



ESTRATEGIAS INNOVADORAS DE BIOCONSERVACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2018/19

Alumna: Coral Barcenilla Canduela

Tutora: Violeta Ruipérez Prádanos

Tutor externo: Avelino Álvarez Ordóñez

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)

Universidad de Valladolid

Contenido

Resumen	1
Abstract	1
1. Historia de la conservación de alimentos	2
2. Uso de bacterias o sus metabolitos en bioconservación	5
3. Bacteriocinas: ¿qué son?.....	5
3.1. Clasificación de las bacteriocinas.....	8
3.2. Modo de acción.....	10
3.3. Aplicaciones de las bacteriocinas en la industria alimentaria	12
4. Bacteriófagos: clasificación y modo de acción	18
4.1. Aplicaciones de los bacteriófagos	18
5. <i>Quorum sensing</i> y <i>quorum quenching</i>	21
6. Conclusiones	23
Referencias bibliograficas	25

Resumen

Uno de los debates más significativos en el campo de la producción de alimentos es la creciente preocupación de los consumidores por seguir una alimentación más natural. El rechazo hacia los aditivos químicos ha promovido el desarrollo de lo que se conoce con el término “bioconservación”, dentro de la que, particularmente, se han impulsado estudios acerca del uso de bacterias, sus metabolitos y bacteriófagos como posibles antimicrobianos naturales que permiten aumentar la vida útil de los alimentos y garantizar su seguridad microbiológica. En la presente revisión bibliográfica se muestra un panorama general de qué son estos antimicrobianos naturales proporcionando información respecto a su clasificación, modo de acción y aplicaciones en productos alimenticios. Asimismo, se incluye también información sobre estrategias basadas en el *quorum sensing* y su inhibición para evitar la proliferación de microorganismos patógenos y alterantes. Hasta el momento, los resultados obtenidos en estos campos de investigación son bastante prometedores, en especial en cuanto al empleo de algunas bacteriocinas como la nisina y el antifúngico natamicina, que han sido por ahora los compuestos más estudiados. No obstante, se continúa investigando para promover su aplicación como sustitutos de los conservantes sintéticos en alimentos.

Palabras clave: Bioconservación, bacteriocinas, bacteriófagos, antimicrobianos naturales, *quorum sensing*.

Abstract

The increasing concern of consumers to follow a natural diet has led to one of the most significant debates in the field of the food industry. The rejection of chemical additives has promoted the breakthrough of what is known as biopreservation, and within this field, the development of studies about the usage of bacteria, their metabolites and bacteriophages as potential natural antimicrobials for shelf-life extension and enhanced food safety. This review shows an overview on these natural antimicrobials, providing information about their classification, mode of action and applications in food. Besides, information is also provided on strategies based on quorum sensing and its inhibition to prevent proliferation of pathogenic and spoilage microorganisms. So far, the results obtained are quite promising, especially regarding the use of some bacteriocins, such as nisin, and the antifungal natamycin, which have been the most widely studied biopreservative agents to date. Nevertheless, research is still underway in order to promote their application as substitutes for synthetic food preservatives.

Key words: Biopreservation, bacteriocins, bacteriophages, natural antimicrobials, quorum sensing.

