins of probiotics. New biotherapeutical approaches: PINHE. *Nutr. clínica y Dietética Hosp.* **28**, 20–37 (2008).



31. Espitia, P. J. P., Otoni, C. G. & Soares, N. F. F. *Pediocin applications in antimicrobial food packaging systems. Antimicrobial Food Packaging* (Elsevier Inc., 2016).
32. Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L. & Omar, N. Ben. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 51–70 (2007).
33. Hoover, D. G. & Steenson, L. R. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria (LAB)*. Academic Press, INC. (United States of America, 1993).
34. López, J. E. *et al.* Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* **39**, 49–57 (2008).
35. Fallico, V., McAuliffe, O., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. & Hill, C. The potential of lacticin 3147, enterocin AS-48, lacticin 481, variacin and sakacin P for food biopreservation. in *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation* 100–128 (Woodhead Publishing Limited, 2010).
36. Jiang, H., Li, P. & Gu, Q. Heterologous expression and purification of plantaricin NC8, a two-peptide bacteriocin against *Salmonella spp.* from *Lactobacillus plantarum* ZJ316. *Protein Expr. Purif.* **127**, 24–38 (2016).
37. Vesković Moračanin, S. M., Dukić, D. A. & Memiši, N. R. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria - A review. *Acta Period. Technol.* **45**, 271–283 (2014).
38. Ross, R. P., Rea, M. C., Ryan, M. P. & Hill, C., *Bacteriocins*, National University of Ireland, Patent, No. 08945081, 2001-03-27.
39. Soares, N. F. F. *et al.* Recent patents on active packaging for food application. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* **1**, 171–178 (2009).
40. Perez Espitia, P. J. *et al.* Bioactive Peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **11**, 187–204 (2012).



41. Santiago-Silva, P. *et al.* Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA[®] 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control* **20**, 85–89 (2008).
42. Ross, R. P., Hill, C. *Spray dried bacteriocin powder with antibiotic activity*. Teagasc Agriculture and Food Development Authority, National University of Ireland. Patent, No. 6833150, 2004-12-21.
43. Pucci, M. J., Vedamuthu, E. R., Kunka, B. S. & Vandenberg, P. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2349–2353 (1988).
44. Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P. Bacterial Lantibiotics : Strategies to improve therapeutic potential. *Curr. Protein Pept. Sci.* **6**, 61–75 (2005).
45. Nes, I. F. *et al.* Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**, 13–128 (1996).
46. Vignoli, R. & Seija, V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Temas de bacteriología y virología médica* 649–662 (2006).
47. Programa Universitario de Investigación en Salud. *Plan universitario de control de la resistencia antimicrobiana*. Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2018.
48. Ross, R. P., Hill, C. *Spray dried bacteriocin powder with antibiotic activity*. Teagasc Agriculture and Food Development Authority, National University of Ireland. Patent, No. 6833150, 2004-12-21.
49. Shin, J. M. *et al.* Biomedical Applications of Nisin. *J. Appl. Microbiol.* **120**, 1449–1465 (2016).
50. Cotter, P. D., Ross, R. P. & Hill, C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 95–105 (2013).
51. Mercedes, M. A., Manuel, M. B., Eva, V. M., Samir, A. J. & Rubén, C. C.



Composicion para el tratamiento de infecciones bacterianas de la piel y mucosas. Universidad de Granada. Patente, No. 201231060. 2012-07-05.

52. Zhou, B. & Zhang, D. Antibacterial effects of bacteriocins isolated from *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) in a rabbit model of knee implant infection. *Exp. Ther. Med.* **15**, 2985–2989 (2018).
53. Twomey, D. P. *et al.* Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lacticin 3147. *J. Dairy Sci.* **83**, 1981–1988 (2000).
54. Ceotto, H. *et al.* Nukacin 3299, a lantibiotic produced by *Staphylococcus simulans* 3299 identical to nukacin ISK-1. *Vet. Microbiol.* **146**, 124–131 (2010).
55. Inmucell Corporation. *Wipe Out Dairy Wipes*. Pag web <https://www.drugs.com/vet/wipe-out-dairy-wipes.html>.
56. Oh, S. *et al.* Effect of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449 on skin-inflammatory bacteria. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 1184–1190 (2006).
57. Biotech, C. Cell Biotech's Products. *Lactoclear* (2017). Available at: <https://www.cellbiotech.com/en/brand/products>.
58. Brewer, R., Adams, M. R. & Park, S. F. Enhanced inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol. *Lett. Appl. Microbiol.* **34**, 18–21 (2002).
59. Field, D., Cotter, P. D., Ross, R. P. & Hill, C. Bioengineering of the model lantibiotic nisin. *Bioengineered* **6**, 187–192 (2015).
60. Renye Jr, J. A., Somkuti, G. A., Garabal, J. I. & Du, L. Heterologous production of pediocin for the control of *Listeria monocytogenes* in dairy foods. *Food Control* **22**, 1887–1892 (2011).
61. Chikindas, M. L. *et al.* Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3577–3584 (1993).



