



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**LAS BACTERIAS LÁCTICAS Y SU EFECTO EN LA
BIOCONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS.**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

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

**PRESENTA
VANY MARIANA MORENO GUADARRAMA**



CIUDAD UNIVERSITARIA CDMX 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

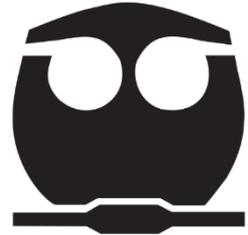
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Titulación o Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado Las bacterias lácticas y su efecto en la bioconservación de los alimentos que presenté para obtener el título/grado de Química de Alimentos, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por la Facultad de Química, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Vany Mariana Moreno Guadarrama
No. Cuenta 314281034

JURADO ASIGNADO.

PRESIDENTE: Profesora: GALVEZ MARISCAL MARIA AMANDA
VOCAL: Profesora: DIAZ RUIZ GLORIA
SECRETARIO: Profesora: CAMACHO DE LA ROSA NORMA ANGÉLICA
1er. SUPLENTE: Profesora: MINA CETINA ALEIDA
2° SUPLENTE: Profesora: DIAZ GUTIERREZ KARLA MERCEDES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 324, CONJUNTO E, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Gloría Diaz Ruiz

SUSTENTANTE (S):

Vany Mariana Moreno Guadarrama

ÍNDICE	
OBJETIVO	1
JUSTIFICACIÓN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1. Generalidades	3
1.1 Historia de las bacterias lácticas	4
1.2 Características generales	5
1.3 Vías metabólicas	9
1.4 Taxonomía	13
1.5 Identificación	15
1.5.1 Identificación fenotípica	16
1.5.2 Identificación bioquímica	16
1.5.3. Identificación molecular	20
CAPÍTULO 2. Producción de compuestos antimicrobianos por las bacterias lácticas. Descripción general.	27
2.1 Compuestos antimicrobianos	28
2.2 Estudios de casos de bioconservación por BAL	31
CAPÍTULO 3. Bacteriocinas: clasificación, mecanismos de acción y métodos para su estudio	33
3.1 Definición	33
3.2 Nomenclatura	36
3.3 Clasificación	36
3.4 Síntesis	41
3.5 Mecanismo de acción	42
3.6 Mecanismos de resistencia	44
3.6.1 Cambios en los receptores de membrana que sirven como molécula de acoplamiento para las bacteriocinas	46
3.6.2. D-alanilación de ácidos teicoicos de la pared celular	47
3.6.3. L-lisinilación de fosfolípidos de la membrana celular	48
3.6.4. Cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana celular	

	48
3.7 Purificación y caracterización de bacteriocinas	49
CAPÍTULO 4. Bioconservación de alimentos, ejemplos. Normatividad.	54
4.1 Aplicaciones en la industria	54
4.1.1. Nisina	57
4.1.2. Pediocina	59
4.1.3. Reuterina	60
4.1.4. Otros péptidos antimicrobianos derivados de bacterias	60
4.2 Costos de bacteriocinas comerciales	61
4.3 Normatividad	62
CONCLUSIONES	68
GLOSARIO	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	71

OBJETIVO

Esta revisión tiene como objetivo recopilar información actualizada que proporcione una descripción general de las bacteriocinas, microorganismos que las producen, modos de acción contra otras bacterias, métodos de purificación, y sus aplicaciones como aditivos alimentarios en la conservación de alimentos.

JUSTIFICACIÓN

Esta extensa investigación se realiza para dar a conocer alternativas de conservación de alimentos a la comunidad estudiantil y toda aquella persona involucrada en el ámbito de tecnología de alimentos. Se aborda a las bacteriocinas como una alternativa de bioconservación, aminorando o eliminando el uso de conservadores químicos para garantizar la seguridad, preservar la calidad y extender la vida útil de productos alimenticios.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos la humanidad ha ideado diversas formas de preservar sus alimentos con el objetivo de que su inocuidad y sus características organolépticas se mantengan por más tiempo. Hoy en día, los productos alimenticios han aumentado considerablemente y con ello el uso de compuestos químicos y tratamientos térmicos que los conserven. En las últimas décadas, profesionistas del área de desarrollo de alimentos se han encargado de estudiar nuevas tecnologías para la conservación de alimentos, evitando el uso de conservadores sintéticos. A pesar de que el uso de los conservadores se encuentra estrictamente estudiado, regulado y supervisado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de América (FDA), éstos se han considerado como inseguros o dañinos para la salud. Por lo que hallar la forma de poder conservar alimentos con una alternativa natural, sonará bastante atractivo al momento de desarrollar un nuevo producto alimenticio. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas tecnologías en la conservación de alimentos, y una de esas técnicas es el uso de bacteriocinas. Se ha descubierto que estos péptidos son un buen sustituto de los aditivos químicos, ya que estos tienen diferentes modos de acción como la formación de poros y la inhibición de la síntesis de pared celular de las bacterias, lo cual evita la proliferación de bacterias causantes de deterioro y patógenos, ayudando a la protección del consumidor contra infecciones transmitidas por alimentos (ETA). La nisina es actualmente la bacteriocina más utilizada en la conservación de alimentos, además de pediocina, enterocina, etc. Para alargar la vida útil de los alimentos, las bacteriocinas se pueden utilizar solas o en mezcla con otros antimicrobianos.

CAPÍTULO 1. Generalidades

Las bacterias ácido lácticas (BAL), son un grupo de bacterias de diversos géneros que producen ácido láctico como producto final mayoritario de su metabolismo (Madigan, *et al.*, 2015). Son bacilos o cocos, oxidasa y catalasa negativos, que no esporulan y muestran un metabolismo exclusivamente fermentativo.

Debido a sus propiedades metabólicas, este grupo de bacterias desempeñan un papel importante en la industria alimentaria, además contribuyen significativamente a las características sensoriales y al valor nutricional de los productos alimentarios. Por otro lado, ayudan a la inhibición de bacterias que causan deterioro en alimentos y bacterias patógenas que afectan la calidad e inocuidad del alimento.

Algunos de los metabolitos producidos por este tipo de bacterias son ácidos orgánicos, polisacáridos, vitaminas, edulcorantes, compuestos que brindan aromas y sabores, entre otros (Parra, 2010).

Las bacterias ácido lácticas se han asociado íntimamente con la cultura alimenticia y al bienestar del ser humano a lo largo de la historia. Hoy en día, con la industrialización de los alimentos fermentados han sido más notorios los atributos positivos que este grupo de bacterias tienen sobre las características sensoriales, nutricionales y de calidad de los alimentos.

Las BAL pertenecen al grupo de bacterias Gram positivas, las cuales se dividen en dos filos, los Firmicutes y Actinobacterias. BAL forma parte de la primera clase de los Firmicutes, los bacilos, los cuales presentan un bajo porcentaje de G+C en su ADN. Según el análisis comparativo de secuencias del gen 16S rRNA, los Firmicutes se distinguen del otro filo Gram positivo, Actinobacteria, con un alto porcentaje molar de G+C en su ADN.

A continuación, se enlistan las clases pertenecientes al filo de Firmicutes (Holzapfel, 2014):

Filo VIII: Firmicutes

- Clase I: '*Bacilli*'
 - Orden I: *Bacillales* con 12 familias, por ejemplo:
Familia I: *Bacillaceae*; Familia VII: *Sporolactobacillaceae* (con un género *Sporolactobacillus*)

- Orden II: *Lactobacillales* con 6 familias.
- Clase II: *Clostridia*
- Clase III: *Erysipelotrichia*
- Clase Mollicutes (sin pared celular): *Mycoplasmas*.

1.1 Historia de las bacterias lácticas

El conocimiento de cultivos lácticos se originó a partir del siglo XVIII, cuando agricultores de África, Asia y Europa observaron el comportamiento de la leche cruda en los meses cálidos. Siguiendo esta premisa, el ácido láctico fue descubierto en leche descompuesta por Scheele en 1780, e inicialmente lo consideró como un componente de la leche. Ocho años después, Lavoisier llamó a este componente de la leche "ácido láctico" (Parra, 2010).

Años después, en 1857, Pasteur descubrió microorganismos que causaban alteraciones en alimentos, por lo que realizó estudios sobre la fermentación láctica, alcohólica y butírica, denominando a estos microorganismos como *Lactobacterias* (Esquivel et al., 1987). Así mismo, Pasteur descubrió que el ácido láctico no era un componente de la leche, pero sí un metabolito de la fermentación generado por ciertos microorganismos.

Más tarde, en 1873, Joseph Lister aisló el primer cultivo bacteriano puro al que llamó *Bacterium lactis*. Esta bacteria del ácido láctico ahora se llama *Lactococcus lactis* y se usa para fermentar la leche, generando cientos de productos lácteos diferentes (Narvhus y Axelsson, 2003).

Según Holzapfel y Wood (2014), Cienkowski fue el primero en detectar cepas del género *Leuconostoc* como microorganismos de deterioro en las fábricas de azúcar, donde se demostró que producían un compuesto viscoso característico a partir de la sacarosa.

Las relaciones entre los diferentes géneros de BAL han experimentado muchos cambios. La clasificación de BAL fue iniciada en 1919 por Orla Jensen basándose en su morfología y comportamiento fisiológico. Con ello describió siete géneros diferentes, pero solo el nombre de *Streptococcus* sigue siendo válido en la actualidad. Hoy en día, el grupo de las BAL comprende seis familias y cuarenta géneros (Holzapfel y Wood, 2014):

- *Aerococcaceae* (con 7 géneros)
- *Carnobacteriaceae* (con 16 géneros)
- *Enterococcaceae* (con 7 géneros)
- *Lactobacillaceae* (con 3 géneros)
- *Leuconostocaceae* (con 4 géneros)
- *Streptococcaceae* (con 3 géneros)

Actualmente, las BAL se utilizan como cultivos iniciadores en la industria láctea, llevando a la producción de fermentos industriales o cultivos iniciadores para la elaboración de yogurt, leches fermentadas, cremas, mantequillas y quesos, así como la elaboración de productos cárnicos y bebidas alcohólicas (Jay, 1992). En la actualidad, el ácido láctico es clasificado como GRAS (generalmente reconocido como seguro) para su empleo como aditivo alimenticio por la FDA.

1.2 Características generales

El grupo de las bacterias ácido lácticas, comprende un diverso grupo de microorganismos Gram positivos, cocos y bacilos de longitud variable y con un grosor de entre 0.5-0.8 μm . Los géneros *Aerococcus*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus*, son formadores de tétradas.

Las BAL son bacterias anaerobias facultativas, catalasa negativa, no formadoras de esporas y la mayoría de las especies no son móviles. Los miembros de este grupo carecen de porfirinas y citocromos, no realizan fosforilación oxidativa a nivel de sustrato. Sin embargo, a diferencia de muchos anaerobios, la mayoría no son sensibles al oxígeno (O_2) y pueden crecer en su presencia, por lo que se llaman anaerobios aerotolerantes (Madigan, et al., 2015). Es decir que las BAL, carecen de actividad respiratoria porque les falta la enzima citocromo catalasa (Parra, 2010).

Por otro lado, la mayoría de las bacterias del ácido láctico obtienen energía solamente del metabolismo de azúcares y, por consiguiente, su distribución está limitada a ambientes en los que hay azúcares presentes. Suelen tener limitadas capacidades biosintéticas y sus exigencias nutritivas son complejas, requiriendo aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Madigan, et al., 2015).

Además, con base en sus requerimientos de temperatura, pueden ser bacterias mesofílicas o termofílicas (Starmer, 1979).

Son bacterias quimiorganotrofas, por lo que solamente logran crecer en medios enriquecidos. Emplean carbohidratos fermentables, como la glucosa, sacarosa y lactosa, como fuentes de energía para formar principalmente ácido láctico, a través de la degradación de hexosas a lactato (homofermentativas) y productos adicionales como acetato, etanol, CO₂, formato o succinato (heterofermentativas) (Parra, 2010).

Características morfológicas.

- Macroscópica.

Los cultivos de BAL en placas agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS), forman colonias cuyo tamaño aproximado se encuentra entre 1 y 2 mm, con una apariencia de color blanco cremoso, de forma redonda, puntiformes, bordes enteros, superficie convexa, consistencia butirosa y húmeda (Ortiz, 2006).

- Microscópica.

Para identificar las colonias microscópicamente por medio de una tinción de Gram se reportan bacilos cortos, cocobacilos y cocos, todos Gram positivos (Ortiz, 2006).

Medios de cultivo.

Los miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weissella* (el llamado grupo LLPW) comparten una serie de similitudes fisiológicas, por lo que suelen responder de la misma manera a las condiciones del medio de cultivo o a compuestos inhibidores. Por lo tanto, la mayoría de los medios de cultivo desarrollados para la detección de *Lactobacillus* o *Leuconostoc* no son completamente selectivos para el género respectivo. Las carnobacterias se pueden distinguir fácilmente del grupo LLPW por su naturaleza no acidúrica. Sin embargo, debido a similitudes fisiológicas con el género *Enterococcus*, como la capacidad de crecer a valores de pH de hasta 9.5, los medios desarrollados para el aislamiento selectivo de *Carnobacterium* no suprimen el crecimiento de enterococos que a menudo comparten el mismo hábitat.

Se encuentran disponibles varios medios selectivos útiles para pediococos de cerveza, *Tetragenococcus* y *Oenococcus*, organismos caracterizados por

propiedades específicas asociadas a su adaptación a ambientes especiales. Debido al creciente interés por estudiar las cepas probióticas y la microbiota intestinal, se ha propuesto un número creciente de medios de cultivo en los últimos años para el aislamiento selectivo de cepas de aquellos hábitats que contienen poblaciones mixtas de BAL (Schillinger, 2003).

Se han desarrollado varios medios selectivos para el aislamiento de ciertos grupos de BAL del yogurt y otros productos lácteos fermentados (Tabla 1).

Tabla 1. Medios de cultivo para bacterias ácido lácticas (Schillinger, 2003).

Medio	Grupos microbianos a cultivar	Aplicación
APT (pH 6.7)	BAL	Carnes y carnes curadas
Briggs (pH 6.7)	BAL	Productos lácteos
MRS (pH 6.2)	BAL	General
La (pH 6.8)	BAL	General y carne
TPPY (pH 6.8)	Lactobacilos y <i>S. thermophilus</i>	Yogurt
M 17 (pH 7.2)	Lactococos y <i>S. thermophilus</i>	Yogurt
LSD (pH 6.1)	Lactobacilos y lactococos	Yogurt

A continuación, se detallan los medios de cultivo más relevantes empleados para el crecimiento de BAL:

- **Agar de MRS (Man, Rogosa y Sharpe)**

Medio de cultivo apropiado para el aislamiento y recuento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas a partir de muestras clínicas y alimentos (especialmente productos lácteos).

Fundamento: La proteosa peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura y la glucosa constituyen la fuente nutritiva ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. Las sales de sodio, magnesio y manganeso proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio

del crecimiento de bacterias Gram negativas. El agar es el agente solidificante (Britania lab, 2021).

Reuter en 1970, modificó el medio MRS de acuerdo con los requisitos nutricionales especiales de las BAL de la carne y lo llamó “La agar”.

- **Agar APT (All Purpose Tween)**

Para enumeración y cultivo de bacterias del ácido láctico heterofermentativas, incluyendo lactobacilos, leuconostocs y estreptococos del ácido láctico (Condalab, 2019).

Los lactobacilos convierten lactosa y otros azúcares en ácido láctico. Este medio se recomienda para el examen microbiológico de carne enlatada, aves, chucrut y otros alimentos. El Agar APT también es usado en el ensayo microbiológico de tiamina. Principio: Este medio de cultivo contiene una mezcla de peptona, que actúa como una fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El extracto de levadura proporciona vitaminas del complejo B, requeridos para el crecimiento de bacterias. La dextrosa es la fuente de carbohidratos. El cloruro de manganeso, el sulfato de magnesio y el sulfato ferroso son esenciales para la replicación de lactobacilos y estreptococos del ácido láctico. El polisorbato 80 es una fuente de ácidos grasos requerida por los lactobacilos. El citrato sódico inhibe parcialmente el crecimiento de bacterias Gram negativas (Condalab, 2019).

- **Agar M 17**

Se utiliza para el recuento de los estreptococos lácticos (especialmente *Lactococcus lactis*) en los productos lácteos. También se utiliza para estudiar la sensibilidad de estas especies a los bacteriófagos.

Se adapta bien para el recuento de *Streptococcus thermophilus*, tanto en yogures naturales como de sabores, con texturas o no, y yogures que contienen trozos de fruta (Bioser, 2023).

Principio: El agar M17 y el caldo M17 contienen peptonas y derivados de la carne como fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. El extracto de levadura aporta vitaminas del complejo B, que estimulan el crecimiento bacteriano. El β -glicerofosfato disódico, amortigua el pH del medio a medida que el ácido se produce a partir de la fermentación de la lactosa. El ácido

ascórbico estimula el crecimiento de estreptococos lácticos. El sulfato de magnesio proporciona iones esenciales para el crecimiento. El agar es el agente solidificante (BD Difco, 2022).

- **Agar APN (Actidiona-Polimixina-Nitrito)**

Principio: El nitrito le confiere su carácter selectivo, el cual es tolerado por las BAL, la actidiona inhibe levaduras y la polimixina inhibe bacterias Gram negativas.

Las BAL en este medio forman colonias blancas puntiformes, y algunas llegan a medir de 2 a 3 mm de diámetro (Fernández y Hernández, 1985).

- **Agar de Chalmers**

La morfología macroscópica que presentan las BAL en este medio es: tamaño de colonia puntiforme de aproximadamente 2 mm de diámetro, colonias rojas, magenta o rosas con la presencia de un halo rosa claro, con un aspecto aperlado. Este medio no requiere pruebas confirmativas adicionales como las pruebas de catalasa y oxidasa, para confirmar que se trata de BAL (Ortiz, 2006).

1.3 Vías metabólicas

Las BAL se separan en tres grupos según las vías metabólicas utilizadas para fermentar la glucosa y la capacidad de metabolizar las pentosas.

El **primer grupo**, definido como homofermentativas obligadas, fermentan la glucosa a ácido láctico exclusivamente a través de la vía glucolítica, pero no puede fermentar pentosas y compuestos relacionados. Las cepas con estas características se clasifican como lactobacilos del grupo I, según la clasificación de Kandler y Weiss (1986).

El **segundo grupo**, BAL facultativamente heterofermentativas, fermentan glucosa a ácido láctico mediante glucólisis, pero también fermenta pentosas y compuestos relacionados a través de la vía de la fosfocetolasa. *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactovum*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y

Lactobacillus spp del grupo II, están incluidos en este grupo. Hasta ahora se ha informado que los tetragenococos son facultativamente heterofermentativos, excepto *Tetragenococcus osmophilus*, que muestra un metabolismo ácido mixto al producir lactato y acetato en caldo Soya Trypticaseína (TSB).

Los miembros de *Carnobacteriaceae* probablemente metabolizan la glucosa a piruvato por medio de la glucólisis, con el piruvato metabolizado a ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético y etanol con o sin CO₂. Por lo general, metabolizan las pentosas y, por lo tanto, se clasifican como facultativamente heterofermentativas (Endo & Dicks, 2014).