1. Historia de la conservación de alimentos

Hace millones de años, los primeros prehomínidos seguían una dieta vegetariana basada en plantas herbáceas y gramíneas, según indican estudios de morfología dentaria. Miles de años más tarde, se cree que los *Australopithecus* empezaron a basar su alimentación en una dieta omnívora más variada, que incluía animales de pequeño tamaño y cadáveres de mamíferos abandonados. Tras un largo periodo evolutivo, en el que se producen cambios que tienen consecuencias a nivel biológico y cultural, se produce el salto a la especie *Homo erectus*, que ya era capaz de cazar grandes animales. Con el paso de los años, se hicieron nuevos descubrimientos, como por ejemplo el fuego, que entre otros efectos, modificó por completo la manera en que se ingerían los alimentos. Se comprobó que las carnes cocinadas al fuego sufrían alteraciones en cuanto a textura y sabor. Además, se producía un aumento de su digestibilidad y se eliminaban microorganismos perjudiciales. De esta manera, se conseguía alargar la vida útil de ciertos alimentos, materia en la cual profundizaría más ampliamente el *Homo sapiens* con el desarrollo de otras tecnologías como el ahumado, desecación, salazonado y el empleo de frío y diversas especias (Ordóñez Pereda et al., 1998). Posteriormente, se empezaron a utilizar otros métodos de conservación más sofisticados: los egipcios usaban dióxido de azufre para conservar el vino, los griegos descubrieron el aceite de oliva como agente preservador y utilizaban sales y nitratos de sodio en carnes, los romanos empleaban vasijas de barro para proteger los víveres además de practicar la acidificación o la conserva con miel o hielo y, ya más recientemente, a finales del siglo XVIII, Nicolás Appert sentó los fundamentos de los tratamientos térmicos, conservando alimentos en recipientes sellados y calentados (Ordóñez Pereda et al., 1998; Saltmarsh and Insall, 2013)).

Actualmente, en los países industrializados, los consumidores exigen y esperan no sólo una gran variedad de alimentos, sino que éstos estén a su disposición durante todo el año. Esto implica que los productos tienen que aguantar un periodo de vida útil relativamente alto, desde su producción hasta que llegan al consumidor y son ingeridos (Saltmarsh and Insall, 2013). Además, hay que tener en cuenta que se deben cumplir en todo momento las exigencias de calidad y seguridad alimentarias, relativas a su valor nutricional, propiedades sensoriales y seguridad microbiológica.

El procesamiento térmico es uno de los métodos de conservación de alimentos más comúnmente utilizado en la industria alimentaria, aunque por otro lado puede conllevar efectos organolépticos y nutricionales no deseados (Pisoschi et al., 2017). Por eso, esta desafiante demanda es afrontada por la industria alimentaria, en gran parte,

mediante el empleo de aditivos, que permiten responder ante el requerimiento referido a variedad, precio, accesibilidad y calidad de los productos (Saltmarsh and Insall, 2013). No obstante, es muy común encontrar críticas provenientes de ciertos círculos hacia el uso de lo que el Codex Alimentarius (1995) define como *“cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características”* (Saltmarsh and Insall, 2013). Este rechazo es debido al aumento de enfermedades crónicas y los efectos adversos que han surgido en salud pública en los últimos años atribuidos a algunos aditivos como nitratos, benzoatos, sorbatos y formaldehído, entre otros (Pisoschi et al., 2017). Sirvan como ejemplo las reacciones alérgicas desatadas en consumidores hipersensibles a los sulfitos (Pisoschi et al., 2017) o los efectos carcinogénicos de los antioxidantes fenólicos sintéticos, que han restringido el uso del hidroxibutilanisol (BHA) y del butilhidroxitolueno (BHT) (Kim et al., 2013). Además, en base a un dictamen emitido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en 2003, se han modificado las autorizaciones en vigor para mantener el nivel de nitrosaminas en alimentos lo más bajo posible, reduciendo las dosis de nitratos y nitritos que se pueden añadir en el proceso de producción, que deben seguir garantizando la seguridad microbiológica de los mismos (Comisión Europea, 2006).

Como alternativa provocada por esta visión negativa de los aditivos alimentarios, se está prestando especial atención al estudio de la conservación de los alimentos con agentes más naturales, que mejoren la seguridad alimentaria sin ocasionar pérdidas nutricionales u organolépticas ni efectos adversos en la salud del consumidor (Kumariya et al., 2019; Pisoschi et al., 2017). Así, se están llevando a cabo investigaciones sobre el uso de aditivos de origen natural (por ejemplo, aceites esenciales), nuevas tecnologías no térmicas de conservación, como las radiaciones electromagnéticas, altas presiones hidrostáticas, o plasma atmosférico no térmico, o incluso microorganismos que resulten beneficiosos para alargar la vida útil de los alimentos. Por lo tanto, la búsqueda, identificación, caracterización, desarrollo y validación de aplicaciones de estas nuevas técnicas de conservación de alimentos son objetivos clave en tareas de investigación, desarrollo e innovación en el sector agroalimentario. Paralelamente, existe también la necesidad de implantar un método

sistemático para evaluar su toxicidad, su mecanismo de acción, y las correspondientes regulaciones de seguridad (Pisoschi et al., 2017).