62. Maqueda-Abreu, M., Martínez-Bueno, M., Valdivia-Martínez, E., Ananou-Jaled, S., Cebrián-Castillo, R. *Composición para el tratamiento de infecciones bacterianas de la piel y mucosas*. Universidad de Granada. Patente, No. WO/2014/006253. 2014-01-09.
63. Gálvez, A., López, R. L., Abriouel, H., Valdivia, E. & Omar, N. Ben. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **28**, 125–152 (2008).
64. Kim, Y.-J. & Lee, S.-H. Inhibitory effect of *Lactococcus lactis* HY 449 on cariogenic biofilm. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1829–1835 (2016).
65. Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. *Pseudomonas and related bacteria*. 8th Edition (Elsevier Inc, 2006).
66. Callewaert, L., Walmagh, M., Michiels, C. W. & Lavigne, R. Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 164–171 (2011).
67. Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. & Foster, S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 259–286 (2008).
68. Sharma, A. K., Kumar, S., Harish, K., Dhakan, D. B. & Sharma, V. K. Prediction of peptidoglycan hydrolases - a new class of antibacterial proteins. *BMC Genomics* **17**, 1–12 (2016).
69. Mesnage, S., Chau, F., Dubost, L. & Arthur, M. Role of N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramidase activities in *Enterococcus faecalis* peptidoglycan metabolism. *J. Biol. Chem.* **283**, 19845–19853 (2008).
70. Lortal, S. & Chapot-Chartier, M. P. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Int. Dairy J.* **15**, 857–871 (2005).
71. Eckert, C., Lecerf, M., Dubost, L., Arthur, M. & Mesnage, S. Functional Analysis of AtlA, the major N-Acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **188**, 8513–8519 (2006).
72. Layec, S., Decaris, B. & Leblond-Bourget, N. Diversity of Firmicutes



peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Res. Microbiol.* **159**, 507–515 (2008).

73. Monterroso, B. A., Sáiz, J. L., García, P., García, J. L. & Menéndez, M. Insights into the structure-function relationships of pneumococcal cell wall lysozymes, LytC and Cpl-1. *J. Biol. Chem.* **283**, 28618–28628 (2008).
74. García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A. & Martínez, B. Food biopreservation: Promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends Food Sci. Technol.* **21**, 373–382 (2010).
75. Nakimbugwe, D. *et al.* Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**, 41–46 (2006).
76. Ruiz-Larrea, F. Applications of protective cultures and bacteriocins in wine making. *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation* (Woodhead Publishing Limited, 2010).
77. Turner, M. S., Waldherr, F., Loessner, M. J. & Giffard, P. M. Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **30**, 58–67 (2007).
78. Serrano-Maldonado, C. E. *et al.* Cloning and characterization of a novel N-acetylglucosaminidase (AtID) from *Enterococcus faecalis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 14–27 (2018).
79. Sharma, N. K., Garg, R., Baliga, S. & Gopalkrishna, B. K. Nosocomial infections and drug susceptibility patterns in methicillin sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Diagnostic Res.* **7**, 2178–2180 (2013).
80. Domenech, M., García, E. & Moscoso, M. In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4144–4148 (2011).



81. Ye, J., Wang, C., Chen, X., Guo, S. & Sun, M. Marine lysozyme from a marine bacterium that inhibits angiogenesis and tumor growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 1261–1267 (2008).
82. Muriel-Galet, V., Talbert, J. N., Hernandez-Munoz, P., Gavara, R. & Goddard, J. M. Covalent immobilization of lysozyme on ethylene vinyl alcohol films for nonmigrating antimicrobial packaging applications. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 6720–6727 (2013).
83. Diaz-Gomez, L., Concheiro, A. & Alvarez-Lorenzo, C. Functionalization of titanium implants with phase-transited lysozyme for gentle immobilization of antimicrobial lysozyme. *Appl. Surf. Sci.* **452**, 32–42 (2018).
84. Bastos, M. do C. de F., Coutinho, B. G. & Coelho, M. L. V. Lysostaphin: A staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. *Pharmaceuticals* **3**, 1139–1161 (2010).
85. COFEPRIS. *ACUERDO por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias.* 1–113 (2012).
86. FAO. Evaluación de los riesgos asociados con las sustancias químicas (JECFA). *webpage:* <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/es/>.
87. OMS. Aditivos Alimentarios. *webpage:* <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-additives>.
88. Schmidt-Hebbel, H. Avances en Aditivos alimentarios y la reglamentación de los alimentos. *Editorial Universitaria Santiago-Chile* (1990).
89. Duran, L. Aditivos Naturales. *Arbor CLXVIII* **661**, 87–107 (2001).
90. EFSA (European Food Safety Authority). *webpage:* <http://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa>.
91. UE. Reglamento (UE) N° 1129/2011 de la comisión de 11 de noviembre de



2011.