El **tercer grupo**, las BAL obligatoriamente heterofermentativas, metabolizan la glucosa, las pentosas y compuestos relacionados a través de la vía de la fosfocetolasa. *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* y *Lactobacillus spp* del grupo III están incluidos en este grupo. *Fructobacillus spp.* metabolizan la glucosa a cantidades casi equimolares de ácido láctico y ácido acético y muy poco etanol (Endo & Okada, 2008; Endo et al., 2009). Es probable que este metabolismo se lleve a cabo mediante la vía de la fosfocetolasa, y deben formarse grandes cantidades de ácido acético a partir de acetilfosfato en lugar de etanol. Sin embargo, *Fructobacillus spp.* carecen de la capacidad de metabolizar las pentosas debido a la ausencia de enzimas como pentosa quinasa, epimerasas o isomerasas. A pesar de ello, deben clasificarse como estrictamente heterofermentativas debido a su metabolismo de la glucosa.

La clasificación como homofermentativa o heterofermentativa depende de la presencia o ausencia de aldolasa o fosfocetolasa, enzimas clave para llevar a cabo la glucólisis y la vía de las pentosas, respectivamente. Por ejemplo, las BAL homofermentativas poseen la enzima aldolasa pero no fosfocetolasa, mientras que en las BAL heterofermentativas es totalmente lo opuesto. Las BAL facultativamente heterofermentativas comparten características de ambos grupos, ya que tienen enzimas de ambas vías metabólicas (Endo, 2014).

Homofermentativo.

El grupo homofermentativo compuesto de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, utilizan la ruta **Embden-Meyerhoff-Parnas**, al convertir 1 mol de

glucosa en dos mol de ácido láctico; se produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa (figura 1).

Las bacterias lácticas homofermentativas poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, pero carecen de la fosfoacetolasa. Dentro de este grupo se tiene a *Lactobacillus* solos o en cadenas cortas, termófilos, acidificantes muy potentes y de actividad caseolítica notable, y a *Streptococcus*, de forma esférica en cadenas, acidificación rápida y poca actividad caseolítica (Parra, 2010).

Este grupo de bacterias, al no poseer piruvato descarboxilasa, transfieren el hidrógeno formado por acción de la fosfotriosa deshidrogenasa a ácido pirúvico con ayuda de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD), y lo transforma en ácido láctico (Parra, 2010).

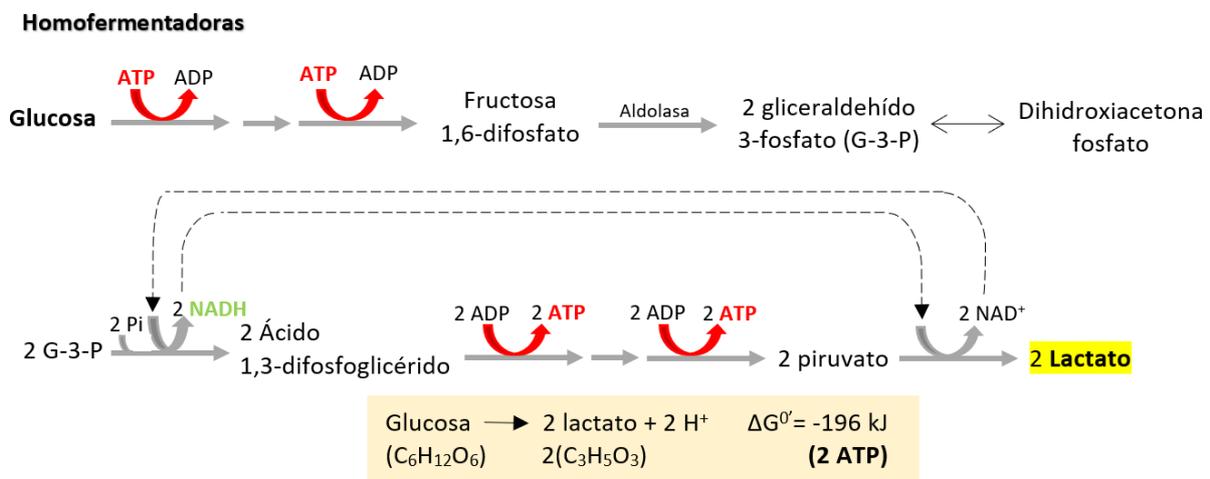


Figura 1. Fermentación de la glucosa en bacterias ácido lácticas homofermentadoras (Madigan et al., 2015).

Heterofermentativo.

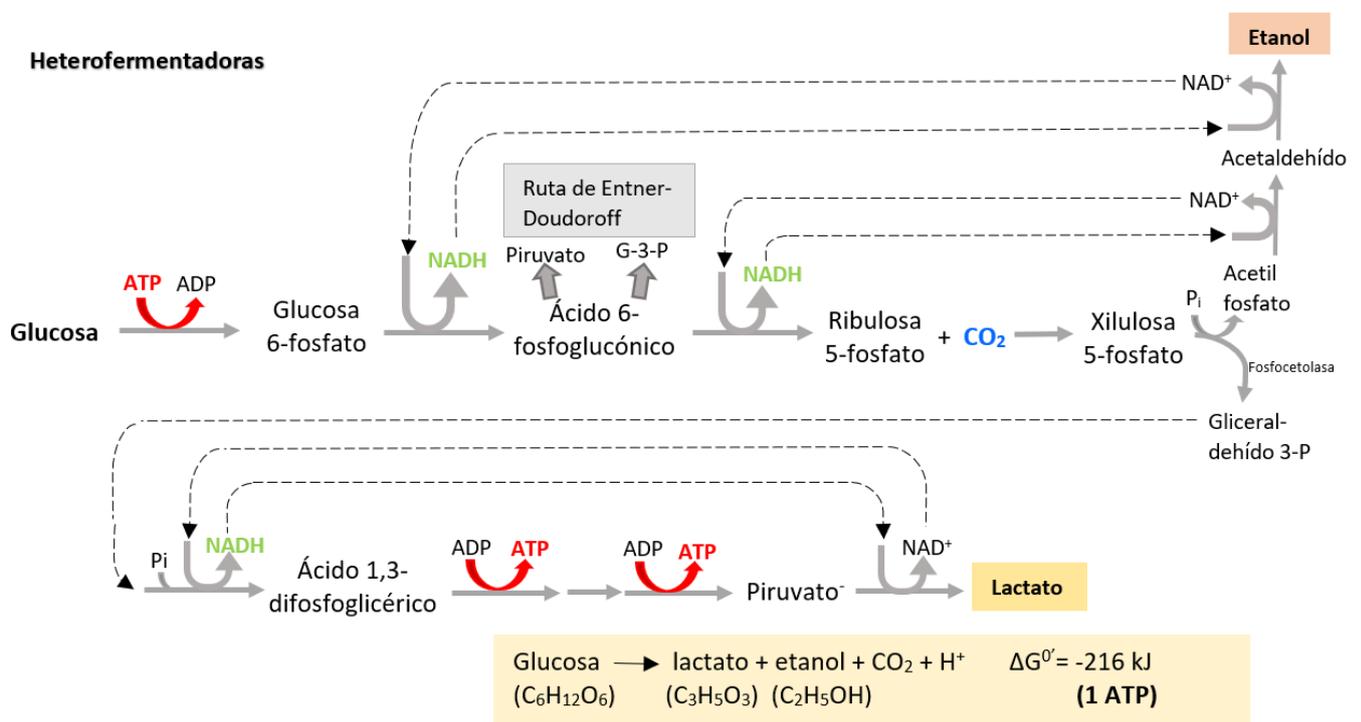
Las BAL heterofermentativas producen cantidades equimolares de lactato, CO₂ y etanol a partir de la fermentación de glucosa usando la hexosa monofosfato o la vía de las pentosas (figura 2). De esta forma, solamente generan la mitad de la energía que genera el grupo homofermentativo.

Con excepción de ciertos productos lácteos fermentados, las BAL heterofermentativas rara vez se utilizan como cultivos iniciadores, aunque son comunes en la leche y los productos lácteos. Si se les permite crecer significativamente, pueden causar defectos relacionados con su producción de ácido

y CO₂, como hendiduras en quesos duros o empaques hinchados en otros productos lácteos (Cornell University, 2021).

Entre las BAL heterofermentativas se encuentran *Leuconostoc spp.* (cocobacilos Gram positivos) y bacilos Gram positivos como *Lactobacillus brevis*, *Lb. fermentum* y *Lb. reuteri*. Otras especies de *Lactobacillus* se consideran heterofermentativas facultativas, lo que significa que producirán CO₂ y otros subproductos solo bajo ciertas condiciones o con sustratos específicos. Estas cepas incluirían *Lb. plantarum*, *Lb. casei* y *Lb. curvatus* (Cornell University, 2021).

El grupo heterofermentativo sigue la ruta de **Entner-Doudoroff**, produciendo solamente 50 % de ácido láctico. Estas fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂, generando 1 mol de ATP por cada mol de glucosa (Parra, 2010).



*Obsérvese que en las reacciones de formación de etanol no se forma ATP.

Figura 2. Fermentación de la glucosa en bacterias ácido lácticas heterofermentadoras (Madigan et al., 2015).

1.4 Taxonomía

Las bacterias ácido lácticas pertenecen al phylum Firmicutes que comprende alrededor de veinte géneros. Los principales géneros son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, siendo *Lactobacillus* el más grande de estos géneros (Parra, 2010).

Según las secuencias de ARNr 16S, los lactobacilos se distribuyen filogenéticamente en siete grupos: *Lactobacillus buchneri* (bu), *Lactobacillus casei* (ca), *Lactobacillus delbrueckii* (de), *Lactobacillus plantarum* (pl), *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei* (sa) y *Lactobacillus salivarius* (sl) (De Angelis, 2016).

Recientemente, Zheng et al. (2020), indicaron que el género *Lactobacillus* comprende 261 especies y que son extremadamente diversas a nivel fenotípico, ecológico y genotípico. El estudio que realizaron evaluó la taxonomía de *Lactobacillaceae* y *Leuconostocaceae* sobre la base de secuencias del genoma completo. Los parámetros que se evaluaron incluyeron la filogenia del genoma central, la identidad de aminoácidos promedio por pares (conservada), los genes distintivos específicos del clado, los criterios fisiológicos y la ecología de los organismos. Con base en estos criterios evaluados, se propuso la reclasificación del género *Lactobacillus* en 25 géneros, incluido el género modificado *Lactobacillus*, que incluye organismos que se han denominado grupo *Lactobacillus delbrueckii*, *Paralactobacillus* y 23 nuevos géneros cuyos nombres propuestos son *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* y *Lentilactobacillus*.

Así mismo, el trabajo de Zhen propuso corregir errores en la descripción de la familia *Lactobacillaceae* para poder añadir todos los géneros que anteriormente estaban incluidos en las familias *Lactobacillaceae* y *Leuconostocaceae*.

Esta reclasificación refleja la posición filogenética de los microorganismos y agrupa a los lactobacilli en clados robustos con propiedades ecológicas y metabólicas compartidas, como se ejemplifica para el género modificado *Lactobacillus* que abarca especies adaptadas a vertebrados (tales como *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensensii*, *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus acidophilus*) o invertebrados (tales como *Lactobacillus apis* y *Lactobacillus bombicola*) (Zheng et al, 2020).

En la Tabla 2 se describen las familias más importantes de bacterias ácido lácticas.

Tabla 2. Familias y especies de bacterias ácido lácticas (Holzapfel, 2014).

Familia	Género	Descripción de la familia
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Abiotrophia</i> <i>Aerococcus</i> <i>Dolosicoccus</i> <i>Eremococcus</i> <i>Focklamia</i> <i>Globicotella</i> <i>Ignavigranum</i>	La familia contiene varios géneros compuestos por cocos o cocobacilos Gram positivos, inmóviles, ovoides. Se determinó que las paredes celulares contienen lisina. No se forman endosporas. Estas bacterias son anaerobias facultativas, catalasa negativas y pueden crecer en medios que contengan 6.5% de NaCl (Lawson, 2014).
<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Alkalibacterium</i> <i>Allofustis</i> <i>Alloiococcus</i> <i>Atopobacter</i> <i>Atopococcus</i> <i>Atopostipes</i> <i>Bavariiococcus</i> <i>Desemzia</i> <i>Dolosigranulum</i> <i>Granulicatella</i> <i>Isobaculum</i> <i>Lacticigenium</i> <i>Marinilactibacillus</i> <i>Trichococcus (incl.</i> <i>Lactosphaera)</i>	Los miembros de esta familia son bacilos o cocos Gram positivos que no forman esporas. En general, son anaerobias facultativas, pero algunas especies crecen aeróbicamente o en condiciones microaerófilas. La mayoría son catalasa negativas, excepto para algunas especies del género <i>Alloiococcus</i> . Las células pueden ser móviles o no. El metabolismo es homofermentativo o heterofermentativo con producción de ácidos láctico y acético. Aunque la fermentación es el modo preferido de metabolismo, la respiración se activa en condiciones aeróbicas con la participación de los tipos b y d de citocromos. No se han encontrado ni informado tipos de respiración anaeróbica (Pikuta, 2014).
<i>Enterococcaceae</i>	<i>Catelicoccus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Melissococcus</i> <i>Pilibacter</i> <i>Tetragenococcus</i> <i>Vagococcus</i>	A pesar de la estrecha relación filogenética entre estos géneros, sólo muestran algunos rasgos comunes. Son anaerobios facultativos, anaerobios o microaerófilos. Algunas especies son carboxífilas o halófilas. Forman cocos o bacilos ovoides Gram positivos, no formadores de esporas, que pueden ser móviles. Son catalasa

		negativas, quimioorganotróficas, con metabolismo fermentativo y requerimientos complejos de nutrientes (Švec, 2014).
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Paralactobacillus</i> <i>Pediococcus</i>	Las bacterias de esta familia son Gram positivas, anaerobias facultativas o aerotolerantes, catalasa negativas, generalmente inmóviles y no formadoras de esporas, con una capacidad variable para fermentar carbohidratos a lactato y otros subproductos, como acetato, etanol, CO ₂ , formato y succinato (Felis, 2014).
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Fructobacillus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>	Esta familia muestra la más amplia diversidad de tipos de peptidoglicanos. Los miembros de esta familia son BAL heterofermentativas obligadas y normalmente producen ácido láctico, dióxido de carbono y etanol durante el metabolismo de la glucosa por la vía de las pentosas fosfato. Los miembros de <i>Leuconostocaceae</i> no son termófilos y la temperatura óptima de crecimiento es de 20°C–30°C. Por lo general, no son acidófilos, pero <i>O. oeni</i> es un representante de las BAL acidófilas, con cepas que muestran la capacidad de crecer incluso a pH 3.7. Para el crecimiento, los miembros de la familia suelen preferir condiciones anaeróbicas (Endo, 2014).
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Lactovum</i> <i>Streptococcus</i>	Las bacterias que pertenecen a esta familia son cocos Gram positivos, catalasa negativos, de forma ovoide o esférica, y su pared celular contiene lisina. No forman endosporas y tienen un bajo contenido de G+C (33–46 mol %) en su ADN. Son anaerobias facultativas y quimioorganotróficas (Toit, 2014).

**Bifidobacterium* no es taxonómicamente BAL, pero por su metabolismo se clasifica como tal.

1.5 Identificación

Para describir adecuadamente a los microorganismos es necesario establecer sus características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y genéticas, ya que, contando con esta información es posible identificarlos y clasificarlos (Ramírez *et al.*, 2015).

1.5.1 Identificación fenotípica

Las cepas de bacterias ácido lácticas deben identificarse por características fenotípicas, como:

- Morfológicas: forma, color, textura y tamaño de las colonias que forman en un medio de cultivo, así como de las células (cocos, bacilos, cocobacilos o con forma ovoide).
- Tinción de Gram: al pertenecer al grupo de Gram positivos, las BAL deben observarse bajo el microscopio con una coloración púrpura al realizar la tinción de Gram.
- Metabólicas: mecanismos de obtención de energía y productos generados en la fermentación.
- Fisiológicas: requerimientos de oxígeno, intervalos de temperatura (8–65 °C), pH (3.9–9.6) y concentración de sales para su crecimiento (4.0–18%).
- Químicas: análisis de marcadores quimiotaxonómicos, como perfil de ácidos grasos (FAMES), lípidos polares, quinonas, poliaminas y componentes de la pared celular.

1.5.2 Identificación bioquímica

Las pruebas bioquímicas se basan en la actividad metabólica de las bacterias, como la utilización de compuestos de carbono y nitrógeno, capacidad de fermentar azúcares, formación de metabolitos secundarios, así como la producción de enzimas y toxinas. Las principales pruebas bioquímicas para identificar bacterias ácido lácticas en alimentos fermentados son las siguientes:

1. Pruebas de metabolismo de carbohidratos: para distinguir BAL homo o heterofermentativas se analiza si puede metabolizar un carbohidrato, generalmente glucosa, a un ácido por oxidación (proceso aeróbico) o llevar a cabo la fermentación de éste (proceso anaeróbico), produciendo CO₂ a partir de glucosa. Adicionalmente se realizan pruebas de hidrólisis de almidón.
2. Pruebas de metabolismo de proteínas y aminoácidos: producción de amoniaco a partir de arginina, hidrólisis de caseína, licuefacción de gelatina, producción de indol, pruebas de aminoácidos descarboxilasa y prueba de fenilalanina desaminasa.

3. Prueba del metabolismo de grasas: hidrólisis de tributirina.
4. Pruebas de enzimas: presencia de catalasa, oxidasa, ureasa, coagulasa y nitrato reductasa.
5. Prueba de producción de dextrano a partir de sacarosa, exclusivamente para *Leuconostoc* sp.
6. Configuración del ácido láctico: La configuración del ácido láctico producido por BAL se determina enzimáticamente usando kits de D-lactato y L-lactato deshidrogenasa.

Los métodos comerciales que se usan comúnmente para la identificación bioquímica de BAL son los siguientes:

Sistema API 50 CH

Se trata de un sistema estandarizado compuesto por 50 ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de bacterias por medio de la fermentación rápida de los carbohidratos. En combinación con el medio API 50 CHL, es posible identificar a *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* (La Torre, 2011).

La tira reactiva API 50 CHL permite la determinación de la capacidad fermentativa de 49 carbohidratos diferentes de una cepa aislada. Durante el período de incubación, la fermentación se traduce en un cambio de color en el tubo, debido a una producción de ácido en anaerobiosis, revelada por el indicador de pH del medio elegido. El primer tubo, sin principio activo sirve como testigo negativo.

El software de identificación de la base de datos API LAB PLUS disponible en <https://apiweb.biomerieux.com/login>, utiliza un lector óptico controlado por computadora y tarjetas específicas para generar un perfil bioquímico que se utiliza para interpretar los resultados.

Sistema rápido API ZYM

El sistema API ZYM permite la detección de varias enzimas constitutivas y otras reacciones de prueba dentro de unas pocas horas después de la inoculación. Este sistema se ha utilizado para detectar la actividad de 19 enzimas diferentes de tejidos, bacterias o células. Además, la técnica API ZYM es un método rápido y sencillo para evaluar los perfiles enzimáticos de microorganismos, principalmente de BAL

asociadas a alimentos fermentados. Este método también es relevante para la selección de cepas como potenciales cultivos iniciadores, basados en perfiles enzimáticos superiores, para mejorar la calidad de productos fermentados tradicionales (Tamang, 2014).

El sistema consta de una galería de cúpulas de plástico, la cuales en el fondo tienen un soporte de tela que lleva los sustratos y el tampón. Estos sustratos detectan las enzimas siguientes: fosfatasa alcalina y ácida, butirato esterasa, caprilato esterasa/lipasa, leucina, valina y cistina aminopeptidasas, tripsina, quimotripsina, fosfoamidasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa y α -manosidasa. (Humble, 1977). Las actividades relativas de 19 enzimas hidrolíticas se pueden determinar semicuantitativamente inoculando gotas de suspensiones celulares en micro cúpulas, las cuales se incuban a 30°C durante 6 h. Después de la incubación, se agrega una gota del reactivo zym-A y zym-B ya preparado y se observa el desarrollo del color según la tabla de colores del fabricante.

Biolog System

Biolog system es un sistema que se usa para la identificación rápida y precisa de más de 2900 especies de bacterias, levaduras y hongos aeróbicos y anaeróbicos.

La tecnología fenotípica avanzada de Biolog proporciona información valiosa sobre las propiedades de las cepas, además de una identificación a nivel de especie.

La tecnología de utilización de fuentes de carbono de Biolog identifica microorganismos ambientales y patógenos mediante la producción de un patrón característico o "huella digital metabólica" a partir de reacciones de prueba discretas realizadas dentro de una microplaca de 96 pocillos. Estas microplacas incorporan un tinte de tetrazolio redox patentado que después de la incubación, durante 4 a 24 h, cambia de color debido a la respiración celular proporcionando la huella digital metabólica. La cepa se identifica comparándola con los patrones de la base de datos de referencia, para lo cual Biolog System (<https://labservices.biolog.com/login.php>) proporciona una amplia base de datos para las especies de BAL (Tamang, 2014).

Ácido diaminopimélico (DAP)

El ácido diaminopimélico es un derivado épsilon carboxilado del aminoácido lisina. Las bacterias Gram negativas utilizan el isómero meso-DAP para reticular la lámina de peptidoglicano de la pared celular, mientras que las bacterias Gram positivas utilizan su producto biosintético, la L-lisina, para hacer lo mismo (Chatterjee et al., 2021).

Para la confirmación de *L. plantarum* y *Lactobacillus pentosus*, la presencia de ácido diaminopimélico en la pared celular debe determinarse mediante cromatografía en capa fina (CCF), para ello cada muestra se coloca sobre placas de celulosa, las cuales se mantienen en una cámara que contiene una solución de metanol, piridina, HCl 10 N y agua (32:4:1:7). Después de mantener las placas en la cámara durante 4 a 5 horas, se secan y se revelan los cromatogramas mediante pulverización de ninhidrina ácida. Las manchas que representan meso-DAP aparecen de color verde oscuro a gris y se vuelven amarillas en 24 h (Tamang, 2014).

Por otro lado, Marconi (2000) reportó un método de detección rápida de ácido meso-diaminopimélico en bacterias ácido lácticas, mediante la hidrólisis de su pared celular por microondas, el cual consiste en la hidrólisis de células enteras, tanto en fase líquida como en fase de vapor, con HCl 6 N en recipientes sellados, utilizando un horno de microondas equipado con sondas de presión y temperatura. La presencia o ausencia de ácido meso-diaminopimélico determinada por CCF, después de la aplicación de procedimientos de hidrólisis por microondas en fase líquida y vapor, dio los mismos resultados cualitativos que los obtenidos por hidrólisis tradicional. Estos procedimientos estandarizados de hidrólisis por microondas permiten una drástica reducción del tiempo de hidrólisis, de 16-20 h a menos de 10 min y, en consecuencia, del tiempo total de análisis del ácido meso-diaminopimélico.

Perfil de ácidos grasos celulares

Los sistemas de perfiles de ácidos grasos celulares pueden reducir la subjetividad y el tiempo de respuesta, pero aún dependen de la identificación fenotípica. Se puede utilizar la cromatografía de gases para determinar el perfil de los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en la estructura celular de los microorganismos. Los ácidos grasos de cadena ramificada predominan en algunas bacterias Gram positivas,

mientras que los hidroxiácidos de cadena corta suelen caracterizar los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas (Tamang, 2014).

Los principales factores que afectan la composición de ácidos grasos celulares son la temperatura de cultivo, el pH, el contenido de NaCl en el medio de cultivo, la etapa de crecimiento y el método de aislamiento de grasa (Gilarová, 1994).

Un estudio desarrollado en Chile determinó el perfil de ácidos grasos de varias especies del género *Vibrio* y otras especies como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por cromatografía de gases, y se obtuvo como resultado que el perfil de ácidos grasos es único para cada especie analizada y significativamente diferente tanto para las especies de *Vibrio* como para las otras bacterias consideradas. Por lo que se confirma que el perfil de ácidos grasos puede ser una prueba alternativa para la identificación del género de un microorganismo a un bajo costo y en poco tiempo (Valenzuela et al., 2012).

1.5.3. Identificación molecular

La identificación fenotípica de los microorganismos fermentativos requiere mucho tiempo y, a menudo, es problemática debido a características bioquímicas o fisiológicas ambiguas. En los últimos años, el desarrollo de métodos de identificación por medio de métodos moleculares ha ofrecido la posibilidad de acelerar mucho la identificación bacteriana (Aymerich *et al.*, 2003).

La identificación molecular o genotípica está surgiendo como una alternativa o complemento a los métodos fenotípicos establecidos, que es una herramienta de identificación precisa y confiable, y se usa ampliamente para identificar microorganismos tanto dependientes como independientes del cultivo a partir de alimentos fermentados. Por lo general, la identificación genotípica de bacterias implica el uso de secuencias conservadas dentro de dianas genéticas filogenéticamente informativas, como el gen de ARNr de subunidad pequeña (16S). A continuación, se presentan algunos métodos importantes de identificación molecular o genotípicos que se utilizan amplia u ocasionalmente en estudios de alimentos fermentados.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante 35 ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células.

Materiales y equipo

- Templado o molde de ADN: Es la fuente del segmento de ADN que se va a amplificar, sirve como plantilla.
- ADN polimerasa: Se trata de una enzima termoestable que soporta temperaturas de hasta 98°C. La Taq Polimerasa es la más utilizada y se obtiene de la bacteria *Thermus Aquaticus* que habita en aguas termales.
- Cebadores: Incluyen dos fragmentos cortos, oligonucleótidos de ADN monocatenario, formados por 15 a 30 nucleótidos que son específicos de las secuencias diana
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs): Incluyen unidades individuales de todas las bases nitrogenadas que son los ingredientes básicos para la síntesis de ADN. Además, se sabe que son importantes para satisfacer la demanda de energía durante la polimerización o el alargamiento de la cadena.
- Ion magnesio (Mg^{2+}): El ion divalente de magnesio actúa como cofactor y aumenta la actividad enzimática de la ADN polimerasa.
- Buffer: Controla el pH para mantener un entorno ideal para la actividad de ADN polimerasa en la reacción de PCR. El pH se sitúa entre 8.0 y 9.5, y el Tris-HCl ayuda a su estabilización.
- Agua destilada: Para completar el volumen final de la reacción.
- Termociclador: Equipo que permite realizar de forma automatizada y secuencial los ciclos de temperaturas necesarios para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de ADN (Masoodi et al., 2021).

Metodología de la PCR

Consiste en una serie de ciclos de amplificación de tres pasos sucesivos cada uno, estos son la desnaturalización, hibridación y extensión.

- Desnaturalización:

El fragmento de ADN que contiene la secuencia deseada se calienta para su desnaturalización a 94°C durante 15 segundos. La desnaturalización permite la separación de las hebras complementarias rompiendo los enlaces de hidrógeno que mantienen unido al ADN en una hélice. Las hebras separadas actúan como plantillas para la copia del ADN.

- Hibridación:

En este paso, tiene lugar la hibridación de dos cebadores con las cadenas desnaturalizadas. La temperatura debe ser reducida entre 55°C a 60°C, para permitir que los cebadores se unan al ADN molde. La temperatura no debe ser menor a 50°C ya que puede provocar una falta de coincidencia.

- Extensión o polimerización:

En esta etapa, los DNTs y la enzima Taq ADN polimerasa se añaden a la mezcla de reacción y se calientan a 72°C. La ADN polimerasa conduce a la extensión o polimerización de los cebadores agregando nucleótidos secuencialmente a los cebadores ya unidos a las cadenas de ADN deseadas (Masoodi et al., 2021).

Al final de la reacción, para corroborar si se amplifica la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay et al., 2013).

Ventajas

La técnica produce millones de copias de un único segmento de ADN en un período de tiempo más corto. Tiene una amplificación específica y el procedimiento es rápido.

Limitaciones

La ejecución y la configuración requieren habilidades técnicas muy altas. Tiene un alto costo de equipo y requiere un ambiente altamente estéril (Masoodi et al., 2021).

PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

El principio de esta técnica se basa en la PCR tradicional, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra, a diferencia de la PCR

tradicional en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco. Precisamente, estas últimas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para saber si la reacción fue exitosa, como sucede en la PCR tradicional (Tamay et al., 2013).

Las ventajas significativas de la PCR en tiempo real incluyen su capacidad para medir concentraciones de ADN en un amplio rango, su sensibilidad, su capacidad para procesar múltiples muestras simultáneamente y su capacidad para proporcionar información inmediata. Una desventaja es que los equipos son más caros que los de PCR tradicionales. La PCR en tiempo real es especialmente útil en grandes laboratorios comerciales que procesan una gran cantidad de muestras (Hoy, 2013).

Electroforesis en gel de campo pulsado

La PFGE, por su nombre en inglés Pulse Field Gel Electrophoresis, es un método en donde el ADN se traslada a través de un gel de agarosa concentrado, bajo la influencia de dos campos eléctricos. Los dos ángulos de los campos eléctricos se encuentran cerca de la perpendicularidad, no son uniformes en la intensidad de campo y cambian de manera alterna (pulsos). En general, se supone que en concentraciones altas de agarosa y con tensiones elevadas, las moléculas grandes de ADN deben ser elongadas a lo largo de la dirección del campo eléctrico con el fin de penetrar a través de los poros del gel. Cuanto más grande sea la molécula de ADN, mayor será el tiempo para encontrar la nueva orientación y la retención en el gel (Cardozo et al., 2013).

Esta técnica permite la separación electroforética de un número reducido de fragmentos de restricción de ADN de gran tamaño. Estos fragmentos se producen utilizando enzimas de restricción de corte poco frecuente, para generar una huella genética altamente discriminatoria. La PFGE es relativamente costosa y requiere al menos 3 días para obtener un resultado (Tamang, 2014).

Southern blot

Este método fue desarrollado para la detección de genes específicos en el ADN celular, es decir, permite detectar la presencia de una secuencia de ADN concreta en una mezcla compleja de este ácido nucleico. Para ello, emplea la técnica de electroforesis en gel de agarosa con el fin de separar los fragmentos de ADN de acuerdo con su longitud y, después, una transferencia a una membrana en la cual se efectúa la hibridación de la sonda (Southern, 1975).

Es una hibridación ADN-ADN que mide el grado de similitud genética entre grupos de secuencias de ADN. Se utiliza para determinar la distancia genética entre dos especies. Cuando se comparan varias especies, los valores de similitud permiten que las especies se organicen en un árbol filogenético (Tamang, 2014).

Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante o *molecular fingerprinting*

La electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE por sus siglas en inglés), es un método que consiste en la separación de la doble cadena de ADN o desnaturización del ADN. Estos fragmentos amplificados de ADN, de longitud idéntica, pero secuencia diferente, pueden visualizarse electroforéticamente debido a su diferente comportamiento de difusión en un sistema de gel que contiene un gradiente de desnaturizantes. La DGGE y su electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE), se desarrollaron para analizar comunidades microbianas en productos lácteos fermentados, basándose en diferencias específicas entre secuencias de amplicones de ARNr 16S producidos por PCR. Si se utiliza el ADN total de una comunidad microbiana en la amplificación por PCR, estas técnicas pueden proporcionar el perfil de la diversidad genética de las poblaciones dominantes. Si en su lugar se usa ARN total, los perfiles revelan las poblaciones metabólicamente activas. Aunque TGGE y DGGE son utilizados particularmente para la detección de mutaciones de base única y polimorfismos de ADN genómico, clonado y amplificado por PCR, tanto la PCR–DGGE como la PCR–TGGE se utilizan para estudiar la diversidad y dinámica de los microorganismos en las fermentaciones de alimentos y para perfilar los patógenos directamente en las muestras de alimentos (Tamang, 2014).

Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST)

La MLST es una técnica de epidemiología molecular que permite la tipificación bacteriana mediante la identificación de polimorfismos, tras la amplificación y secuenciación de fragmentos de entre 300-500 pb de 7 genes conservados, diferentes para cada especie bacteriana. Se trata de una técnica sencilla, objetiva y fácilmente reproducible que permite identificar asociaciones clonales y establecer relaciones evolutivas. Sin embargo, no presenta una alta capacidad discriminativa (Red de laboratorios para la vigilancia de microorganismos resistentes, 2020).

La tipificación de secuencias multilocus de genes de mantenimiento, determina directamente las variaciones de la secuencia de ADN en un conjunto de genes fundamentales para llevar a cabo las funciones celulares básicas, y caracteriza las cepas por sus perfiles alélicos únicos. Las diferencias de nucleótidos entre cepas se pueden comprobar en un número variable de genes, generalmente siete, dependiendo del grado de discriminación deseado. Se han propuesto genes de mantenimiento como marcadores moleculares alternativos a los genes de ARNr 16S para la identificación de especies de BAL: genes *rpoA* y *pheS* para *Enterococcus* y *Lactobacillus*; *atpA* y *pepN* para especies de *Lactococcus*; y *dnaA*, *gyrB* y *rpoC* para especies de *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella*.

El análisis filogenético basado en las secuencias de genes de mantenimiento es un enfoque superior a la secuencia del gen ARNr 16S para la discriminación de cepas de BAL, estrechamente relacionadas de los alimentos fermentados étnicos (Tamang, 2014).

Microarreglos

Los microarreglos son una tecnología que permiten la detección de microorganismos en diferentes tipos de muestras biológicas (tejidos, proteínas y material genético) y de miles de moléculas de manera simultánea por ensayo, a diferencia de lo que ocurre con otras técnicas de biología molecular (PCR, Western blot, Northern blot o Southern blot) en las cuales sólo se pueden analizar un número limitado de moléculas por ensayo.

En términos generales, un microarreglo se encuentra integrado por dos partes, el material biológico o sintético denominado como prueba y el soporte sólido (también

llamado chip) donde se adhiere el material biológico. Entre los materiales más usados como soporte sólido encontramos plástico, vidrio, gel, silicón, membranas porosas y oro (Medina y Espinosa, 2009). Además, a las muestras se añaden tintes fluorescentes llamados Cy3 y Cy5 que se unen al ADN, para que generen la fluorescencia.

Este método consiste en colocar miles de secuencias génicas y una muestra que contiene ADN o ARN en lugares determinados sobre el chip. El apareamiento de las bases complementarias entre la muestra y las secuencias de genes en el chip producirá una cantidad de luz (fluorescencia) que se puede medir. Las áreas del chip que producen luz identifican los genes que se expresan en esa muestra (National Human Genome Research Institute, 2023).

La versatilidad de esta técnica permite utilizarla en estudios de dosis-respuesta, para establecer perfiles de expresión diferencial de genes en condiciones experimentales distintas (enfermedades, tratamientos, etc.), en el análisis de polimorfismos, presencia de metilaciones, mutaciones puntuales, identificación de blancos terapéuticos, etc. El desconocimiento de sus aplicaciones y los elevados costos de las pruebas, hacen que esta tecnología no sea comúnmente utilizada (Medina y Espinosa, 2009).

CAPÍTULO 2. Producción de compuestos antimicrobianos por las bacterias lácticas. Descripción general.

Un metabolito es un compuesto producido durante el metabolismo del microorganismo. Las bacterias ácido lácticas producen una serie de metabolitos, que pueden cumplir ciertas funciones en los alimentos.

Los metabolitos primarios están involucrados en el crecimiento, desarrollo y reproducción del organismo, por lo que son un componente clave en el mantenimiento de procesos fisiológicos normales. Estos metabolitos se forman típicamente durante la fase de crecimiento como resultado del metabolismo energético, y se consideran esenciales para un crecimiento adecuado. Algunos ejemplos de metabolitos primarios incluyen alcoholes como etanol, ácido láctico y ciertos aminoácidos (Madigan, et al., 2015).

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos producidos a partir de excedentes de metabolitos primarios. Los metabolitos secundarios no juegan un papel en el crecimiento, desarrollo y reproducción, y normalmente se forman al final o cerca de la fase estacionaria del crecimiento. Muchos de los metabolitos secundarios identificados tienen un papel en la función ecológica, incluidos los mecanismos de defensa, supervivencia propia en el ambiente que lo rodea al servir como antibióticos o producir pigmentos (Ramirez, 2016).

En la cadena de producción de alimentos existen riesgos de infección por patógenos generalmente implicados en enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* o los géneros *Salmonella*, *Campylobacter* y *Shigella*. Por lo que se necesita un control microbiológico estricto para impedir que estos lleguen al consumidor. Para inactivar estas bacterias se han estudiado diversas estrategias, por ejemplo, sistemas de bioconservación, tecnologías no térmicas o combinaciones de ellas. El empleo de bacterias ácido lácticas (BAL) o de sus metabolitos son un ejemplo importante de tratamientos de bioconservación.

Las BAL son consideradas seguras y se utilizan en muchos países en la producción de alimentos fermentados. Se caracterizan por la producción de sustancias antimicrobianas (ácidos láctico y acético, metabolitos) y de numerosas bacteriocinas, en las cuales se fundamenta su potente acción probiótica, antimicrobiana y bioconservadora.

La bioconservación de alimentos por medio de bacteriocinas producidas por bacterias del género *Lactobacillus* ha resultado exitoso en alimentos como la carne, para el control de ciertos microorganismos patógenos, entre ellos *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*.

2.1 Compuestos antimicrobianos

- **Ácido láctico:** Es generado por BAL homofermentativas a través de la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas, al convertir un mol de glucosa en dos mol de ácido láctico. Este producto es utilizado como acidulante, agente buffer o inhibidor de esporas de bacterias en una amplia variedad de alimentos procesados como pan, dulces, bebidas no alcohólicas, sopas, productos lácteos, mermeladas, gelatinas y mayonesas (Parra, 2010). Se prefiere la producción de ácido láctico por lactobacilos homofermentativos para reducir el pH más rápidamente ya que esto puede inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables y mejorar la calidad de la fermentación (Giraffa, 2014).
- **Ácido propiónico:** Se produce por bacterias heterofermentativas que son utilizadas en la industria de quesos, donde el ácido láctico es transformado en ácido propiónico y acético con desprendimiento de CO₂, el cual forma hoyos en quesos como el Emmental, Suizo y Gruyere (Parra, 2010).
- **Ácido cítrico (intermediario):** En mantequillas y quesos, las BAL heterofermentativas transforman el ácido cítrico en compuestos que brindan aroma característico de estos productos como la acetoína y el diacetilo producido por *Leuconostoc citrovorum* y *Streptococcus diacetylactis*, respectivamente. Estos compuestos, así como imparten aroma y sabor a los productos lácteos también tienen un efecto antimicrobiano, pues el acetaldehído es capaz de inhibir la división celular en *Escherichia coli*, y el

diacetilo inhibe levaduras, así como bacterias Gram negativas y Gram positivas (Parra, 2010).