92. Harlander, S. K. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Regulatory Aspects of Bacteriocin Use*. Academic Press, INC. (United States of America, 1993).
93. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Inocuidad y calidad de los alimentos. webpage: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/about/es/>.
94. Biocomercio. *Guía de requisitos sanitarios y fitosanitarios para exportar alimentos a los Estados Unidos*. (2010).
95. Hernández, Á. G. & Vidal, D. ADN recombinante. *Alimentos transgénicos* 1–10 (2010).
96. Appleyard, A. N. *et al.* Dissecting structural and functional diversity of the lantibiotic mersacidin. *Chem. Biol.* **16**, 490–498 (2009).
97. Molitor, E. *et al.* Effects of the lantibiotic mersacidin on the morphology of staphylococci. *Zentralblatt fur Bakteriologie*. **284**, 318–328 (1996).
98. Lee, Y. J. *et al.* CBT-SL5, a bacteriocin from *Enterococcus faecalis*, suppresses the expression of interleukin-8 induced by *Propionibacterium acnes* in cultured human keratinocytes. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1308–1316 (2008).
99. Moscoso, M., Obregón, V., López, R., García, J. L. & García, E. Allelic variation of polymorphic locus *lytB*, encoding a choline-binding protein, from streptococci of the mitis group. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8706–8713 (2005).
100. Visweswaran, G. R. R. *et al.* *AcmD*, a homolog of the major autolysin *AcmA* of *Lactococcus lactis*, binds to the cell wall and contributes to cell separation and autolysis. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).
101. Dhalluin, A. *et al.* *Acd*, a peptidoglycan hydrolase of *Clostridium difficile* with



- N-acetylglucosaminidase activity. *Microbiology* **151**, 2343–2351 (2005).
102. Tews, I., Vincentelli, R., Vorgias, C. E., Vorgias, C. C. E. & Wilson, K. S. N-Acetylglucosaminidase (chitobiase) from *Serratia marcescens*: gene sequence, and protein production and purification in *Escherichia coli*. *Gene* **170**, 63–67 (1996).
 103. Ortiz, J. M., Berkeley, R. C. W. & Brewer, J. S. Production of Exo-p-N-acetylglucosaminidase by *Bacillus subtilis* B. *J. Gen. Microbiol.* **77**, 331–337 (1973).
 104. Smith, T. J., Blackman, S. A. & Foster, S. J. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* **146**, 249–262 (2000).
 105. Horsburgh, G. J., Atrih, A., Williamson, M. P. & Foster, S. J. LytG of *Bacillus subtilis* is a novel peptidoglycan hydrolase: The major active glucosaminidase. *Biochemistry* **42**, 257–264 (2003).
 106. Camiade, E. *et al.* Characterization of Acp, a peptidoglycan hydrolase of *Clostridium perfringens* with N-acetylglucosaminidase activity that is implicated in cell separation and stress-induced autolysis. *J. Bacteriol.* **192**, 2373–2384 (2010).
 107. Zhang, H., Fu, G. & Zhang, D. Cloning, characterization and production of a novel lysozyme by different expression hosts. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1405–1412 (2014).
 108. Niu, S., Luo, M., Huang, A., Yin, Y. & Wang, D. Purification, crystallization and preliminary X-ray studies of the putative lysozyme SP0987 from *Streptococcus pneumoniae*. *Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 286–288 (2010).
 109. Eckert, C., Magnet, S. & Mesnage, S. The *Enterococcus hirae* Mur-2 enzyme displays N-acetylglucosaminidase activity. *FEBS Lett.* **581**, 693–696 (2007).
 110. Kawata, S., Takemura, T. & Yokogawa, K. Characterization of two acetylmuramidases from *Streptomyces globisporus* 1829. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1501–1508 (1983).