- **Diacetilo:** Las bacterias productoras de aroma son principalmente cepas de *Leuconostoc citrovorum*. Estas bacterias fermentan el ácido cítrico y producen diacetilo (2,3-butanodiona) que es el componente característico del aroma de las mantequillas. El crecimiento de las cepas de *Leuconostoc citrovorum* es estimulado por el acetaldehído (Fernandez y Rafecas, 1985).
- **Etanol:** Es producido por BAL heterofermentativas, las cuales son organismos generalmente tolerantes al etanol, teniendo una mayor resistencia que la mayoría de las bacterias. Sin embargo, se sabe poco sobre el papel que juega la tolerancia al etanol en el deterioro de la cerveza, ya que existen diversos obstáculos en la cerveza que deben superarse para que un organismo pueda crecer y causar deterioro (Pittet, 2011). En un estudio realizado en 2016 para la producción de etanol por microorganismos intestinales seleccionados y bacterias del ácido láctico, se reporta que las mayores cantidades de etanol fueron producidas por *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de fructosa y *Lactobacillus fermentum* con glucosa. Debido a que manitol-deshidrogenasa se expresa en *L. fermentum*, la producción de etanol cuando el metabolito es fructosa se redujo significativamente (Elshagabee et al., 2016).
- **Ácido acético:** Las especies heterofermentativas obligadas utilizan solamente la ruta dependiente de fosfoacetolasa para metabolizar azúcares, y además de ácido láctico, producen cantidades significativas de ácido acético y/o etanol con la generación de dióxido de carbono. Las pentosas son metabolizadas mediante la vía fosfoacetolasa para producir ácidos orgánicos, como el ácido acético (Parra, 2010).

El ácido acético puede ser producido por BAL homofermentativas facultativas, en las que se encuentra *Streptobacterium*, así como por BAL heterofermentativas obligadas, donde se incluye al grupo *Betabacterium* (Agurto, 2008).

El vinagre es un producto alimenticio que contiene ácido acético y otros componentes. El ácido acético ha sido reconocido por sus propiedades funcionales, como su actividad antimicrobiana, entre otros (Gomes et al., 2018).

- **Peróxido de hidrógeno:** Es metabólicamente producido por el grupo *Lactococcus* a través de la acción de NADH oxidasa, la cual cataliza la oxidación de NADH por oxígeno molecular. El sistema lactoperoxidasa es un sistema antimicrobiano natural que se encuentra en la leche y ha sido utilizado exitosamente para alargar la vida útil de la leche y queso cottage, inhibiendo patógenos en leche y productos lácteos procesados como *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Parra, 2010).
- **Bacteriocinas:** Son péptidos bioactivos con efecto bactericida o bacteriostático. Algunas bacteriocinas de BAL pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas Gram positivas y negativas. También pueden inhibir el crecimiento de algunas especies de levaduras (Parra, 2010).
- **Exopolisacáridos (EPS):** son polisacáridos de cadena larga con ramificaciones, formados por unidades de azúcares. Estas unidades de azúcar son principalmente, glucosa, galactosa y ramnosa en diferentes proporciones. Las BAL al ser reconocidas como seguras, GRAS, son candidatas para la producción de EPS funcionales. Además, BAL son caracterizadas porque convierten una gran proporción de su fuente de carbono proveniente de azúcares fermentables, a ácido láctico, pero también porque son capaces de desviar una pequeña proporción de azúcares fermentables hacia la biosíntesis de EPS, dependiendo de las condiciones de cultivo y composición del medio (Parra, 2010).

Los polisacáridos pueden ser divididos en dos grupos: homopolisacáridos compuestos por un monosacárido como el dextrano, y heteropolisacáridos compuestos de diferentes azúcares como glucosa, galactosa, ramnosa, manosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido glucónico.

El factor que afecta el comportamiento reológico del coágulo de caseína es la producción de EPS proporcionado por los cultivos iniciadores. Algunos cultivos

de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbruekii* son capaces de producir polisacáridos de alto peso molecular con diferentes estructuras.

Los exopolisacáridos (EPS) desempeñan un papel importante en la industria, en la producción de derivados lácteos fermentados, en particular en la producción de yogurt, queso, crema fermentada, entre otras. Su aporte contribuye a la textura, reología, sabor, percepción sensorial y estabilidad final del producto. Además, los EPS han sido utilizados extensivamente como geles, emulsificantes y suspensiones de estabilizantes; otro beneficio fisiológico incluye la colonización gastrointestinal de bacterias probióticas incrementando la residencia de los EPS en el tracto gastrointestinal.

2.2 Estudios de casos de bioconservación por BAL

Un estudio realizado por la Asociación Argentina de Microbiología tuvo como objetivo evaluar la capacidad inhibitoria de *Lactobacillus* spp. frente a patógenos implicados en enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*. Para ello se tomaron muestras de las distintas etapas de la cadena productiva porcina. De dichas muestras se aislaron en total 78 cepas bacterianas, de las cuales 27 (34.61%) tuvieron características fenotípicas y genotípicas correspondientes al género *Lactobacillus* spp.; el 85.18% de ellas presentó capacidad inhibitoria frente a por lo menos una de las cepas patógenas evaluadas. Dichos resultados indican que los microorganismos aislados representan una potencial alternativa para inactivar a los patógenos presentes en los alimentos y así brindar alimentos más seguros a los consumidores (Ruiz et al., 2017).

Por otro lado, Trias et al., (2008) estudiaron el potencial bioconservador de varias cepas bacterianas del ácido láctico aisladas de frutas y verduras frescas (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* y *Weissella* spp.). Las cepas se probaron en manzanas golden delicious dañadas fisiológicamente y en cortes de hojas de lechuga iceberg inoculados artificialmente con patógenos transmitidos por los alimentos. El tratamiento de ambos productos con cepas antagonistas redujo el recuento celular de *Salmonella Typhimurium* y *E. coli* en 1000 UFC/g, mientras que el crecimiento de *Listeria monocytogenes* se inhibió por completo. Estos resultados mostraron que las

BAL son más eficientes para controlar a las bacterias Gram positivas que a las Gram negativas.

Álvarez et al. (2015) mencionan que se estudió la efectividad del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG como bacteria antagonista aplicando un cultivo protector en una cantidad de 10^8 UFC/ml en manzanas recién cortadas e inoculadas con *Salmonella* y *L. monocytogenes*. Los resultados obtenidos mostraron que *Salmonella* no se vio afectada por la presencia de *L. rhamnosus* GG, en cambio, la población de *L. monocytogenes* fue significativamente más baja que los controles no tratados durante el almacenamiento. Además, se demostró que la calidad de las manzanas no se vio afectada por la adición del probiótico y que los recuentos de *L. rhamnosus* GG se mantuvieron por encima del nivel generalmente recomendado para la acción probiótica, es decir, se mantuvo en 10^6 UFC/g.

CAPÍTULO 3. Bacteriocinas: clasificación, mecanismos de acción y métodos para su estudio

3.1 Definición

De acuerdo con Madigan et al. (2015), las bacteriocinas son proteínas que inhiben o matan especies estrechamente relacionadas o incluso cepas diferentes de la misma especie. Estos agentes, son análogos a los antibióticos, pero con un espectro más estrecho de actividad. Otra definición más especializada es la que proponen Parente y Ricciardi (1999), las bacteriocinas son productos primarios o modificados, liberados extracelularmente de la síntesis ribosómica bacteriana, que pueden tener un espectro relativamente estrecho de actividad bactericida, caracterizada por la inclusión de algunas cepas de la misma especie que la misma bacteria productora, y contra las cuales la cepa productora tiene algún mecanismo de protección específica.

Técnicamente, las bacteriocinas son péptidos sintetizados por bacterias con capacidad antimicrobiana. Tienen de 20 a 60 aminoácidos de longitud, catiónicos e hidrófobos, capaces de inhibir tanto a las bacterias que provocan el deterioro de los alimentos como a las bacterias patógenas, Gram negativas y positivas, por lo que proporcionan una nueva estrategia para combatir estos microorganismos (Kumariya et al., 2019).

Los genes que codifican a las bacteriocinas y las proteínas necesarias para procesarlas y transportarlas se encuentran normalmente en plásmidos. Por ejemplo, *Escherichia coli* produce bacteriocinas llamadas *colicinas*, que se unen a receptores específicos en la superficie de células susceptibles y las matan al alterar el funcionamiento de la membrana. Otras colicinas son nucleasas que degradan el ADN o el ARN de cepas susceptibles.

Con base en estudios extensos de las colicinas producidas por bacterias Gram negativas, se propusieron seis criterios para caracterizar las proteínas antimicrobianas producidas por organismos Gram positivos. Aunque los estudios sobre las proteínas antimicrobianas producidas por las bacterias del ácido láctico frecuentemente citan estos criterios:

- Las bacteriocinas deben ser proteínas. Ésta es la única característica absoluta de las bacteriocinas y generalmente se demuestra por la acción de proteasas y la pérdida de la actividad antimicrobiana. Sin embargo, dado que los péptidos también pueden ser inactivados por proteasas, existe cierto debate sobre el tamaño que debe tener un péptido antes de convertirse en una proteína. Se sugiere que si el polímero se elabora ribosómicamente mediante la transcripción de un gen único que posteriormente se traduce en proteína, entonces es una proteína. Sin embargo, si el polímero se elabora enzimáticamente mediante la condensación de aminoácidos (como es el caso de la gramacidina), debe considerarse un péptido. En el caso de moléculas más grandes, la inactivación de la actividad antibacteriana por una o más proteasas es prueba suficiente de que un inhibidor microbiano es proteínico y, por lo tanto, una bacteriocina. Deben usarse inhibidores de la síntesis de proteínas para determinar si los pequeños polímeros de aminoácidos son proteínas o péptidos.

- Las bacteriocinas pueden tener acción bactericida o bacteriostática. Si bien las primeras caracterizaciones sugirieron que muchas bacteriocinas son bactericidas, en 1977, se señaló que la nisina es un antimicrobiano débil y es esporostático o bacteriostático. Muchas bacteriocinas inicialmente son caracterizadas como bactericidas en sistemas modelo, pero más tarde han demostrado ser bacteriostáticas en aplicaciones alimentarias. Dado que muchos inhibidores microbianos ampliamente utilizados inhiben el crecimiento de patógenos sin matarlos, y el modo de acción bactericida es a menudo una función del sistema en estudio más que una característica inherente de la molécula, por lo que este criterio no es esencial para la definición de bacteriocinas (Montville y Kaiser, 1993).

- El requisito de que las bacteriocinas tengan sitios de unión específicos es responsable de la especificidad de una bacteriocina, es decir, que actúen contra patógenos específicos y puedan usarse para distinguirlas de otros antimicrobianos de amplio espectro, como los ácidos orgánicos y la mayoría de los antibióticos en general. Informes sobre formulaciones de nisina que

inhiben los organismos Gram negativos y la eficacia de las bacteriocinas contra esferoplastos y protoplastos sugieren que los sitios de unión no necesitan ser muy específicos.

El enlace plasmídico de las colicinas sugirió que las bacteriocinas están mediadas por plásmidos. Esto se ha encontrado para *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Carnobacterium piscicola* y *Pediococcus acidilactici*. Sin embargo, Joerger y Klaenhammer en 1986 descubrieron que el gen de helviticina J se encuentra en el cromosoma de *Lactobacillus helveticus*. De hecho, relativamente pocas bacteriocinas producidas por lactobacilos están mediadas por plásmidos y algunas se encuentran en el cromosoma, siendo más estables. La ubicación del gen que codifica una proteína antimicrobiana específica a menudo es difícil de determinar. Por ejemplo, se ha presentado evidencia que sugiere que el gen que codifica la nisina, que durante mucho tiempo se pensó que estaba en un plásmido, reside en el cromosoma de *Lactococcus lactis* ATCC 11454.

Por tanto, la localización del gen no es un criterio útil para su clasificación como bacteriocina.

- El criterio de que las bacteriocinas deben producirse por biosíntesis, sugiere que la célula que produce la bacteriocina debe morir en el proceso de liberación de la bacteriocina. Este requisito puede haber sido el resultado de una orientación hacia el metabolismo secundario generada por décadas de investigación en antibióticos. Sin embargo, las bacteriocinas se producen como proteínas durante la fase de crecimiento sin la lisis del organismo productor.
- El criterio final sugiere que las bacteriocinas son activas contra un amplio espectro de bacterias estrechamente relacionadas, es decir, muchas proteínas antimicrobianas producidas por bacterias Gram positivas son efectivas contra géneros de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (Montville y Kaiser, 1993).

Las excepciones a los seis criterios son tan numerosas que Konisky (1982) concluyó que solo hay dos requisitos verdaderos para definir a las bacteriocinas:

1. Su naturaleza proteica.

2. Su falta de letalidad para las células que las producen (es decir, no son proteínas suicidas).

Hay varios mecanismos diferentes mediante los cuales las bacterias se protegen a sí mismas del efecto adverso de sus propias bacteriocinas. Uno es la **modificación postraducciona**l, ya que, después de que la proteína se sintetiza como un pre-péptido, algunos residuos de aminoácidos se procesan postraduccionalmente para generar la molécula de proteína activa. Este es el caso de la nisina, con la generación de los aminoácidos tioéter lantionina y 3-metil-lantionina. Otras bacteriocinas procesan un precursor en muchos casos, dividiendo la prebacteriocina en una bacteriocina activa y una proteína de inmunidad (Montville y Kaiser, 1993).

3.2 Nomenclatura

La nomenclatura de las bacteriocinas es sencilla. Así como "asa" se usa en la nomenclatura de enzimas, el sufijo "cina" se usa para denotar actividad bacteriocinogénica. El sufijo "cina" se agrega al nombre del género de la especie. Por ejemplo, las colicinas se aislaron originalmente de *Escherichia coli*, las monocinas son proteínas antimicrobianas producidas por *Listeria monocytogenes*, la subtilina es producida por *Bacillus subtilis* y la estafilocina por *Staphylococcus aureus*. Las letras secuenciales asignadas en el orden de descubrimiento se utilizan después del nombre de la bacteriocina para diferenciar las bacteriocinas únicas producidas por diferentes cepas de la misma especie. Por ejemplo, la lactacina F fue la sexta bacteriocina reportada para una especie de lactobacilos (Montville y Kaiser, 1993).

3.3 Clasificación

Las bacteriocinas se clasifican según su estructura química, masa molecular, susceptibilidad enzimática, genética, mecanismo de destrucción microbiana, termoestabilidad, cepas productoras, actividades antimicrobianas y la presencia de residuos de aminoácidos modificados postraduccionales (Kaškonienė, 2017).

Un gran número de bacteriocinas son producidas por bacterias Gram positivas y se clasifican según su estructura química y mecanismo de acción como antimicrobianos (Álvarez *et al.*, 2015).

La clasificación de las bacteriocinas de las bacterias Gram positivas se complica por su heterogeneidad y, por tanto, dado que el número de bacteriocinas identificadas ha seguido aumentando, los esquemas de clasificación han tenido que evolucionar continuamente (Rea *et al.*, 2011).

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas, incluidos los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* y algunos miembros del género *Streptococcus*, han sido objeto de especial atención, ya que al ser bacterias que son GRAS, significa que sus péptidos asociados pueden emplearse en una gran variedad de formas, incluida la conservación de alimentos, la seguridad alimentaria y la medicina tanto humana como veterinaria.

La nisina A, producida por *Lactococcus lactis* es la más caracterizada de todas las bacteriocinas, y el interés significativo en la investigación relacionada con las bacteriocinas se puede rastrear en gran medida al desarrollo exitoso de nisina a partir de la observación de su actividad inhibidora de una cepa de *L. lactis* contra *Lactobacillus bulgaricus*, hasta su aprobación por agencias regulatorias, como agente bioprotector para alimentos.

Debido al amplio enfoque en las bacteriocinas producidas por BAL, se han sugerido varios esquemas de clasificación que son ampliamente aplicables a otras bacteriocinas de bacterias Gram positivas. Los primeros intentos para clasificar a las bacteriocinas de BAL implicaron colocar bacteriocinas individuales en uno de ocho grupos en función de su resistencia al calor, rango de hospedadores, sensibilidad a la tripsina y el grado de reactividad cruzada entre varias combinaciones de bacteriocina y hospedante.

Este enfoque fue reemplazado por el desarrollado por Klaenhammer (1993), quien agrupó a las bacteriocinas en cuatro clases distintas con más subclases. Estas

agrupaciones han formado la base de todos los esquemas de clasificación posteriores para las bacteriocinas de bacterias Gram positivas (Tabla 3).

Tabla 3. Esquema de clasificación original de Klaenhammer (Rea et al., 2011).

Grupo	Descripción	Características distintivas
Clase I	Bacteriocinas modificadas postraduccionalmente.	Contiene los aminoácidos inusuales lantionina, β -metil lantionina y residuos deshidratados.
Clase II	Péptidos no modificados.	Péptidos activos de membrana, termoestables, pequeños (<10 kDa).
Clase III	Proteínas no modificadas.	Proteínas termolábiles grandes (> 30 kDa), a menudo con actividad enzimática.
Clase IV	Proteínas complejas.	Contienen restos de lípidos o carbohidratos.

Las bacteriocinas se clasificaron inicialmente en cuatro clases como lo muestra la Tabla 3. Sin embargo, la cuarta clase de bacteriocinas, que consta de grandes complejos con restos de carbohidratos o lípidos, ha sido reemplazada y se denominó bacteriolisinas, las cuales comprenden leuconocina S y lactocina 27. Por tanto, las bacteriocinas se reclasifican principalmente en tres clases:

- **Bacteriocinas de clase I:** se componen típicamente de 19 a 50 aminoácidos y se modifican extensamente después de la traducción, lo que da como resultado aminoácidos no estándar, como lantionina, β -metil-lantionina y dehidroalanina (Kumariya et al., 2019).

La clase I se divide en subclases según sus similitudes estructurales:

-Subclase la lantibióticos, son péptidos relativamente alargados, flexibles y cargados positivamente; generalmente actúan formando poros en las membranas citoplasmáticas de especies diana sensibles. La nisina forma parte de este grupo.

-Subclase Ib laberintopeptinas, son característicamente globulares, de estructura más rígida y tienen carga negativa o neutra. Ejercen su acción interfiriendo con reacciones enzimáticas esenciales de bacterias sensibles (Parada et al., 2007).

-Subclase Ic sactibióticos, contienen enlaces característicos de azufre en el carbono alfa mediados por modificaciones postraduccionales (Mathur et al., 2015).

- **Bacteriocinas de clase II:**

La clase II consta de bacteriocinas peptídicas sin residuos modificados y se ha dividido en tres subclases, clase IIa, IIb y IIc. Las bacteriocinas de tipo pediocina de un péptido antilisterial, que tienen secuencias de aminoácidos muy similares se asignan a la clase IIa, mientras que las bacteriocinas de un péptido no similar a la pediocina que no muestran similitud de secuencia con las bacteriocinas de tipo pediocina se colocan en la clase IIc. La clase IIb contiene las bacteriocinas de dos péptidos, estas bacteriocinas son únicas porque consisten en dos péptidos muy diferentes y la actividad antimicrobiana óptima requiere la presencia de ambos péptidos en cantidades aproximadamente iguales. Desde el primer aislamiento de una bacteriocina de dos péptidos en 1992, la lactococcina G, se han identificado, aislado y caracterizado al menos 14 bacteriocinas de dos péptidos producidas por BAL (tabla 4).

Tabla 4. Descripción general de las bacteriocinas de dos péptidos caracterizadas genética y bioquímicamente (Oppegård et al., 2007).

Bacteriocina	Bacteria productora
Lactococcina G	<i>Lactococcus lactis</i> LMGT2081
Enterocina 1071	<i>Enterococcus faecalis</i> FAIR-E 309
Lactococcina Q	<i>Lactococcus lactis</i> QU 4
Plantaricina E/F	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
Plantaricina J/K	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
Plantaricina S	<i>Lactobacillus plantarum</i> LCP010
Plantaricina NC8	<i>Lactobacillus plantarum</i> NC8
Lactacina F	<i>Lactobacillus johnsonii</i> VPI11088
Brochocina C	<i>Brochothrix campestris</i> ATCC 43754
Termofilina 13	<i>Streptococcus thermophilus</i> Sfi13

ABP-118 Mutacina IV Lactococcina MN Lactocina 705 Leucocina H	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> UCC118 <i>Streptococcus mutans</i> UA140 <i>Lactococcus lactis</i> 9B4 <i>Lactobacillus casei</i> CRL 705 <i>Leuconostoc</i> MF215B
---	--

- **Bacteriocinas clase III:** Las constituyen las bacteriocinas grandes y termolábiles, de ellas hay poca información disponible. La colicina es uno de los ejemplos de bacteriocinas de clase III producidas por *E. coli*. Las bacteriocinas de clase III también incluyen helveticina M, helveticina J y enterolisina A, producidas por *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus* y *Enterococcus faecalis*, respectivamente. La helveticina M se ha caracterizado recientemente y se sabe que altera la pared celular de las bacterias Gram positivas y la membrana externa de las bacterias Gram negativas, por lo que es eficaz contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Las clases de bacteriocinas y sus atributos se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de bacteriocinas (Kumariya et al., 2019).

Clase	Características	Ejemplo	Mecanismo de acción	Receptores	Productores	
I	la	Lantibióticos (< 5 kDa péptidos que contienen lantionina y β metil lantionina).	Nisina	Permeabilización de membranas por formación de poros.	Lípido II	<i>L. lactis</i>
	lb	Lantibióticos carbacíclicos que contienen laberintina y labionina.	Laberinto peptina A1	No conocido	No conocido	<i>Actinomadura namibiensis</i>
	lc	Sactibióticos (antibióticos que contienen azufre en carbono alfa).	Turicina CD	No conocido	No conocido	<i>B. thuringiensis</i>
	Ila	Pequeños péptidos estables al calor, sintetizados en forma de precursores que se procesan después de	Pediciocina PA-1, sakacinas A y P,		Manosa permeasa	<i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> y

II		dos residuos de glicina, activos contra <i>Listeria</i> , tienen una secuencia de consenso de YGNGV-C en el N terminal.	zeucocina A.	Permeabilización de membranas por formación de poros.		<i>Lactobacillus sakei</i>
	IIb	Sistemas de dos componentes: se requieren dos péptidos diferentes para formar un complejo de poración activo.	Lactococinas G, plantaricina EF y plantaricina JK		UppP (fosfatasa de pirofosfato de undecaprenilo)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lb. plantarum</i>
	IIc	Bacteriocinas circulares.	Gassericina A, enterocina AS-48, garvicina ML		Transportador ABC	<i>L. gasseri</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. garvieae</i>
	IIId	Bacteriocinas no modificadas, lineales, sin líder, no pediocinas.	Bactofencina A, LsbB.		Metalopeptidasa	<i>L. salivarius</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>
III	Moléculas grandes sensibles al calor.	Helveticina M, helveticina J y enterolisina A	No conocido		<i>Lb. crispatus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>E. faecalis</i>	

3.4 Síntesis

Los genes para la producción de bacteriocinas activas generalmente se encuentran en grupos de operones, alojados en el genoma, plásmidos u otros elementos genéticos móviles. La expresión de estos operones es inducible y requiere la presencia de péptidos autoinductores regulados por quorum sensing, el cual es un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular.

La expresión está regulada a menudo por un sistema regulador de dos componentes y, en algunos casos, por un sistema regulador de tres componentes. Transportadores como los del tipo ABC y los exportadores sec-dependientes se utilizan para la secreción de bacteriocinas.

La acumulación extracelular de un factor de inducción es detectada por un sistema de transducción de señales de dos componentes que consta de una histidina quinasa, ubicada en la membrana que fosforila un regulador de respuesta, el cual a su vez interactúa con promotores de cambios estructurales, biosintéticos y operones reguladores e induce la expresión génica. Por ejemplo, la nisina lantibiótica autorregula su propia producción, es decir, sirve como un autoinductor para su expresión activando el sistema regulador de dos componentes. Sin embargo, algunas bacteriocinas son excepciones pues tienen su propia forma de regular su expresión, tal es el caso de LsbB, una bacteriocina de clase II sin péptido señal, que regula su expresión aumentando la estabilidad del ARN tres veces, dando como resultado el aumento de su expresión en 30 veces.

Las bacteriocinas se sintetizan como precursores, se transportan y se fragmentan para generar la forma madura. Dependiendo del tipo de bacteriocina, la modificación puede variar. La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de esta, guardando relación directa con la biomasa producida (Kumariya et al., 2019).

Un estudio reciente mostró que la producción de brevicina 174A y la auto-resistencia están controladas por dos proteínas reguladoras de la transcripción, donde sirven como autorregulador positivo (Noda et al., 2018).

Además, diversos estudios han demostrado que la concentración de ácido acético mejora la producción de bacteriocinas. En el caso de *Lactobacillus*, el ácido acético activa la síntesis de bacteriocinas ya que controla el quorum sensing (Kang et al., 2022).

3.5 Mecanismo de acción

La sensibilidad de los microorganismos a las bacteriocinas se debe a su interacción con la superficie y membrana celular bacterianas. La permeabilización celular y la formación de poros es un mecanismo importante por el cual las bacteriocinas atacan a las bacterias diana.

El modo de acción de las bacteriocinas puede ser bactericida o bacteriostático, determinado por la muerte o extensión de la fase logarítmica, respectivamente. En la actualidad, se distinguen al menos cuatro tipos de actividad antibacteriana de las bacteriocinas, que incluyen:

- actividad bactericida debido a la formación de poros en la membrana celular
- inhibición de la biosíntesis de componentes de la pared celular
- efecto sobre la actividad de enzimas autolíticas
- inhibición del desarrollo de esporas bacterianas

La propiedad aniónica de la membrana celular bacteriana que brinda la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilglicerol, los lipopolisacáridos, el ácido lipoteicoico y la cardiolipina, es el objetivo común explotado por las bacteriocinas catiónicas. Las bacteriocinas tienen configuraciones de modo que los grupos cargados positivamente interactúan electrostáticamente con la superficie de la célula bacteriana cargada negativamente, mientras que las superficies hidrófobas están alineadas hacia la membrana y atraviesan la bicapa lipídica. Después de perforar la bicapa lipídica, los péptidos se polimerizan para formar complejos (Kumariya, 2019).

Las bacteriocinas inducen la permeabilización de la membrana celular de la bacteria diana, mediante la formación de poros selectivos de iones que provocan la disipación de la fuerza protón motriz, el agotamiento del ATP intracelular, la fuga de los sustratos intracelulares, y eventualmente la muerte celular. En el caso de la enterocina, esta crea agujeros localizados en la pared celular y la membrana de *L. monocytogenes*, por lo tanto, provoca el colapso de la fuerza protón motriz.

Las bacteriocinas requieren que la molécula de acoplamiento, como el lípido II o la manosa permeasa del sistema de fosfotransferasa (Man-PTS), interactúe con las membranas como se observa en la figura 3. Sin embargo, es posible que algunas bacteriocinas no requieran receptores diana para el acoplamiento. La bacteriocina circular Garvicina ML derivada de DCC43 *Lactococcus garvieae*, utiliza el transportador ABC de maltosa y la permeasa como receptores. Mientras que las moléculas de acoplamiento mejoran la conductividad y la estabilidad de los poros de los lantibióticos, los receptores de la membrana diana pueden determinar la especificidad de las bacteriocinas de clase II.

Algunos estudios sugieren que el modo de acción de las bacteriocinas depende de la concentración. Las bacteriocinas de clase I, que son antibióticos con residuos de lantionina y metil-lantionina, forman anillos de tioéter intramoleculares. Las bacteriocinas de clase II son pequeñas y poseen un espectro estrecho de actividad bactericida. Los antibióticos forman poros en el modelo de "cuña" (wedge-like), mientras que las bacteriocinas de clase II aumentan la permeabilidad de la membrana mediante un poro de "duela de barril" (barrel stave) o un mecanismo de "alfombra" (figura 3) (Kumariya et al., 2019).

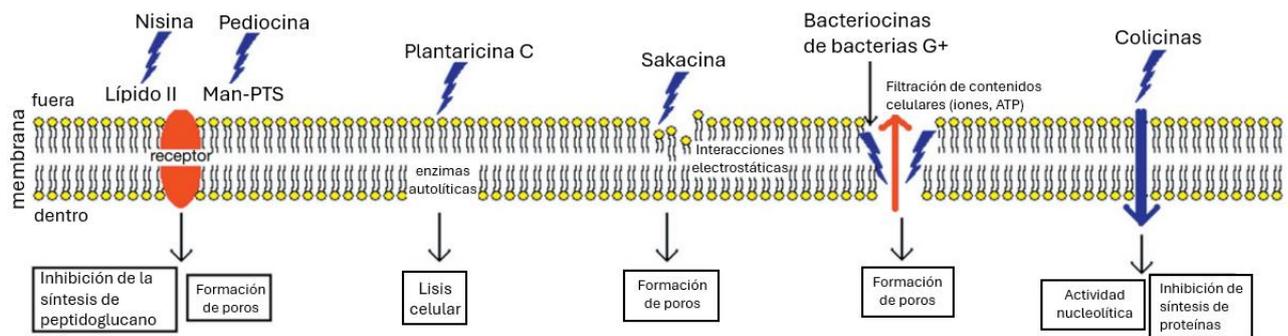


Figura 3. Descripción general del modo de acción de las bacteriocinas (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2016).

3.6 Mecanismos de resistencia

Todos los organismos tienen una tendencia inherente a adaptarse al entorno cambiante. Por lo tanto, las bacterias diana también desarrollan componentes para resistir estas bacteriocinas en una exposición persistente, lo que conduce a la resistencia a las bacteriocinas.

Los informes sobre el desarrollo de resistencia por parte de varias bacterias patógenas o que deterioran los alimentos, contra bacteriocinas como la nisina y la pediocina, han implicado que el aumento de la resistencia puede comprometer el papel potencial de estos péptidos antimicrobianos en la bioconservación. Si las bacteriocinas se vuelven ineficaces, será un gran problema para el sector alimentario. Por lo tanto, es necesario comprender el mecanismo de la función de la bacteriocina y su degradación para abordar el problema de la resistencia.

Dado que la carga de la superficie de la membrana bacteriana y la fluidez de la membrana son las dos propiedades bacterianas explotadas por las bacteriocinas durante el ataque, la manipulación de estas propiedades hace que las bacteriocinas sean ineficaces, lo que genera resistencia a las bacteriocinas. Sin embargo, muchos estudios han demostrado que la resistencia a las bacteriocinas puede superarse mediante el uso de la combinación de diferentes bacteriocinas y/o bacteriocinas con otros compuestos antimicrobianos. Además, la potencia de las bacteriocinas se puede incrementar mediante bioingeniería (Kumariya et al., 2019).

En la siguiente tabla se enlistan algunos ejemplos de bacterias que han desarrollado resistencia a diversos tipos de bacteriocinas.

Tabla 6. Resistencia contra diferentes bacteriocinas en varios microorganismos (Kumariya et al., 2019).

Bacteria	Resistencia contra bacteriocinas
<i>E. faecalis</i>	Pediocina, nisina, divercina V41, lacticina 3147
<i>S. aureus</i>	Nisina, lacticina 3147
<i>L. monocytogenes</i>	Nisina, leucocina A, pediocina, mesenterocina
<i>E. faecium</i>	Mundticina KS

La pared celular de las bacterias Gram positivas consiste en un peptidoglicano multicapa relativamente grueso. La lisostafina de *Staphylococcus simulans* biovariedad *staphylolyticus* puede cortar los puentes cruzados de pentaglicina del peptidoglicano de *S. aureus*.

Según Vadyvaloo (2004), las bacterias diana pueden evadir las bacteriocinas mediante la neutralización de la carga negativa neta de la pared celular. En la tabla 7 se presentan los cambios que se conocen hasta el momento en la célula bacteriana al adquirir resistencia frente a bacteriocinas.

Tabla 7. Mecanismos de resistencia desarrollados en bacterias contra diferentes péptidos antimicrobianos catiónicos (AMPs en inglés) (Vadyvaloo, 2004).

AMPs	Bacteria	Razones sugeridas de resistencia
Pediocina	<i>E. faecalis</i>	Cambios en la composición de ácidos grasos en la membrana, incremento del contenido de D-alanina en la pared de ácido teicoico; incremento en el contenido de L-lisina de la membrana de fosfolípidos.
Leucocina A	<i>L. monocytogenes</i>	Cambios en la composición de ácidos grasos en la membrana, incremento del contenido de D-alanina en la pared de ácido teicoico; incremento en el contenido de L-lisina de la membrana de fosfolípidos.
Nisina	<i>C. difficile, L. lactis, S. pneumoniae, E. faecalis.</i>	D- alanilación de ácidos teicoicos.
	<i>L. monocytogenes</i>	Cambios en la composición de la membrana lipídica.
	<i>S. bovis</i>	Mayor contenido de ácidos teicoicos
	<i>S. aureus</i>	Incremento en el número de copias del operón dlt
Mesenterocina 52A	<i>Leuconostoc y Weissella</i>	Cambios en la composición de ácidos grasos en la membrana.
Mundticina	<i>E. faecium</i>	Cambios en la composición de ácidos grasos en la membrana.

3.6.1 Cambios en los receptores de membrana que sirven como molécula de acoplamiento para las bacteriocinas

Se han propuesto y descrito diferentes mecanismos de acción para diversas bacteriocinas, como: la formación de poros, el retraso de la síntesis de la pared celular, de ácidos nucleicos o de proteína.

Las bacteriocinas, dependiendo de sus tipos, se adhieren al lípido II, sistema permeasa manosa fosfotransferasa, undecaprenil pirofosfato fosfatasa (UppP), transportador ABC de maltosa, permeasas o proteasas unidas a membranas dependientes de zinc. Por ejemplo, la expresión del gen del sistema de

fosfotransferasa específico de manosa (Man-PTS) fue baja en *L. monocytogenes* resistente a bacteriocina, lo cual indica que la densidad baja de los receptores afectó la unión de la bacteriocina. La garvicina ML requiere el complejo transportador ABC de maltosa como receptor, ya que su ausencia provoca resistencia en la familia *Enterococcaceae* (Gabrielsen, 2012).

3.6.2. D-alanilación de ácidos teicoicos de la pared celular

Los ácidos teicoicos son polímeros de glicerol o ribitol unidos mediante enlaces fosfodiéster. Estos ácidos se encuentran sólo en la pared celular de las bacterias Gram positivas, tales como *Staphylococci*, *Streptococci*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium* y *Listeria*, extendiéndose sobre la superficie de la capa de peptidoglicano. Los ácidos teicoicos están cargados negativamente, por lo que contribuyen a la carga negativa de la pared celular de bacterias Gram positivas. Esta carga negativa disminuye al haber cambios en la composición del ácido teicoico, lo cual genera a su vez, resistencia a las bacteriocinas.

Los ácidos teicoicos conforman la capa más externa de la pared celular y es por esto por lo que se les adjudica un rol protector ya que funciona como barrera para obstruir poros y cavidades entre las cadenas de peptidoglicano o al modificar las propiedades fisicoquímicas de la pared para impedir el pasaje de bacteriocinas, antibióticos, agentes surfactantes y fagos (Palomino, 2011).

El esqueleto de ribitol-fosfato del ácido teicoico se puede esterificar con D-alanina para formar un enlace éster de D-alanilo. Es decir, la D-alanilación, al alterar la conformación de los ácidos teicoicos resulta en un incremento de la densidad de la pared celular y reduce la penetración de péptidos antimicrobianos catiónicos a través de la pared celular (Sánchez, 2015).

Por ejemplo, la resistencia a la daptomicina en *S. aureus* ha sido parcialmente aportada por el ácido teicoico D-alanilado. El operón *dltABDC* es el responsable de la D-alanilación de los ácidos teicoicos, y se ha encontrado que la inactivación de este operón *dlt* en *S. aureus* confiere sensibilidad a las bacteriocinas. Además, la eliminación de *dltA* en *E. faecalis* y *S. pneumoniae* resultó en la ausencia de D-alanina

en los ácidos teicoicos, lo que hizo que la cepa fuera más sensible a las bacteriocinas (Kumariya et al., 2019).

3.6.3. L-lisinilación de fosfolípidos de la membrana celular

Como los ácidos teicoicos se convierten en un agente de virulencia por D-alanilación, algunas bacterias modifican los fosfolípidos aniónicos con L-lisina para producir lisilfosfatidilglicerol (L-FG), un fosfolípido básico que imparte una carga positiva neta a la membrana citoplasmática, que puede proteger de las bacteriocinas, incluso del lipopéptido daptomicina. La lisina esterifica a uno de los dos grupos hidroxilo del fosfatidilglicerol y los grupos amino libres imparten una carga positiva neta a L-FG. Se ha observado un aumento del contenido de lisina de los fosfolípidos de membrana en cepas altamente resistentes de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. faecalis*, entre otras. La proteína MprF, factor de resistencia a péptidos múltiples, cataliza la transferencia de residuos de lisina del lisil-ARNt a fosfatidilglicerol (FG), el cual tienen un papel importante en la resistencia a los péptidos bacterianos (Thedieck et al., 2006). De hecho, MprF puede modificar el fosfatidilglicerol bacteriano, el lípido cargado negativamente, con lisina o alanina, para cambiar la carga de la superficie de la membrana. Dichos lípidos de membrana que contienen aminoácidos son característicos de las condiciones de estrés y la adaptación a las condiciones ambientales cambiantes. Nuevos lípidos de hidroxilisina en bacterias del suelo como *Pseudomonas* spp. han sido detectados como una estrategia de supervivencia contra el estrés por pH y temperatura (Kumariya et al., 2019).

3.6.4. Cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana celular

La mayor proporción de ácidos grasos saturados y ácidos grasos de cadena ramificada en las variantes resistentes a las bacteriocinas se explica como una adaptación hacia una mayor rigidez de la membrana, menor fluidez, lo que impide la penetración de las bacteriocinas en la célula. Curiosamente, los patógenos adoptan la misma estrategia para escapar de los antibióticos como la ampicilina, el cloranfenicol, la eritromicina y la tetraciclina. Mientras que los péptidos antimicrobianos catiónicos (AMPs, en inglés) generados por *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas* se usan como antibióticos, los AMPs generados por BAL se usan como

conservadores de alimentos. Las polimixinas, la daptomicina y la surfactina, se encuentran entre los lipopéptidos cíclicos de origen bacteriano con usos antibióticos (Kumariya et al., 2019).

3.7 Purificación y caracterización de bacteriocinas

Las bacteriocinas son compuestos proteicos que son liberados al medio extracelular por lo que, generalmente el primer paso para su purificación consiste en la obtención y concentración del sobrenadante libre de células. Ciertas bacteriocinas se encuentran en su estado nativo en forma de complejos macromoleculares o agregados inespecíficos, de elevado tamaño molecular (30-300 kDa), que pueden enmascarar total o parcialmente su actividad antimicrobiana durante el proceso de purificación, así como inducir a errores en la determinación de su tamaño molecular. Por otro lado, la caracterización de las bacteriocinas va en función de que tan puras se encuentren, es decir, para definir la estructura química de una bacteriocina se requiere tanto de una purificación homogénea como de una adecuada recuperación de esta.