111. Yang, J. *et al.* Transcriptional regulation and characteristics of a novel N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase gene involved in *Bacillus thuringiensis* mother cell lysis. *J. Bacteriol.* **195**, 2887–2897 (2013).
112. Usobiaga, P. *et al.* Structural organization of the major autolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 6832–6838 (1996).
113. Litzinger, S. *et al.* Muropeptide rescue in *Bacillus subtilis* involves sequential hydrolysis by β -N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *J. Bacteriol.* **192**, 3132–3143 (2010).
114. Kumazawa, T. *et al.* Mode of action of a germination-specific cortex-lytic enzyme, SleC, of *Clostridium perfringens* S40. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 884–892 (2007).
115. Scheurwater, E. M., Pfeffer, J. M. & Clarke, A. J. Production and purification of the bacterial autolysin N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase B from *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expr. Purif.* **56**, 128–137 (2007).
116. Llull, D., López, R. & García, E. SkI, a novel choline-binding N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase of *Streptococcus mitis* SK137 containing a CHAP domain. *FEBS Lett.* **580**, 1959–1964 (2006).
117. Heilmann, C. *et al.* Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **149**, 2769–2778 (2003).
118. Beukes, M., Bierbaum, G., Sahl, H. G. & Hastings, J. W. Purification and partial characterization of a murein hydrolase, millericin B, produced by *Streptococcus milleri* NMSCC 061. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 23–28 (2000).
119. Chen, X. *et al.* Novel cell wall hydrolase CwIC from *Bacillus thuringiensis* is essential for mother cell lysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, 1–14 (2018).
120. Wright, G. D., Molinas, C., Arthur, M., Courvalin, P. & Walsh, C. T. Characterization of VanY, a DD-carboxypeptidase from vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* BM4147. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1514–



1518 (1992).

121. Das, D. *et al.* Structure and function of a novel LD-Carboxypeptidase a involved in peptidoglycan recycling. *J. Bacteriol.* **195**, 5555–5566 (2013).
122. Frirdich, E. *et al.* Peptidoglycan LD-carboxypeptidase Pgp2 influences *Campylobacter jejuni* helical cell shape and pathogenic properties and provides the substrate for the DL-carboxypeptidase Pgp1. *J. Biol. Chem.* **289**, 8007–8018 (2014).



**ANEXO I.** Lista de alimentos en los que está permitido el uso de nisina y sus dosis máximas.

| Alimento | NISINA | | | |
|---|---------------|----------------|--------------|----------------|
| | Codex (mg/kg) | México (mg/kg) | USA (mg/kg)* | Europa (mg/kg) |
| Leche fermentada o acidificada (bebidas lácteas) | 12.5 | 10 | x | x |
| Nata (crema) cuajada (natural/simple) | 10 | x | BPF | x |
| Queso no madurado | 12.5 | 12.5 | BPF | 12.5 |
| Queso madurado | 12.5 | 12.5 | BPF | 12.5 |
| Queso elaborado | 12.5 | 12.5 | BPF | 12.5 |
| Queso de proteínas del suero | 12.5 | x | BPF | x |
| Dulces a base de leche | 12.5 | 10 | x | x |
| Postres lácteos (como pudines, yogur aromatizado o con fruta) | 12.5 | 12.5 | x | x |
| Postres a base de cereales y almidón (como pudines de arroz, pudines de mandioca) | 3 | x | x | x |
| Productos de panadería (dulces, salados, aromatizados) y mezclas | 6.25 | x | x | x |
| Productos cárnicos, de aves de corral y caza elaborados, tratados térmicamente, en piezas enteras o en cortes | 25 | 12.5 | 5.5 | 25 |
| Productos cárnicos, de aves de corral y caza picados, elaborados y tratados térmicamente | 25 | 12.5 | 5.5 | 25 |
| Envolturas o tripas comestibles (para embutidos) | 7 | x | 7 | x |
| Sopas y caldos listos para el consumo, incluidos los envasados, embotellados y congelados | 5 | x | x | x |
| Huevo líquido refrigerado o congelado | 6 | BPF | x | x |
| Mayonesa y aderezos de mayonesa | x | 10 | x | x |

(*) En Estados Unidos, el nivel actual de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) es la cantidad del ingrediente en un máximo de 250 ppm en el producto terminado, según lo determinan los métodos de la Institución Británica de Estándares.



ANEXO II. Lista de alimentos en los que está permitido el uso de lisozima y sus dosis máximas.

| Alimento | LISOZIMA | | | |
|-----------------------|----------------|----------------------------|---------------|----------------|
| | Codex (mg/kg)* | México (mg/kg) | USA (kg/mg)** | Europa (mg/kg) |
| Queso madurado | BPF | Coadyuvante Anexo X 155 | BPF | 5-10 |
| Sidra y sidra de pera | 500 | x | x | x |
| Vinos de uva | 500 | x | x | x |

(*) Todos los aditivos alimentarios regulados por las disposiciones del Codex Alimentarius se emplearán conforme a las condiciones de buenas prácticas de fabricación que indican que la cantidad de aditivo que se añade al alimento se limitará a la dosis mínima necesaria para obtener el efecto deseado.