En primera instancia, la capacidad bacteriocinogénica de las BAL suele evaluarse mediante pruebas biológicas que detectan la actividad antimicrobiana que estos péptidos ejercen en los microorganismos indicadores, como son los métodos de difusión en agar y el de doble capa.

Para determinar la naturaleza proteica de los compuestos con actividad antimicrobiana, los sobrenadantes de los cultivos de las cepas presuntamente productoras de bacteriocinas suelen someterse a diversos tratamientos enzimáticos y térmicos, con el fin de establecer su estructura química y su termorresistencia. La naturaleza catiónica e hidrófoba de las bacteriocinas también es útil para la purificación, ya que esta característica sirve para su recuperación a partir de caldos de fermentación complejos que contienen altos niveles de péptidos, 10 ± 30 g/L comparado con una concentración de bacteriocinas de 10 ± 100 mg/L, (Parada et al., 2007).

Concretamente, las bacteriocinas de un tamaño molecular pequeño y altamente apolares, interaccionan fácilmente con el material extracelular de las células lisadas (fragmentos de la pared celular y micelas de los ácidos lipoteicoicos) o con otros componentes apolares del medio de cultivo (ej. lípidos y ácidos grasos del agente tensoactivo no iónico Tween 80). En estos casos, los complejos macromoleculares se pueden separar mediante el uso de agentes disociantes como la úrea o el tensoactivo aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), por ultrafiltración, o eliminando el material lipídico mediante extracciones con metanol-cloroformo o etanol-dietiléter (Parada et al., 2007). Luego de recuperadas las bacteriocinas del sobrenadante, éstas se pueden concentrar mediante técnicas que permitan la separación de las diversas fracciones en función de su tamaño o naturaleza química, siendo las más empleadas las siguientes:

- I. la separación mediante diálisis o ultrafiltración.
- II. la precipitación de las proteínas empleando sales, como el sulfato de amonio, o ácidos, como el ácido clorhídrico.
- III. la extracción de las proteínas con solventes orgánicos, como el etanol, isopropanol, n-butanol, cloroformo, entre otros.

Los protocolos de purificación en el laboratorio generalmente incluyen un paso de precipitación con sulfato de amonio, seguido de varias combinaciones de cromatografía de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica, con un paso final de purificación por HPLC de fase inversa (RP-HPLC) (Parente y Ricciardi, 1999).

Asimismo, la concentración puede realizarse mediante liofilización, con el inconveniente de que esta técnica no elimina los componentes del medio de cultivo ni aquellos que pueden interferir posteriormente en la purificación. El proceso de concentración, aunque es necesario para reducir el volumen inicial de trabajo y recuperar las bacteriocinas del medio, no es selectivo, por lo que para obtener bacteriocinas con un alto grado de pureza, las muestras deben someterse a otras técnicas que permitan separar las bacteriocinas de las restantes fracciones proteicas, basándose en sus propiedades y características fisicoquímicas.

Hasta la fecha, el protocolo de purificación que mayor difusión ha alcanzado en el campo de las bacteriocinas de BAL se basa en las propiedades generales de muchos de estos agentes antimicrobianos, péptidos de pequeño tamaño molecular, catiónicos a pH 7.0 e hidrófobos, y consta de 4 etapas básicas:

Etapas 1. Precipitación de las proteínas con sulfato de amonio.

Etapas 2. Cromatografía de intercambio catiónico.

Etapas 3. Cromatografía de interacción hidrofóbica.

Etapas 4. Cromatografía de fase reversa en un sistema HPLC o FPLC.

Este protocolo ha sido aplicado con éxito para la purificación, de lactococcina G, pediocina PA-1, sakacina P, curvacina A, bavaricina A, enterocinas L50A y L50B, los lantibióticos nisina A y carnocina UI49, entre otras. Algunos autores han incorporado una etapa de cromatografía de filtración en geles previa a la de intercambio catiónico, y han purificado exitosamente diversas bacteriocinas como el lantibiótico lactocina S y sistemas de dos péptidos, como la lactacina F y la plantaricina S (Parada et al., 2007).

En 1991, se propuso un protocolo similar para purificar la leucocina A-UAL 187 producida por *Leuconostoc gelidum*, que incluye los siguientes pasos:

Pasos 1. Precipitación de las proteínas con HCl pH 2.5

Pasos 2. Cromatografía de interacción hidrofóbica

Pasos 3. Cromatografía de filtración en gel

Pasos 4. Cromatografía de fase reversa en un sistema de HPLC.

Alternativamente, se han desarrollado métodos basados en la capacidad de ciertas bacteriocinas para adsorberse a las membranas externas de las células productoras. En general, esta metodología implica el ajuste del pH de los cultivos a 6.0, para que se produzca la máxima adsorción de moléculas de bacteriocina; a continuación, se recogen las células por centrifugación y se reajusta el pH de la suspensión celular resultante a 2.0 aproximadamente, valor en que se suele conseguir la máxima liberación de moléculas de bacteriocina. Una vez obtenida la suspensión con las

bacteriocinas, ésta se dializa, se concentra por liofilización y se aplica a una columna de fase reversa acoplada a un sistema HPLC. Con esta metodología, sus autores purificaron la pediocina PA-1, la leucocina Lcm 1, la nisina y la sakacina A, obteniendo una recuperación al final del proceso de 106%, 96.2%, 93.3% y 44.3%, respectivamente (Parente y Ricciardi, 1999).

Los compuestos de sílice porosos también se pueden usar para adsorber bacteriocinas, como: nisina, pediocina PO2, brevicina 286 y piscicolina 126), de los caldos de fermentación. Los mejores resultados se obtuvieron con Micro-Cel E, el cual es un silicato de calcio sintético. Las bacteriocinas adsorbidas seguían activas en los organismos objetivo y podían dejar de adsorberse con dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.1%, obteniendo de 110 a 130 veces de purificación. Desafortunadamente, la remoción de SDS por precipitación fría, es solo parcial, del 60 al 70% (Parente y Ricciardi, 1999).

Por otro lado, en 1998 se desarrolló un sistema de purificación simple de dos pasos, basado en el uso del detergente Tritón 114, con la partición de fases y adsorción/desorción en una resina de intercambio catiónico. Tras la adición de 2% de Tritón 114 a los sobrenadantes, la divercina V41 se acumuló en la fase del detergente y se recuperó con una pureza >95 %, después de la absorción en una resina de intercambio catiónico, lavado y elución con NaCl 0.7 mol/L. Se confirmó que el método era eficaz en la recuperación de mesenterocina Y105 y nisina (Parente, *et al*, 1999).

En un estudio realizado en la Universidad Libre de Barranquilla, Colombia, se buscó aislar, identificar y evaluar la actividad antimicrobiana de bacteriocinas producidas por microorganismos nativos del ecosistema de Manglar de la Ciénaga de Mallorquín. En dicho estudio se aislaron cepas nativas del ecosistema de Manglar, a las cuales, se aplicó el método de purificación y extracción de proteínas con sulfato de amonio para obtención de bacteriocinas, se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Lowry y la evaluación de la actividad antimicrobiana por método de difusión en placa de Kirby y Bauer que se describe a continuación (Carbonó y Cuan, 2017).

Prueba de susceptibilidad de Kirby-Bauer o técnica de difusión en agar

Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra clínica, siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. Para esto se utiliza la técnica de aislamiento en placas que contengan un medio adecuado para la cepa en estudio, al cual además se le deben otorgar las condiciones atmosféricas específicas de esa cepa.

En este método se coloca de manera uniforme un inóculo estándar del microorganismo en una caja de Petri que contenga agar Mueller-Hinton. Se puede realizar en tubo de ensayo, en placas de Petri o en platos cuadrados y sobre la superficie de agar previamente inoculada con el microorganismo por estudiar, se colocan discos de papel filtro impregnados con el antibiótico. El antibiótico difunde del disco hacia el agar, produciéndose zonas de inhibición de desarrollo alrededor de aquellos discos que contienen antibióticos a los cuales los organismos estudiados son susceptibles (Carbonó y Cuan, 2017).

Otros métodos utilizados para determinar la sensibilidad antimicrobiana son dilución en agar, macrodilución en caldo, microdilución en caldo, Epsilon test (E test) y métodos automatizados como el Sistema Automatizado Vitek de BioMerieux (Herrera, 1999).

CAPÍTULO 4. Bioconservación de alimentos, ejemplos. Normatividad.

La bioconservación es un medio natural de conservación que implica el uso de microorganismos o de sus metabolitos. Entre otros microorganismos, las BAL tienen un gran potencial para su uso en la bioconservación, ya que producen una serie de compuestos antimicrobianos activos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, entre otros (Kumariya et al., 2019).

A pesar de que se ha demostrado que muchas bacteriocinas producidas por BAL son muy eficaces contra los microorganismos patógenos y de deterioro tanto *in vitro* como *in vivo*, actualmente la nisina es la bacteriocina más utilizada y autorizada por la FDA para uso alimentario en una forma parcialmente purificada.

Aunque algunas bacteriocinas de clase II pueden ser más efectivas que la nisina contra algunos patógenos transmitidos por los alimentos, como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, todavía se necesitan pruebas definitivas sobre su eficacia y estabilidad en los alimentos. Por lo que, en algunos casos, puede ser más sencillo y económico utilizar en el procesamiento de alimentos un ingrediente que haya sido previamente fermentado con cepas bacterianas productoras de bacteriocina o que la bacteriocina se produzca en el mismo alimento añadiendo cultivos de *Lactiplantibacillus plantarum* WHE92 y *Lb. sakei* BJ-33 al momento de su elaboración, los cuales se usan en la producción de queso y productos cárnicos, respectivamente. Pero en varios productos alimenticios, el crecimiento de BAL puede ser indeseable, por lo que la adición directa de las bacteriocinas en el producto alimentario es una alternativa más viable.

Por otro lado, los bajos rendimientos y altos costos pueden limitar la producción comercial de bacteriocinas distintas a la nisina. La explotación adecuada, tanto de la biomasa celular, como de la bacteriocina puede resultar en un aumento de la rentabilidad del proceso (Kumar et al., 2022).

4.1 Aplicaciones en la industria

En los últimos años, se ha mostrado un gran interés con respecto al potencial para extender la durabilidad de los alimentos utilizando compuestos producidos por

microorganismos, incluidas las bacteriocinas. Estos compuestos poseen propiedades atractivas para poder utilizarlos como conservadores de alimentos ya que son insípidos, no manifiestan olor ni color y penetran fácilmente en la estructura de los productos alimenticios.

Sin embargo, antes de utilizar una nueva bacteriocina para que desempeñe un papel como bioconservador a escala industrial, deben realizarse investigaciones detalladas sobre ella y deben aceptarse legalmente como complementos alimenticios.

Las tres aplicaciones típicas de las bacteriocinas para la bioconservación de alimentos incluyen:

1. La adición de bacteriocinas purificadas a los productos alimenticios.
2. La inoculación de un producto alimenticio con BAL, que producirá bacteriocinas en el mismo producto.
3. El uso de un ingrediente en el procesamiento de alimentos que ha sido previamente fermentado con cepas bacterianas productoras de bacteriocina.

Sin embargo, se están ideando más opciones para añadir bacteriocinas indirectamente en los alimentos y que desempeñen un papel bioconservador en los alimentos, por ejemplo, las microcinas y colicinas producidas por varias cepas de *E. coli* juegan un papel importante en la prevención de infecciones por *Salmonella* en pollos. Además, las células de *E. coli* son capaces de sobrevivir y producir microcinas en condiciones de déficit de alimento, ambiente ácido y en presencia de enzimas proteolíticas. Por lo que, las colicinas y las microcinas se pueden usar para combatir infecciones producidas por la cepa enterohemorrágica de *E. coli* O157:H7, cuyo reservorio incluye al ganado. Esta cepa produce la toxina shiga, quién es particularmente peligrosa para los niños. En los casos de esta cepa, la antibioticoterapia induce una secreción aún más intensa de toxina shiga, aumentando así la virulencia bacteriana. Las microcinas y colicinas manifiestan su actividad frente a cepas productoras de toxina shiga y frente a otras cepas de *E. coli* de serotipo O, ligadas a enfermedades humanas. Por lo tanto, la adición de cultivos bacterianos productores de colicina y microcina al alimento del ganado puede reducir significativamente los niveles de patógenos en el tracto alimentario del ganado y de esta manera prevenir infecciones con cepas patógenas en humanos (Karpiński y Szkaradkiewicz, 2016).

Otro patógeno importante que puede contaminar los alimentos es *Listeria monocytogenes*. La actividad contra *L. monocytogenes* se ha observado por la cepa *L. lactis* DPC4275, que produce lactacina 3147, utilizada en la producción de un queso madurado. La nisina en combinación con otras sustancias antibacterianas, por ejemplo, con pediocina, o en combinación con tecnologías de procesamiento apropiadas, también inhibe eficazmente el desarrollo de *L. monocytogenes* (Karpiński y Szkaradkiewicz, 2016).

La aplicación de cultivos iniciadores productores de bacteriocinas en masa madre para aumentar la competitividad, en embutidos fermentados con efecto antilisterial y en quesos también con acción antilisterial y efectos anticlostridiales, se han estudiado en fermentaciones *in vitro* de laboratorio, así como en plantas piloto.

Por otro lado, se ha probado agregar bacteriocinas en las películas que recubren por dentro a los envases primarios para que los alimentos puedan protegerse contra el deterioro. Es decir, en un envase normal, el material del envase primario y el producto alimenticio están en contacto directo, lo que a veces permite el crecimiento microbiano, pero la película impregnada con compuestos antimicrobianos tiene como objetivo evitar dicha contaminación, para ello es indispensable que la película que recubre al envase primario esté en contacto directo con la superficie del alimento para que las bacteriocinas penetren en él. Se ha demostrado que esta penetración lenta de las bacteriocinas desde la película de envasado es más ventajosa que sumergir y rociar los alimentos con bacteriocinas. En caso de inmersión o pulverización, la actividad antimicrobiana se reduce (Kirtonia et al., 2021).

Un ejemplo similar es el desarrollo de una película comestible adicionada con nisina y natamicina con efecto antimicrobiano en queso panela en la Universidad de Guanajuato, México. Esta película fue elaborada a partir de biopolímeros que contienen carbohidratos, proteínas y lípidos. En este estudio se obtuvo como resultado que la película más efectiva fue la que solo contenía natamicina, ya que la nisina no presenta efecto antifúngico ni tampoco se observó un efecto sinérgico entre ambos antimicrobianos en las condiciones analizadas (Alvarado et al., 2022).

4.1.1. Nisina

El descubrimiento de la nisina, la primera bacteriocina utilizada a escala comercial como conservador de alimentos, se remonta a la primera mitad del siglo XX (Parente y Ricciardi, 1999). Actualmente esta bacteriocina es la más conocida y comercialmente utilizada.

Es producida por *Lactococcus lactis* y pertenece al grupo de los lantibióticos A, tiene una forma alargada y afecta a las células sensibles mediante alguno de sus dos modos de acción antimicrobiana; ya sea uniéndose al lípido II y subsecuentemente inhibiendo la síntesis de la pared celular o formando poros en la membrana citoplasmática; este daño a la membrana da como resultado la pérdida de contenido intracelular y el agotamiento de la fuerza protón motriz (Davidson y Zivanovic, 2003). Además, tras la exposición a la nisina, las células sensibles manifiestan alteraciones en la síntesis de ADN, ARN, proteínas y polisacáridos.

Su actividad antimicrobiana es sólo contra bacterias Gram positivas como *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *L. monocytogenes*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus* y *Mycobacterium*, así como esporas y formas vegetativas de *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium sporogenes*. Pero al no inhibir bacterias Gram negativas, levaduras ni mohos, a menudo se usa en combinación con otros métodos de conservación sinérgicos, conocidos como tecnología de obstáculos, como un pH bajo y concentraciones altas de sal. No obstante, la actividad de la nisina se puede alterar bajo el efecto de condiciones fisiológicas, como el pH, la fuerza iónica, la temperatura y la fase de crecimiento de las células diana. De este modo, la nisina al ser ingerida es inactivada por la tripsina y la pancreatina del sistema digestivo, por lo que no tendría ningún efecto sobre la microbiota intestinal (Karpiński y Szkaradkiewicz, 2016).

En tecnología de alimentos, la solución de nisina y las nanopartículas de pectina, así como, lípidos sólidos cargados con nisina se utilizan ampliamente como bioconservadores, debido a su actividad antimicrobiana contra diversos patógenos transmitidos por los alimentos, los cuales han mostrado ser estables, no tóxicos, seguros y altamente eficientes (Krivorotova et al., 2016).

A nivel industrial, la nisina ha sido utilizada para desempeñar las siguientes funciones de inhibición:

1. Inhibición de bacterias resistentes al calor como *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *C. botulinum*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*, presentes en productos lácteos, helados, queso procesado pasteurizado, huevos, carne, salchichas envasadas al vacío, hamburguesas de res, mariscos, bebidas, alimentos enlatados y aderezos para ensaladas.
2. Aumentar la vida útil de la carne de pollo, jugo de tomate, leche y jugo de naranja.
3. La reducción de pérdida de peso y también el aumento de la vida útil de queso Ricotta, utilizando recubrimientos comestibles de galactomananos de fuentes no convencionales que incorporan nisina para combatir a *L. monocytogenes*.
4. Control del desarrollo de listeria con películas de caseinato de sodio con nisina incorporada en queso rojo mini Babybel.
5. Inhibición de *L. monocytogenes* en salmón ahumado en frío en una atmósfera de 1000 ppm de nisina y dióxido de carbono.
6. Combinaciones de nisina con ácidos orgánicos o sales para controlar *L. monocytogenes* en mortadela de cerdo rebanada almacenada a 4 °C en envases al vacío.
7. Inhibición de *E. coli* y *L. monocytogenes* en carne fresca de res envasada al vacío, tratada con nisina o nisina combinada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
8. Actividad antimicrobiana de la nisina, la reuterina y el sistema lactoperoxidasa sobre *L. monocytogenes* y *S. aureus* en cuajada, un producto lácteo semisólido fabricado en España.
9. Inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* por la nisina en jamón de pavo listo para comer almacenado a 4 °C durante 63 días.
10. Efecto antibacteriano de la nisina y las nanopartículas de quitosano/alginato cargadas con nisina como bioconservador híbrido sobre el crecimiento de *S. aureus* en muestras de leche cruda y pasteurizada.
11. La actividad antimicrobiana de la nisina frente a *S. aureus* y la influencia en las propiedades fisicoquímicas del queso Tradicional Minas Serro.

12. Efecto combinado de alta presión y nisina o lisozima en la inactivación de esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugo de manzana.
13. La nisina A extendió la vida útil del postre lácteo refrigerado alto en grasa, un pudín a base de leche.
14. Uso de micropartículas de pectina con alto contenido de alginato, nisina y nanocompuestos de polipropileno/montmorillonita que sirven como compuestos antimicrobianos naturales en la tecnología alimentaria.
15. Sinergismo antilistérico del aceite esencial de hoja de *Metasequoia glyptostroboides* con nisina en leches enteras y descremadas.
16. En México se añadió la nisina microencapsulada a partir de *Lactococcus lactis* UQ2 (Patiño, 2014) en queso tipo panela y también se desarrolló una película comestible de nisina y natamicina con efecto antimicrobiano para este mismo producto (Alvarado et al., 2022).

4.1.2. Pediocina

Las pediocinas son bacteriocinas producidas por *Pediococcus acidilactici*. No son tóxicas, no son inmunogénicas, son resistentes a la irradiación y son activas principalmente contra las formas vegetativas de *L. monocytogenes* y no sobre las bacterias esporuladas, de hecho son conocidas como las bacteriocinas. En tecnología de alimentos, se utilizan contra patógenos transmitidos por alimentos y para aumentar la vida útil de productos lácteos, cremas, requesón, carne fresca, salchichas semisecas, salchichas de res, salchichas de Frankfurt, aderezos para ensaladas y vinos (Mogoşanu et al., 2017).

P. acidilactici y *P. pentosaceus* se han utilizado en fermentaciones naturales y controladas para conservar verduras, embutidos, masas y jugos de fruta. Sin embargo, dado que los pediococcus normalmente no pueden fermentar la lactosa, sus aplicaciones para conservar la leche están restringidas.

Por otro lado, *P. halophilus*, también conocido como *Tetragenococcus halophila*, juega un importante papel en la conservación del miso y la salsa de soya, de hecho, se le llama el pediococo de la soya. Estas bacterias son homofermentativas y tolerantes a la sal, metabolizan el citrato y el malato durante la fermentación del ácido láctico de la elaboración de salsa de soya (Papagianni y Anastasiadou, 2009).

4.1.3. Reuterina

Producida por *Lactobacillus reuteri*, la reuterina es un compuesto antimicrobiano que tiene formas hidratadas, no hidratadas y diméricas como el 3-hidroxi propionaldehído (3-HPA). En la naturaleza, el 3-HPA se produce a partir de glicerol en una reacción dependiente de la coenzima B12 la cual es catalizada por la enzima glicerol deshidratasa (Stevens et al., 2011).

La reuterina es resistente a las enzimas proteolíticas y lipolíticas, es activa frente a algunos patógenos transmitidos por los alimentos como *Clostridium* spp., *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. Se utiliza como bioconservador de alimentos, principalmente en carnes, en salmón ahumado en condiciones de refrigeración contra *L. monocytogenes*, para el control de células vegetativas y esporas de varias cepas del género *Clostridium*, como: *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum* y en productos lácteos (Mogoşanu et al., 2017).

4.1.4. Otros péptidos antimicrobianos derivados de bacterias

Las sakacinas y la lactocina S son péptidos antimicrobianos derivados de bacterias producidas por diferentes cepas de *Lactobacillus sakei*.

Las sakacinas A, G, P incluyen bacteriocinas de clase IIa biosintetizadas por *Lactobacillus sakei* (cepas DSMZ 6333, 2512 y CCUG 42687, respectivamente), con importantes aplicaciones como conservadores naturales, debido a la inhibición de microorganismos patógenos presentes en la carne como *L. monocytogenes*. En 2013, se identificaron y caracterizaron tres nuevas sakacinas (D98a, D98b y D98c), producidas por *L. sakei* D98 en aislado de Shubo (malta de arroz). La sakacina A purificada exhibió efectos líticos contra las paredes celulares aisladas de *L. monocytogenes*. Las sakacinas se utilizan ampliamente para la bioconservación y la inhibición del crecimiento del patógeno alimentario *L. monocytogenes* en la industria cárnica.

Por otro lado, la lactocina S, un antibiótico producido por *L. sakei* cepa L45, aislada de salchichas fermentadas de forma natural, inhibió las BAL y algunos microorganismos patógenos Gram positivos transmitidos por los alimentos, como; *C. botulinum*, *C. sporogenes*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

Además, la lactocina 3147, una bacteriocina de amplio espectro producida por una cepa de *Lactococcus lactis* inicialmente aislada de un grano de kéfir irlandés y las enterocinas L50 y AS48, mostraron aplicaciones potenciales en tecnología de alimentos contra algunos patógenos transmitidos por los alimentos, como *L. monocytogenes* y *S. aureus*, y contra bacterias que deterioran los alimentos como *C. tyrobutyricum*, en productos lácteos, carne, embutidos y mariscos (Mogoşanu et al. 2017).

Por otro lado, además de la industria de alimentos las bacteriocinas también son utilizadas en el campo de la medicina. En la tabla 8, se muestran algunos ejemplos:

Tabla 8. Aplicaciones médicas de algunas bacteriocinas (Karpiński y Szkaradkiewicz, 2016).

Enfermedad / Infección	Bacteriocina	Cepa productora
Mastitis bovina	Nisina A Uberolisina	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Streptococcus uberis</i> 42
Mastitis humana	Nisina A	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Enfermedades cutáneas	Nisina F Gallidermina Epidermicina N101 Enterocina 96 Hiracina JM79 Plantaricina MG	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Staphylococcus gallinarum</i> Tu3928 <i>Staphylococcus epidermidis</i> 224 <i>Enterococcus faecalis</i> WHE96 <i>Enterococcus hirae</i> DCH5 <i>Lactobacillus plantarum</i> KLDS1.0391
Caries bucales	Mutacina 1140	<i>Streptococcus mutans</i>
Enfermedades periodontales	Subtilosina A	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Enfermedades gastrointestinales	Avicina A Piscicolina 126 y Carnobacteriocina BM1 Pediocina PA-1	<i>Enterococcus avium</i> <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL307 <i>Pediococcus acidilactici</i> UL5

4.2 Costos de bacteriocinas comerciales

Ya hemos mencionado los usos que se le dan a las bacteriocinas más utilizadas en la industria de alimentos y a algunas de ellas también en el campo médico. Por lo que

en la tabla 9 se enlistan los precios de las bacteriocinas con mayor disponibilidad en el mercado, sin embargo, se debe considerar que los precios son aproximados, es decir, pueden variar de un proveedor a otro y que los precios presentados son al menudeo, no a nivel industrial. Cabe señalar, que no son tan fáciles de adquirir vía internet.

Tabla 9. Costos aproximados de bacteriocinas más comerciales.

Bacteriocina	Cantidad	Costo (MXN)	Referencia
Nisina en polvo	500 g 1 Kg (pedido mínimo de 100 Kg)	\$ 1,999 \$ 1763.53	Mercado libre, México, 2024 Made-in-China, China, 2024
Pediocina PA-1, proteína recombinante	1 mg	\$ 27,602.31	My Bio Source, California, 2024
Reuterina, vendido como probiótico	30 cápsulas	\$ 178.00	Farmacia Clicks, Sudáfrica, 2024
Colicina-E1 (cea), proteína recombinante	1 mg	\$ 32,272.18	My Bio Source, California, 2024

4.3 Normatividad

Según la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) debe autorizar un aditivo alimentario antes de que pueda utilizarse en alimentos en el mercado.

Las bacteriocinas purificadas que se agregan a los alimentos como conservadores están reguladas por la FDA como aditivos alimentarios o como sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS).

Los microorganismos agregados a los alimentos, como la levadura en la elaboración del pan, el vino y la cerveza, y las bacterias utilizadas para la producción de productos lácteos, cárnicos y vegetales fermentados, han sido consumidos de manera segura por los seres humanos desde hace cientos de años. Estos microorganismos son generalmente reconocidos como seguros por la FDA, pero no son autorizados para aplicaciones específicas, sin embargo, no se evalúan como sustancias GRAS. La

agencia los considera un componente integral de los alimentos fermentados y, aunque se usan de manera segura para un propósito, se debe documentar la seguridad si se van a usar para un propósito diferente. Las solicitudes de aprobación de cepas productoras de bacteriocinas modificadas genéticamente se manejan caso por caso aplicando las reglamentaciones que ya están en uso (Harlander, 1993).

A continuación, se analiza el aspecto regulatorio de las bacteriocinas y algunos de los criterios que la FDA podría considerar importantes para documentar la seguridad y otorgar la aprobación para el uso de cultivos iniciadores modificados genéticamente o bacteriocinas derivadas de la fermentación como conservadores naturales en los alimentos.

Las bacteriocinas purificadas que se agregan a los alimentos como conservadores deben estar reguladas por la FDA como aditivos alimentarios o compuestos GRAS. Si la bacteriocina es una sustancia para la que no se pudo establecer un historial de uso antes del año 1958, el fabricante deberá presentar una petición de aditivo alimentario que contenga información detallada sobre las propiedades físicas y químicas de la bacteriocina, evidencias de que la sustancia es segura para las formas en que se utilizará, incluidos los alimentos en los que se utilizará, los niveles de uso previstos y su seguridad (CFR, 2022). Sucesivamente, la FDA publicará un aviso de las peticiones bajo revisión en el Registro Federal público. Luego, se evalúa la petición y otros datos e información disponibles para determinar si el aditivo alimentario es seguro en las condiciones de uso propuestas. La inocuidad de los aditivos alimentarios debe estar respaldada por fundamentos científicos que demuestren que su uso cumple con el estándar de seguridad de la FDA y tener una certeza razonable de que no causan daño (FDA, 2023).

Si tras la evaluación, la FDA está de acuerdo en que el uso propuesto es seguro, la agencia emitirá una regulación sobre aditivos alimentarios que describa el aditivo y las condiciones en las que se puede utilizar, además, de que se autoriza que el aditivo alimentario cumple con el estándar de seguridad para uso alimentario. Las regulaciones sobre aditivos alimentarios se encuentran en el Código de Regulaciones Federales (CFR) de Estados Unidos. Estas regulaciones pueden especificar los tipos de alimentos en los que se puede usar el aditivo alimentario, las cantidades máximas

que se pueden usar en esos alimentos y cómo se debe identificar en las etiquetas de los productos alimentarios. Los fabricantes también deben limitar la cantidad de aditivos alimentarios para lograr el efecto deseado (FDA, 2023).

Si se puede documentar que la bacteriocina estaba presente en el suministro de alimentos antes de 1958 y se ha consumido de manera segura, hay dos opciones disponibles; el fabricante podría autoafirmar que la bacteriocina es GRAS y usar, o podría presentar una petición GRAS y solicitar que la FDA confirme el ingrediente como GRAS.

La FDA administra y mantiene un inventario público donde se enumeran todas las peticiones de aditivos alimentarios bajo revisión activa de la FDA o que se presentan, pero no están activas porque se identificaron deficiencias durante la revisión (FDA, 2023).

Obtener la aprobación de un nuevo aditivo alimentario puede ser costoso y llevar mucho tiempo, ya que la carga de la prueba de seguridad recae en el peticionario. Si se puede presentar un caso razonable de que la sustancia es un ingrediente GRAS, la documentación de seguridad se basa en el historial de uso seguro.

Según Harlander (1993), la FDA requiere los siguientes datos acerca de la bacteriocina para archivarla:

1. Identidad y uso propuesto.

Se requiere nombre o sinónimos de la bacteriocina, estructura y fórmula química, peso molecular, pureza y límites de impurezas en la preparación de la bacteriocina que se agregará a los alimentos y subproductos potenciales o productos de degradación, así como sensibilidad de la bacteriocina al pH, temperatura y digestión proteolítica.

2. Descripción del proceso de manufactura.

La seguridad de las bacteriocinas producidas a través de la fermentación dependerá de todos los pasos del proceso, incluido (a) el organismo de origen, sus características y cómo se ha desarrollado para realizar la función prevista; (b) el proceso de fermentación, incluidos los sustratos y otros materiales de crecimiento y las condiciones de crecimiento; (c) los procedimientos de

aislamiento y todas las etapas del proceso de purificación, cuando corresponda; y (d) la estandarización final del producto. Cabe resaltar que las buenas prácticas de manufactura deben ser fundamentales en cualquier proceso productivo. Además, se deben identificar las impurezas y establecer las especificaciones para cada producto.

3. Métodos analíticos.

El fabricante debe proporcionar descripciones detalladas de los procedimientos analíticos utilizados para determinar la presencia, potencia y estabilidad de la bacteriocina y sus productos de degradación presentes en los alimentos. Los métodos analíticos deben ser específicos, precisos, exactos y confiables, y deben poder ser realizados en laboratorios estándar por personal capacitado en procedimientos de laboratorio de rutina. Deben proporcionarse todos los datos acumulados respecto de bacteriocinas purificadas, así como los datos de sistemas alimentarios reales.

4. Eficacia.

Debe proporcionarse evidencia de que la bacteriocina funciona como un agente antimicrobiano contra patógenos específicos transmitidos por los alimentos u organismos de deterioro en los niveles esperados de adición. La bacteriocina debe probarse en varios niveles de adición en aquellos productos alimenticios para los que se solicitará la aprobación.

5. Ingesta estimada.

Debe determinarse la ingesta diaria estimada de bacteriocinas en los productos alimenticios a complementar. Si la bacteriocina se utiliza en varios productos alimenticios diferentes, se debe proporcionar una estimación de la cantidad que el consumidor típico podría ingerir de todas las fuentes. Los peticionarios deben saber si un segmento particular de la población consume niveles relativamente altos de un producto específico al que se agregarán bacteriocinas.

6. Evaluaciones de seguridad y pruebas de toxicidad.

Aunque las bacteriocinas se han consumido de manera segura en los alimentos durante décadas, la FDA podría tener cierta preocupación sobre las propiedades toxicológicas y alergénicas que podrían estar asociadas con niveles elevados de bacteriocinas en los productos alimenticios. La cantidad de bacteriocina que debe agregarse a los alimentos para lograr su conservación debe compararse con la cantidad producida naturalmente en los alimentos por los organismos productores de bacteriocina. Si el nivel que se agrega es significativamente más alto que el que se produce naturalmente, puede ser necesaria una evaluación de seguridad adicional.

Cabe resaltar que la nisina es la única bacteriocina registrada en el Código de Regulaciones Federales Título 21 de la FDA dentro del listado de compuestos GRAS, el cual es de libre consulta a través del sitio web:

<https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-184>

En este apartado se especifica que la preparación de nisina se deriva de fermentaciones de cultivos puros de ciertas cepas de *Lactococcus lactis* Grupo N Lancefield. Lancefield es un sistema de clasificación que agrupa los cocos Gram positivos catalasa (-) según la composición de los hidratos de carbono de los antígenos bacterianos que se encuentran en sus paredes celulares y en la expresión de beta-hemólisis en placas de agar sangre (Facklam, 2002).

Este apartado además menciona que la nisina se usa como un agente antimicrobiano, pues inhibe el crecimiento de esporas de *Clostridium botulinum* y la formación de toxinas en quesos para untar pasteurizados. Sin embargo, la FDA dicta que el agente antimicrobiano debe usarse en niveles que no excedan las buenas prácticas de manufactura, es decir, no se debe exceder las 250 partes por millón de nisina en un producto alimenticio terminado (CFR, 2022).

La nisina está aprobada para su uso en más de 40 países y se ha utilizado como conservador de alimentos por más de 50 años. Durante muchos años, la forma de nisina más disponible comercialmente es el producto Nisaplin™, de la compañía productora de alimentos Danisco y DuPont, que contiene 2.5 % de ingrediente activo de nisina, 77.5 % de NaCl y leche descremada en polvo que comprende 12 % de proteína y 6 % de carbohidratos. Actualmente, la nisina está permitida en alimentos

como pudines de sémola y tapioca en una cantidad de 3 mg/kg, 12.5 mg/kg en quesos procesados y 10 mg/kg en queso mascarpone.

Estudios demuestran que la nisina es segura para el consumo humano con una ingesta diaria admisible (IDA) de 2.9 mg/persona/día. El Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (JECFA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomiendan límites de ingesta diaria de 60 mg de nisina pura para una persona de 70 kg (Karpiński y Szkaradkiewicz, 2016).

Como conservador de alimentos, la nisina tiene el código 184.1538 asignado por la FDA, mientras que, en la Unión Europea, por la Directiva 95/2/EC sobre aditivos alimentarios distintos de colorantes y edulcorantes, le asignó el código E-234 y en México, COFEPRIS la identifica como 7-I-70.

Por otro lado, la pediocina es otro AMP producido por *Pediococcus* spp. Una preparación comercial de pediocina PA-1 de *Pediococcus acidilactici* conocida como Alta [™] 2341 tiene el potencial de extender la vida útil de una variedad de productos listos para consumir, particularmente al inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* (Kumariya et al., 2019). Un estudio realizado en la Universidad de Iowa, Estados Unidos, demostró que la población de *L. monocytogenes* se redujo mediante la adición de pediocina en salchichas tipo Frankfurt, en dicho experimento, las muestras almacenadas a 4°C con pediocina evitaron eficazmente el crecimiento de *L. monocytogenes* durante 7 semanas y redujeron su crecimiento hasta por 12 semanas (Chen et al., 2003).

CONCLUSIONES

La información recopilada en este trabajo de investigación brinda un amplio conocimiento acerca de las bacteriocinas; como lo es su producción, modo de acción contra otras bacterias, métodos de purificación, y sus aplicaciones como aditivos alimentarios en la conservación de alimentos.

Por lo que se concluye que las bacteriocinas producidas por BAL sí tienen el potencial para ser usadas como bioconservadores alimenticios, ya que por medio de la formación de poros permeabilizan la membrana citoplasmática de bacterias causantes del deterioro en alimentos y algunos patógenos, principalmente *Listeria monocytogenes*, inhibiendo su reproducción y con ello evitando la descomposición temprana de algunos productos alimenticios. Sin embargo, también pueden llevar a cabo la biosíntesis de componentes de la pared celular; afectar la actividad de enzimas autolíticas o inhibir el desarrollo de esporas bacterianas.

Además, mediante el metabolismo de BAL, se producen compuestos antimicrobianos de importancia para la conservación de alimentos; el más común es el ácido láctico, el cual provoca el decremento del pH inhibiendo así, el crecimiento de otros microorganismos.

Ciertas bacteriocinas, como la nisina y pediocina, juegan un papel relevante en la conservación de alimentos, ya que al ser de consumo seguro para los humanos (GRAS), han sido vistas como una alternativa más natural de frenar el deterioro de alimentos lácteos y fermentados.

La aplicación de las bacteriocinas ha ido más enfocada en productos lácteos y fermentados, pero se ha estado trabajando en expandir su uso en la industria alimentaria. De igual forma, han sido de importancia en el campo médico.

Las bacterias productoras de bacteriocinas pueden ser un componente de la microbiota natural del producto alimenticio o bien pueden ser añadidas como cultivo iniciador.

Los productos mínimamente procesados al vacío y empacados en atmósferas modificadas MAP (Modified Atmosphere Packaging) pueden ser reformulados o rediseñados para asegurar el crecimiento de cepas de *Lactobacillus spp.*, productoras de bacteriocinas, y así ser conservados de una forma más natural.

Por otro lado, se ha probado insertar bacteriocinas en las películas de los envases para que los alimentos puedan ser protegidos contra el deterioro. En esta alternativa el envase primario estaría conservando al producto alimenticio.

El estudio de otras bacteriocinas sigue latente para llevar su uso a la industria no solo de alimentos, sino también en aplicaciones médicas, de una manera innovadora, brindando a los alimentos un concepto cada vez más natural.