(**) En Estados Unidos, el nivel actual de Buenas Prácticas de Fabricación es la cantidad del ingrediente en un máximo de 250 ppm en el producto terminado, según lo determinan los métodos de la Institución Británica de Estándares.

ANEXO III

NISIN

Prepared at the 77th JECFA (2013), and published in FAO JECFA Monographs 14 (2013), superseding specifications for Nisin prepared at the 71st JECFA (2009). An ADI of 0–2 mg/kg bw was established at the 77th JECFA.

SYNONYMS

INS No. 234

DEFINITION

Nisin is a mixture of closely related antimicrobial polypeptides produced by strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* under appropriate fermentation conditions. The major polypeptide from the fermentation is Nisin A. Nisin is produced in a sterilized medium of non-fat milk solids or non-milk-based fermentation source, such as yeast extract and carbohydrate solids. The fermentation process is controlled for time and pH, until optimum nisin production has been achieved. The nisin is then concentrated, recovered and purified from the fermentation medium by various methods, such as sterile injection, membrane filtration, acidification, salting out, ultrafiltration or spray-drying. The purified nisin is then standardized with sodium chloride to achieve desired activity levels of nisin preparation. Nisin is stable at ambient temperatures and when heated under acidic conditions (up to pH 3). Nisin is commercially available as nisin preparation, which contains 2.5% w/w nisin, >50% sodium chloride; the remaining components of the preparation are milk solids and products of fermentation that include proteins and carbohydrates. The activity of nisin is measured in International Units (IU). 1 IU of nisin is equivalent to 0.025 µg.

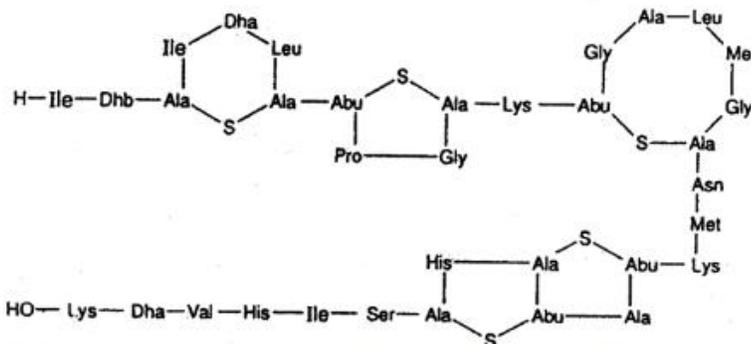
C.A.S. Number

1414-45-5

Chemical formula

C₁₄₃H₂₃₀O₃₇N₄₂S₇ (Nisin A)

Structural formula



Abu=alpha-aminobutyric acid, Dha=dehydroalanine, Dhb=dehydrobutyrine (Nisin A)

Formula weight

3354.12 (Nisin A)

Assay

Not less than 900 IU of nisin per milligram (or 22.5 microgram/milligram)



DESCRIPTION White to light brown micronized powder

FUNCTIONAL USES Antimicrobial preservative

CHARACTERISTICS

IDENTIFICATION

Solubility (Vol. 4) Soluble in water and insoluble in non-polar solvents

Differentiation from other antimicrobial substances Passes tests
See description under TESTS

Nisin activity The sample shows nisin activity
See description under METHOD OF ASSAY

PURITY

Loss on drying (Vol. 4) Not more than 3.0% (105°, 2 h)

Sodium Chloride Not less than 50%
See description under TESTS

Lead (Vol. 4) Not more than 1 mg/kg
Determine using an AAS (Electrothermal Atomization technique) appropriate to the specified level. The selection of sample size and method of sample preparation may be based on principles of methods described in Volume 4 (under "General Methods, Metallic Impurities").

Microbiological criteria (Vol. 4) *Salmonella* species: Absent in 25 g of sample
Total coliforms: Not more than 30 per gram
Escherichia coli: Absent in 25 g of sample

TESTS

IDENTIFICATION TESTS

Differentiation from other antimicrobial substances Stability to acid
Sample stock solution: Suspend 1 g of sample in 1 L of 0.02 N hydrochloric acid to give a solution containing 1000 IU/mL.

Sample Preparation: Make a dilution of the Sample stock solution with 0.02 N hydrochloric acid to arrive at a concentration of 50 IU/ml. Boil this solution for 5 min and measure the nisin activity as directed under 'Determination of Nisin Activity', in METHOD OF ASSAY.
The calculated nisin concentration of the boiled sample should be 100% (+/- 5%) of the assay value indicating no significant loss of activity following this heat treatment.

Instability to Alkali
Adjust the pH of the unused portion of the boiled nisin solution from 'Stability to acid' to 11.0 by adding 5 N sodium hydroxide. Heat the



solution at 65° for 30 min, and then cool. Adjust the pH to 2.0 by adding hydrochloric acid dropwise. Measure the nisin activity as directed under 'Determination of Nisin Activity' in METHOD OF ASSAY. Record loss of the antimicrobial activity of nisin following this treatment. Complete loss of the antimicrobial activity should be observed following the treatment described.

Tolerance of *Lactococcus lactis* to high concentrations of Nisin

Prepare cultures of *L. lactis* (ATCC 11454, NCIMB 8586) in sterile skim (<1% fat) milk by incubating for 18 h at 30°. Prepare one or more flasks containing 100 ml of litmus milk, and sterilize at 121° for 15 min. Suspend 0.1 g of sample in the sterilized litmus milk, and allow to stand at room temperature for 2 h. Add 0.1 ml of the *L. lactis* culture, and incubate at 30° for 24 h. Record *L. lactis* growth. *L. lactis* will grow at this concentration of sample (about 1000 IU/ml); however, it will not grow in similar concentrations of other antimicrobial substances. (NOTE: This test will not differentiate nisin from subtilin.)

PURITY TESTS

Determination of sodium chloride

Transfer about 200 mg of the sample, accurately weighed, into a glass-stoppered flask containing 50 ml of water. Agitate the flask to dissolve the sample while adding 3 ml of nitric acid, 5 ml of nitrobenzene, 50.0 ml of standardized 0.1 N silver nitrate, and 2 ml of ferric ammonium sulfate TS. Shake the solution well, and titrate the excess silver nitrate with 0.1 N ammonium thiocyanate. The titration endpoint is indicated by the appearance of a red colour. Calculate the percentage of sodium chloride in the sample taken by the equation:

$$\text{Sodium chloride, \%} = \frac{100 \times 58.44 \times [(50 \times A) - (V \times B)]}{W}$$

where

A is the concentration of the silver nitrate solution;

B is the concentration of the ammonium thiocyanate solution;

V is the volume of the ammonium thiocyanate in ml; and

W is the weight of the sample in mg

METHOD OF ASSAY Principle

Nisin activity, expressed in International Units (IU), refers to the amount of nisin required to inhibit growth of 1 bacterial cell in 1 millilitre of broth. 1 IU of nisin is equivalent to 0.025 µg. Commercial nisin preparations consist typically of 2.5% w/w of nisin along with sodium chloride and milk-fat solids.

Determination of Nisin Activity

Preparation of the test organism

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* (ATCC 14365, NCDO 495) is subcultured daily in sterile separated milk by transferring one loopful to a McCartney bottle of litmus milk and incubating at 30°. Prepare inoculated milk for the assay by inoculating a suitable quantity of sterile skim milk with 2 percent of a 24 h culture, and place it in a water-bath at 30° for 90 min. Use immediately.

Standard stock solution

Dissolve an accurately weighed quantity of standard nisin in 0.02 N hydrochloric acid to give a solution containing 5,000 IU/ml. Immediately before use, dilute the solution further with 0.02 N hydrochloric acid to give



50 units/ml. (NOTE: Nisin containing 2.5% w/w nisin, at a minimum potency of 10^6 IU nisin per gram (IU/g) is obtainable from Sigma, St. Louis, USA or Fluka, Buchs, Switzerland. A preparation under the name of Nisaplin, containing at a minimum potency of 3×10^6 IU/g, of nisin available from DuPont Nutrition Biosciences, Copenhagen, Denmark, may also be used for the Standard stock solution).

Sample solution

Weigh an amount of sample sufficient to ensure that corresponding tubes of the sample and standard series match, i.e., within close limits, so that the nisin content in the sample and standard are similar. Dilute the sample solution in 0.02 N hydrochloric acid to obtain an approximate concentration of 50 IU per ml (IU/ml).

Resazurin solution

Prepare a 0.0125% w/v solution of resazurin in water immediately prior to use.

Procedure

Pipet graded volumes (0.60, 0.55, 0.50, 0.45, 0.41, 0.38, 0.34, 0.31, 0.28, 0.26 ml) of the 50 IU/ml sample and standard solutions into two rows of 10 dry 6-inches x 5/8-inch bacteriological test tubes. Add 4.6 ml of the inoculated milk to each by means of an automatic pipetting device.

(NOTE: The addition of inoculated milk should be made in turn across each duplicate row of tubes containing the same nominal concentration, and not along each row of ten tubes). Place the tubes in a water-bath at 30° for 15 min, then cool in an ice-water bath while adding 1 ml resazurin solution to each. Add the resazurin solution in the same order as the addition of inoculated milk, using an automatic pipetting device.