GLOSARIO

- Agar MRS: Fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe, y por su formulación permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas (Britania Lab, 2021).
- AMPs: Antimicrobial peptides, traducido al español como péptidos antimicrobianos. Son proteínas de origen natural que tienen propiedades antibióticas.
- BAL: Bacterias ácido lácticas.
- DAP: ácido diaminopimélico.
- Envasado en atmósfera modificada, Modified atmosphere packaging (MAP): Se basa en alterar la composición de los gases en contacto con un alimento sustituyendo el aire de un envase de alimento sellado por mezclas gaseosas estrictamente controladas, que contienen dióxido de carbono, nitrógeno y otros. Ayuda a mejorar la vida útil de los alimentos.
- FPLC: tipo de cromatografía líquida que purifica biomoléculas grandes como proteínas, nucleótidos y péptidos.
- GRAS: por sus siglas en inglés, generalmente reconocido como seguro es una designación de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de que un químico o sustancia añadida a los alimentos es considerada segura por expertos bajo las condiciones de su uso previsto.
- HPLC: tipo de cromatografía líquida que separa compuestos de pequeño peso molecular.
- HPLC de fase inversa (RP-HPLC): técnica sensible y versátil que se utiliza para separar y analizar proteínas, fragmentos de proteínas y péptidos.
- Man-PTS: Sistema manosa fosfotransferasa; es un receptor de membrana responsable de la sensibilidad de *Listeria monocytogenes* a la pediocina PA-1 (Liyan et al., 2022).
- Montmorillonita: mineral del grupo de los silicatos, subgrupo filosilicatos y dentro de ellos pertenece a las llamadas arcillas.
- Quorum sensing: mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Agurto, T. y Ramos, J. (2008). Bacterias ácido lácticas: biopreservante de los alimentos. *Biotempo*, 8, 54-64.
2. Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M., y Abadias, M. (2011). Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Microbiology*, 28, 59-66.
3. Alvarado, J., Cabrera, E, García, V., Guerrero, J., Cano, W., Martínez, M. y Rodríguez, G. (2022). Desarrollo de una película comestible de nisina y natamicina con efecto antimicrobiano en queso panela . *Jóvenes en la Ciencia*, 16, 1–9.
4. Alvarez, M. V., Moreira, M. del R., Roura, S. I., Ayala, J. F., y González, G. A. (2015). Using natural antimicrobials to enhance the safety and quality of fresh and processed fruits and vegetables. **En:** T.M. Taylor. ed. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, Woodhead Publishing, 287–313.
5. Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M. & Hugas, M. (2003). Microbial Quality and Direct PCR Identification of Lactic Acid Bacteria and Nonpathogenic Staphylococci from Artisanal Low-Acid Sausages. *Applied Environmental Microbiology*, 69(8), 4583–4594.
6. Bactibase. (2016). *A database dedicated to bacteriocins*. [En línea]. Disponible en: <http://bactibase.hammamilab.org/main.php#> (Último acceso el 02 de diciembre de 2021)
7. BD Difco, (2022). *M17 Agar - M17 Broth*. [En línea]. Disponible en https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/218561.pdf (Último acceso el 22 agosto de 2023).

8. Biolog, (2022). *Identificación microbiana*. [En línea]. Disponible en <https://www.biolog.com/products-portfolio-overview/microbial-identification/> (Último acceso el 07 de mayo de 2023).
9. Bioser, (2023). *M 17 Agar*. [En línea]. Disponible en <https://www.bioser.com/productos/m-17-agar-98p/> (Último acceso el 22 agosto de 2023).
10. Britania Lab, (2021). *M.R.S. Agar*. [En línea]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6092dd2543f1d.pdf (Último acceso el 22 agosto de 2023).
11. Carbonó, V., y Cuan, A. (2017). Determinación de bacteriocinas en muestras de consorcios microbianos nativos de ecosistemas de manglar en el departamento del Atlántico, como fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Biociencias*, 12(1), 37 – 51.
12. Cardozo, M., Ramón, L., Poutou, R., Carrascal, A. y Corina, D. (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 203-222.
13. CFR, (2022). *CFR - Code of Federal Regulations Title 21*. [En línea]. Disponible en <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1538> (Último acceso el 02 de marzo de 2023).
14. Chatterjee, B., Mondal, D., y Bera, S. (2021). Diaminopimelic acid and its analogues: Synthesis and biological perspective. *Journal Pre-proof Tetrahedron*, 132403.
15. Chen, C., Sebranek, J., Dickson, J. & Mendonca, A. (2004). Use of Pediocin (Alta™ 2341) for control of *Listeria Monocytogenes* on Frankfurters. *Journal Of Muscle Foods*, 15(1), 35–56.

16. Condalab. (2019). *Agar APT (All Purpose Tween)*. [En línea]. Disponible en <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1294-11567-agar-apt-all-purpose-tween.html> (Último acceso el 30 de septiembre de 2021).
17. Cornell University. (2021). *Dairy Foods Science Notes, Lactic Acid Bacteria – Homofermentative and Heterofermentative*. [En línea] (actualizado en agosto de 2010). Disponible en <https://foodsafety.foodscience.cornell.edu/sites/foodsafety.foodscience.cornell.edu/files/shared/documents/CU-DFScience-Notes-Dairy-Cultures-HomoHeteroferm-10-08.pdf> (Último acceso el 02 de octubre de 2021).
18. Daba, G. M., & Elkhateeb, W. A. (2020). Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28.
19. Daeschel, M. (2014). Applications and Interactions of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria in Foods and Beverages. **En:** G. D. Hoover & L. R. Steenson eds. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press, 63-91.
20. Davidson, P.M. & Zivanovic, S. (2003). Food Preservation Techniques. The use of natural antimicrobials, 5–30.
21. De Angelis, M. & Gobbetti, M. (2016). *Lactobacillus spp.: General Characteristics*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2011, 78-90.
22. De Muynck, C., Leroy, A. I. J., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2004). Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research*, 159(4), 339–346.
23. De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 194–199.

24. Drider, D., & Rebuffat, S. (2011). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*. France: Springer.
25. Elshaghabee, F., Bockelmann, W., Meske, D., De Vrese, M., Walte, H., Schrezenmeir, J. & Heller, K. (2016). Ethanol production by selected intestinal microorganisms and lactic acid bacteria growing under different nutritional conditions. *Frontiers in microbiology*, 7(47).
26. Endo, A. & Dicks, L. (2014). Physiology of the LAB. **En** W. Holzapfel & B. Wood. eds. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 13-30.
27. Endo, A., Dicks, L., Björkroth, J., & Holzapfel, W. H. (2014). The family Leuconostocaceae. **En** Lactic Acid Bacteria, 377–380. US: Wiley-Blackwell.
28. Esquivel, I., Guerrero, R., Mendoza, J., y Navarrete, A. (1987). *Introducción a la tecnología de alimentos*. México: E.N.C.B. del I.P.N., 489-495.
29. Facklam R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4): 613-30.
30. FDA. (2023). *Understanding How the FDA Regulates Food Additives and GRAS Ingredients*. [En línea] Disponible en: <https://www.fda.gov/food/food-additives-and-gras-ingredients-information-consumers/understanding-how-fda-regulates-food-additives-and-gras-ingredients> (Último acceso el 30 de marzo de 2024).
31. Felis, G. E., & Pot, B. (2014). The family Lactobacillaceae. **En** Lactic Acid Bacteria, 245–247. US: Wiley-Blackwell.
32. Fernández, C. y Rafecas, M. (1985). Origen del diacetilo en las mantequillas; interés de su determinación. *Revista de Agricultura*, pp. 13.

33. Fernández, E. (1981). *Microbiología sanitaria de agua y alimentos*. Guadalajara: Universidad de Guadalajara (EDUG).
34. Fernández, E. y Hernández, M. (1985). *Aplicación del medio APN en el recuento de bacterias lácticas en quesos frescos no pasteurizados y requesones*, Guadalajara: UDG.
35. Gabrielsen, C., Brede, D.A., Hernández, P.E., Nes, I.F., Diep, D.B. (2012). The maltose ABC transporter in *Lactococcus lactis* facilitates high-level sensitivity to the circular bacteriocin garvicin ML. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 56, 2908–2915.
36. Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. y Nabil Ben, O. (2007). Bacteriocin based strategies for food biopreservation, *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.
37. Gilarová, R., Voldřich, M., Demnerová, K., Čeřovský, M., & Dobiáš, J. (1994). Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 24(1-2), 315–319.
38. Giraffa, G. (2014). Overview of the ecology and biodiversity of the LAB. **En** W. Holzapfel & B. Wood. eds. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. United Kingdom: Wiley-Blackwell, 45-54.
39. Gomes, R., Borges, M., Rosa, M., Castro-Gómez, R. y Espinosa, A. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications, *Food Technology and Biotechnology*. 56(2), 139–151.
40. Guo, X., Ma, L., Qiao, Z., Luo, L., Zhang, Y., Wang, X., & Lü, X. (2024). The antibacterial mechanism of the novel bacteriocin LpH25 and the synergistic preservation effect of this bacteriocin and Nisin in fresh milk. *LWT - Food Science and Technology Journal*, Vol. (194).

41. Harlander, S. K. (1993). Regulatory Aspects of Bacteriocin Use. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, 233–247.
42. Herrera, M. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana, metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños*, vol. (34).
43. Holzapfel, W. & Wood, B. (2014). *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. United Kingdom: Wiley-Blackwell.
44. Holzapfel, W., & Wood, B. (2014). Introduction to the LAB. *Lactic Acid Bacteria*, US: Wiley-Blackwell.
45. Honrada, R., Zendo, T. & Sonomoto, K. (2022). Multiple bacteriocin production in lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 134(4), 277-287.
46. Hoy, M. (2013). *Insect Molecular Genetics, An Introduction to Principles and Applications* (3rd ed). US: Academic Press.
47. Humble, M.W., King, A. & Phillips, I. (1977). API ZYM: un sistema simple y rápido para la detección de enzimas bacterianas. *Revista de Patología Clínica*, 30(3), 275–277.
48. Jay, M. (1992). *Microbiología Moderna de los Alimentos*, 3^o edición, España: Acribia.
49. Kang, J., Zhang, W., Sun, R., Song, G., Ping., W & Ge, J. (2022). Acetate Secretion Induces Bacteriocin Synthesis and Activates the Transcriptional Regulators *rgg* and *rpoD*. *Fermentation*, 8(10):524.
50. Karpiński, T. M., & Szkaradkiewicz, A. K. (2016). Bacteriocins. *Encyclopedia of Food and Health*, 312–319.

51. Kirtonia, K., Salauddin, M., Bharadwaj, K. K., Pati, S., Dey, A., Shariati, M. A. & Sarkar, T. (2021). Bacteriocin: A new strategic antibiofilm agent in food industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36.
52. Konisky J. (1982). Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annual Review of Microbiology*; vol. 59(2), pp. 171-200.
53. Krivorotova, T., Cirkovas, A., Maciulyte, S., Staneviciene, S., Budriene, S. & Serviene, E. (2016). Nanopartículas de pectina cargadas con nisina para la conservación de alimentos. *Hidrocoll alimentario*, 54, 49 – 56
54. Kumar, D., Thakur, M., Singh, S., Tripathy, S., Kumar, A., Baranwal, D., Patel, A., Shah, N., Lara, G., Kareem, A., Chávez-González, M., Flores, C., Aguilar, C. & Srivastav, P. (2022). Bacteriocins as antimicrobial and preservative agents in food: Biosynthesis, separation and application. *Food Bioscience*, 46.
55. Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171-177.
56. La Torre, I. (2011). Caracterización bioquímica y tecnológica de cepas ácido lácticas aisladas de leche cruda de oveja en el proceso de elaboración de queso artesano de Teruel. Tesis de licenciatura.
57. Lawson, P. A. (2014). The family Aerococcaceae. **En** *Lactic Acid Bacteria*, 71–74. US: Wiley-Blackwell.
58. Madigan, M., Martinko, J., Bender K., Buckley D. & Stahl D. (2015). *BROCK. Biología de los microorganismos*. Madrid, España: Pearson Education.
59. Mahrous, H., Mohamed, A., El-Mongy, M., El-Batal A., & Hamza, H, (2013). Study Bacteriocin Production and Optimization Using New Isolates of

Lactobacillus spp. Isolated from Some Dairy Products under Different Culture Conditions, *Food and Nutrition Sciences*, 4(3), 342-356.

60. Marconi, E., Sorrentino, E., Mastrocola, L., & Coppola, R. (2000). Rapid Detection of meso-Diaminopimelic Acid in Lactic Acid Bacteria by Microwave Cell Wall Hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3348–3351.
61. Masoodi, K., Maqbool, S., Saba, R. (2021). Chapter 19 - Polymerase chain reaction (PCR) **En** *Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology. A Practical Lab Manual*, pp. 109-116. India: Academic Press.
62. Mathur, H., Rea, M., Cotter, P., Hill, C., & Ross, P. (2015). The lactobionic subclass of bacteriocins: an update. *Current Protein and Peptide Science*, 16(6), 549-58.
63. Mathur, S. & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *International Journal of Food Microbiology*. 105, 281-295.
64. Medina., E. y Espinosa, F. (2009). Microarreglos: Tecnología con aplicaciones en el campo de la salud humana. *Alergia, asma e inmunología pediátricas*. 18(2), 52-59.
65. Mogoşanu, G., Grumezescu, A., Bejenaru, C., Everard & Bejenaru, L. (2017). Natural products used for food preservation. **En**: A. M., Grumezescu, ed. *Food preservation*. London: Academic Press, 365-411.
66. Montville, T. J., & Kaiser, A. L. (1993). Antimicrobial Proteins: Classification, Nomenclature, Diversity, and Relationship to Bacteriocins. **En**: T. J. Montville, y A. L. Kaiser. eds. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, London: Academic Press, 1–22.
67. Narvhus, J.A. & Axelsson, L. (2003). Lactic Acid Bacteria, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition), Academic Press, 3465-347.

68. National Human Genome Research Institute. (2023, mayo 25). *Tecnología de Microarrays (Chips de ADN O ARN)*. [En línea]. Disponible en <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Tecnologia-de-microarrays#:~:text=La%20tecnolog%C3%ADa%20de%20microarrays%20es,en%20contacto%20con%20el%20chip> (Último acceso el 28 de mayo de 2023).
69. Noda, M., Miyauchi R., Danshiitsoodol N., Matoba Y., Kumagai T. & Sugiyama M. (2018). Expression of genes involved in bacteriocin production and self-resistance in *Lactobacillus brevis* 174A is mediated by two regulatory proteins, *Applied and Environmental Microbiology*, 84, 2707-2717.
70. Oppegård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P. E., Fimland, G., & Nissen-Meyer, J. (2007). The Two-Peptide Class II Bacteriocins: Structure, Production, and Mode of Action. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 210–219.
71. Ortiz, M. (2006). *Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
72. Palomino, M. (2011). *Modificaciones en la envoltura de Lactobacillus casei durante el crecimiento bajo estrés osmótico*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.
73. Papagianni, M. & Anastasiadou, S. (2009). Pediocins: The bacteriocins of Pediococci. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*, vol. 8, (3).
74. Parada, J., Caron, C., Medeiros, A. & Soccol, C. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 521–542.

75. Parente, E., & Ricciardi, A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(5), 628–638.
76. Parra, R. (2010). Review. Bacterias Ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93-105.
77. Patiño, H. (2014). *Micro encapsulación de nisina a partir de Lactococcus lactis UQ2 y su incorporación en queso tipo panela*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
78. Pikuta, E. (2014). The family Carnobacteriaceae. **En** *Lactic Acid Bacteria*, 107–108. US: Wiley-Blackwell.
79. Pittet, V., Mañana, K. & Ziola, B. (2011). Ethanol Tolerance of Lactic Acid Bacteria, Including Relevance of the Exopolysaccharide Gene *Gtf*. [*Journal of the American Society of Brewing Chemists*](#), 69(1).
80. Ramírez, R., Urzúa, M., Camacho, A., Tsuzuki, G. y Esquivel, R. (2015). *Técnicas básicas de microbiología y su fundamento*. México: Trillas.
81. Red de laboratorios para la vigilancia de microorganismos resistentes. (2020). *Tipificación bacteriana mediante Multi Locus Sequence Typing (MLST)*. [En línea]. Disponible en https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/DiagnosticoMicrobiol%C3%B3gicoyProgramasVigilancia/Documents/RedLabRa-I-004-01.%20Protocolo_tipificacion_MLST.pdf (Último acceso el 27 de abril de 2023).
82. Ruiz, M., Colello, R., Padola, N. y Etcheverría, A. (2017). Inhibitory capacity of *Lactobacillus spp.* against pathogens involved in foodborne diseases. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 174-177.

83. Saavedra, L., & Sesma, F. (2011). Purification Techniques of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria and Other Gram-Positive Bacteria. **En** Prokaryotic Antimicrobial Peptides, 99–113.
84. Sánchez, M. (2016). Mecanismos de acción de péptidos antimicrobianos y mecanismos de resistencia de los patógenos. *Revista de la Asociación Bioquímica Argentina*, vol. 80 (1), 36-43.
85. Schillinger, U., & Holzapfel, W. H. (2003). Chapter 8: Culture media for lactic acid bacteria. **En** U. Schillinger & W.H. Holzapfel eds. *Progress in Industrial Microbiology*, Karlsruhe: Elsevier Science, 127–140.
86. Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3), 503–517.
87. Starmer, J.R. (1979). The lactic acid bacteria: microbes of diversity. *Food technology*, 60-64.
88. Stevens, M., Vollenweider, S., Lacroix, C., y Zurich, E. (2011). The potential of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* as a broad spectrum preservative in food. **En** Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation, (129–160). Suiza: Woodhead Publishing.
89. Švec, P., & Franz, C. (2014). The family Enterococcaceae. **En** Lactic Acid Bacteria, 171–173. US: Wiley-Blackwell.
90. Tamang, J. (2014). Biochemical and modern identification techniques, Microfloras of Fermented Foods. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 250–258.
91. Tamay, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.

92. Thedieck, K., Hain, T., Mohamed, W., Tindall, B. J., Nimtz, M., Chakraborty, T., & Jansch, L. (2006). The MprF protein is required for lysinylation of phospholipids in listerial membranes and confers resistance to cationic antimicrobial peptides (CAMPs) on *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 62(5), 1325–1339.
93. Toit, M., Huch, M., Cho, G.-S., & Franz, C. (2014). The family Streptococcaceae. **En** *Lactic Acid Bacteria*, 445–446. US: Wiley-Blackwell.
94. Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., y Montesinos, E. (2008). Bioprotection of golden delicious apples and iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 50-60.
95. Udhayashree, N., Senbagam, D., Senthilkumar, B., Nithya, K., & Gurusamy, R. (2012). Production of bacteriocin and their application in food products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), 406–410.
96. Vadyvaloo, V., Arous, S., Gravesen, A., Héchard, Y., Chauhan-Haubrock, R., Hastings, J.W. & Rautenbach, M. (2004). Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains, *Microbiology Society*, 150, 3025–3033.
97. Valenzuela, R., Cortez, R., Zazopulos, M. y Carmi, J. (2012). Determinación del perfil de ácidos grasos de bacterias del género *Vibrio* por cromatografía de gases. *Scientia Chromatographica*; 4(4):271-280.
98. Yang, R., Johnson, M., Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 58, 3355–3359.
99. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. & Harris H. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, and union of

Lactobacillaceae and *Leuconostocaceae*. Taxonomic description. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 2782–2858.

100. Zou, J., Jiang, H., Cheng, H., Fang, J., & Huang, G. (2018). Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, 781–789.

101. Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I. et al. 2010. A New Structure-based Classification of Gram-positive Bacteriocins. *The Protein Journal*, 29, 432–439.