Thoroughly mix the contents of the tubes by shaking. Continue incubation at 30° in a water bath for a further 3-5 min.

Examine the standard and sample tubes under fluorescent light in a black matte-finish cabinet. Compare the sample tube of the highest concentration that shows the first clear difference in colour (i.e., has changed from blue to mauve) with tubes of the standard to find the nearest match in colour. Make further matches at the next two lower concentrations of the sample with the standard. Interpolation of matches may be made at half dilution steps. Obtain three readings of the sample solution and average them. Calculate the activity of nisin in the sample from the standard nisin activities.

Convert nisin activity from IU to μg nisin, using the conversion factor $1 \text{ IU} = 0.025 \mu\text{g}$



Anexo IV

LYSOZYME HYDROCHLORIDE

*Prepared at the 39th JECFA (1992), published in FNP 52 Add 1 (1992).
Metals and arsenic specifications revised at the 63rd JECFA (2004).
Acceptable for use in food processing in accordance with GMP established
at the 39th JECFA (1992)*

| | |
|-------------------------------------|---|
| SYNONYMS | Lysozyme, INS No. 1105 |
| DEFINITION | A polypeptide obtained from hen's egg whites consisting of 129 amino acids and having a molecular weight of about 14,000 and an isoelectric point of 10.7; possesses enzymatic activity in its ability to hydrolyze the $\beta(1-4)$ linkages between N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine in the outer membranes of bacterial species, in particular Gram-positive organisms; usually obtained in the hydrochloride form for food use; must conform to the <i>General Specifications for Enzyme Preparations used in Food Processing</i> . |
| C.A.S. number | 9066059-5 |
| Assay | Not less than 950 $\mu\text{g}/\text{mg}$, as lysozyme hydrochloride, calculated on the anhydrous basis |
| DESCRIPTION | White, odourless powder |
| FUNCTIONAL USES | Preservative (mainly to prevent the late blowing of cheese caused by <i>Clostridium tyrobutyricum</i>) |
| CHARACTERISTICS | |
| IDENTIFICATION | |
| <u>Solubility</u> (Vol. 4) | Soluble in water, insoluble in organic solvents and in concentrated saline solutions |
| <u>pH</u> (Vol. 4) | 3.0 - 3.6 (2 in 100 soln) |
| <u>Spectrophotometry</u> (Vol. 4) | An aqueous solution containing 25 mg/100 ml shows an ultraviolet absorbance maximum at 281 nm and a minimum at 252 nm |
| PURITY | |
| <u>Water</u> (Vol. 4) | Not more than 6% (Karl Fischer Method) |
| <u>Residue on ignition</u> (Vol. 4) | Not more than 1.5% |
| <u>Nitrogen</u> (Vol. 4) | Between 16.8 and 17.8% |
| <u>Chlorides</u> | Between 3.2 and 4.2% See description under TESTS |
| <u>Sodium</u> | Not more than 0.6% |



See description under TESTS

Microbiological criteria
(Vol. 4)

Total bacterial count: not more than 5×10^4 col/g
Salmonella spp.: absent in 25 g
Staphylococcus aureus: absent in 1 g
E. coli: absent in 1 g

Lead (Vol. 4)

Not more than 2 mg/kg
Determine using an atomic absorption technique appropriate to the specified level. The selection of sample size and method of sample preparation may be based on the principles of the method described in Volume 4, "Instrumental Methods."

TESTS

PURITY TESTS

Chlorides

Accurately weigh about 0.5 g of the sample and dissolve in 20 ml of water. Adjust the pH to 2.5 with 0.1 N nitric acid, add 20 ml of water and 15 drops of indicator (dissolve 0.125 g of diphenylcarbazone and 0.0125 g of bromophenol blue in 25 ml of 95% dry ethyl alcohol) and titrate with 0.025 N mercuric nitrate solution until a violet colour is produced. Prepare a blank and titrate as described above. Calculate the chloride content from

$$Cl = \frac{(mlx - mlb) \times 35.45 \times 0.025 \times 100}{W}$$

where

mlx = ml of 0.025 N mercuric nitrate solutions used for sample

mlb = ml of 0.025 N mercuric nitrate solutions used for blank

W = weight of the sample (mg)

Sodium

Determine the sodium content of a 1.0% solution of the sample by means of an ion analyzer equipped with a sodium detection electrode. Calibrate the apparatus using solutions of sodium chloride containing exactly 100 mg/l, 50 mg/l and 10 mg/l of sodium. Read the concentration of sodium in the sample solution from the calibration curve or directly from the digital display of the apparatus in units of mg/kg. The value found for the sample solution is not more than 60 mg/kg, equivalent to not more than 0.6% of sodium.

METHOD OF ASSAY

Turbidimetric determination

- The method is based on the changes in turbidity of a suspension of *Micrococcus luteus* ATCC 4698 induced by the lytic action of lysozyme. In appropriate experimental conditions these changes are proportional to the amount of lysozyme in the medium.

Substrate

- Suspend a suitable quantity (40-60 mg) of dry powdered *Micrococcus luteus* ATCC 4698 (Boehringer) in a few ml of M/15 pH 6.6±0.1 phosphate buffer solution to obtain a homogeneous suspension and dilute to 100 ml with the same buffer (use manual agitation or ultrasonic bath; do not use electromagnetic agitator). (The exact quantity of *Micrococcus* to be used



depends on the type of spectrophotometer available). Prepare a control consisting of 5 ml of buffer solution and of 5 ml of *M. luteus* suspension and measure the absorbance of this suspension with a suitable spectrophotometer at 450 nm against a blank consisting of phosphate buffer. The reading should be not less than 0.800. If the reading does not correspond, adjust the initial suspension so as to obtain the desired absorbance (The absorbance values 0.800 - 0.900 of the solution prepared as mentioned before, are obtained using a spectrophotometer with suitable sensitivity. Apparatuses with lower sensitivity give lower absorbances even when using the same suspension (0.500 - 0.600). In this case it is not correct to increase the quantity of substrate to obtain the initial absorbance values 0.800 - 0.900 as the reproducibility and linearity of the dosage could be unreliable).

Standard solution

- Dissolve about 50 mg of lysozyme hydrochloride working standard (Wst) (available from Federation International Pharmaceutique, International Commission on Pharmaceutical Enzymes, Centre for Standards, Harelbekestraat 72, B-9000 Ghent, Belgium), accurately weighed, in water and dilute to 100 ml in a volumetric flask.

Dilute 5 ml of this solution to 50 ml in a volumetric flask with water and then 2 ml of the last solution to 100 ml in a volumetric flask with M/15 phosphate buffer to obtain a solution containing 1 µg/ml of lysozyme (standard solution).

Sample solution

- Proceed as for the standard solution.

Procedure

In 180 x 80 nm test-tubes, prepare the following solutions:

| <u>Standard soln.</u> | <u>M/15 buffer</u> | <u>Lysozyme conc.</u> |
|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| 2.0 ml | 3.0 ml | 0.4 µg/ml |
| 2.8 ml | 2.2 ml | 0.56 µg/ml |
| 4.0 ml | 1.0 ml | 0.8 µg/ml |

It is advisable to prepare three replications for each dilution of the standard and of the sample solutions.

Separately prepare two test-tubes with 5 ml of buffer as control of the *Micrococcus* suspension. Use the first tube of the control at the beginning and the second at the end of the assay.

At exactly 30 sec intervals, to each test-tube, randomly add 5 ml of the suspension of *Micrococcus luteus* (maintained under manual agitation to avoid decantation). Agitate rapidly and place the test-tubes to incubate in a water bath at 37±0.5° for exactly 12 min. The final quantities of lysozyme contained in the test-tubes are therefore 0.2 - 0.28 - 0.4 µg/ml. After incubation, remove the test-tubes from the water bath in the same order as they were put it and at 30 sec intervals. Agitate and read the absorbances with a suitable spectrophotometer at 450 nm against a blank of buffer. Normally the assay is acceptable when the difference between the absorbances of the two control tubes is not more than 5%.



Calculate the result of the assay by standard statistical methods or by the following calculation: prepare the standard curve plotting on a graph the average of values of absorbance obtained for each dilution (on the ordinates) against the concentrations of lysozyme (on the abscissa) in logarithmic scale. Do the same with the solutions of the sample. Draw a straight line through the points obtained for the standard and another straight line through the points obtained for the sample. The two lines must be parallel otherwise the dosage is not valid. Then draw a line parallel to the axis of the abscissa so as to intersect the two lines at about half-way between the end limits of the dosage. At the two intersection points correspond two concentration on the abscissa (C_s the concentration of the standard curve and C_x the concentration of the sample curve). Calculate the microbiological assay (potency) of the sample under test as follows:

$$\text{Potency } (\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{C_s \times W_{st} \times P_{st}}{C_x \times W_x}$$

where

C_s = concentration of the lysozyme hydrochloride working standard

C_x = concentration of the sample

P_{st} = potency of the lysozyme hydrochloride working standard

W_{st} = weight in mg of the lysozyme hydrochloride working standard

W_x = weight in mg of the sample under test

Calculate the potency of the anhydrous basis as follows:

$$\frac{\text{Potency } (\mu\text{g} / \text{kg}) \times 100}{100 - \text{water}}$$

where

water = determined as described above