Según algunos autores, la bioconservación se basa en utilizar sustancias naturales derivadas de seres vivos como bacterias, hongos, plantas o animales, con el objetivo de extender la vida útil de productos alimentarios garantizando su seguridad. Estas sustancias pueden ser metabolitos primarios y/o secundarios obtenidos a partir de microorganismos, frutas, verduras, semillas, aceites esenciales, productos animales como leche y huevos, o tejidos animales, entre otros. Son de interés para la industria alimentaria porque pueden minimizar la oxidación lipídica, inhibir la pérdida de color y, consecuentemente, prolongar la vida útil (Pisoschi et al., 2017). Por otro lado, algunos autores delimitan la bioconservación al uso de microorganismos y/o sus metabolitos para extender la vida útil y la seguridad alimentaria. Lo más habitual es utilizar agentes que tienen actividad antimicrobiana contra bacterias responsables del deterioro de alimentos y, especialmente, que pueden combatir patógenos alimentarios (Paul Ross et al., 2002; Settanni and Corsetti, 2008; Stiles, 1996). Un agente de bioconservación ideal debería mostrar solo actividad antimicrobiana específica contra patógenos o microorganismos alterantes, y no influir negativamente sobre el propio microbioma intestinal del consumidor, lo que supone un desafío a la hora de seleccionar compuestos bioactivos de interés (Pisoschi et al., 2017).

Atendiendo al objetivo final de extensión de vida útil, también pueden considerarse como potenciales bioconservantes de alimentos a los bacteriófagos. Se trata de virus que infectan específicamente a bacterias y son capaces de provocar la lisis de la pared de su célula hospedadora, tras lo cual nuevos fagos quedan libres para infectar nuevas células. De esta manera consiguen controlar la población bacteriana no deseada en los productos alimentarios (Baños Arjona, 2016; Lone et al., 2016).

En esta revisión bibliográfica se va a focalizar la atención precisamente en estudios que traten sobre esta prometedora y natural forma de conservación que emplea bacterias o sus metabolitos, y bacteriófagos, como agentes con acción inhibidora de microorganismos alterantes y patógenos para aumentar el periodo de vida útil de productos alimentarios (Kumariya et al., 2019).

2. Uso de bacterias o sus metabolitos en bioconservación

Algunos grupos de bacterias son causa común de deterioro de alimentos, representando una amenaza para la seguridad alimentaria y siendo agentes etiológicos de algunas patologías de transmisión alimentarias, como las originadas por *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* o *Listeria monocytogenes*, que incluso pueden llegar a ser fatales (Kumariya et al., 2019). Por ejemplo, en el año 2017 se comunicaron 2.480 casos humanos de listeriosis, 91.662 de salmonelosis y 246.158 de campilobacteriosis, destacando con 225 muertes los casos provocados por *Listeria* spp. (EFSA, 2018).

En cambio, existen otras bacterias que, al contrario que las anteriores, pueden presentar efectos deseados y beneficiosos en los alimentos. Como ejemplo, las bacterias ácido lácticas, que son parte de la microbiota natural presente en los alimentos que consumimos y además forman parte de nuestra microbiota intestinal (Oppegård et al., 2007). Tradicionalmente, han sido empleadas ampliamente en la producción de alimentos fermentados, convirtiendo lactosa en ácido láctico y generando adicionalmente otros compuestos como ácidos orgánicos, diacetilo, acetoina, peróxido de hidrógeno, péptidos antimicrobianos y bacteriocinas (Silva et al., 2018). La gran mayoría se incluyen en el listado denominado como GRAS según la FDA (U.S. Food and Drug Administration) porque son generalmente reconocidas como seguras (“Generally Recognised As Safe”) (Kumariya et al., 2019). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) también cualifica con el estado de Presunción Cualificada de Seguridad (QPS, por sus siglas en inglés) a muchos géneros de bacterias ácido lácticas como *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. y algunos *Streptococcus* spp. (EFSA, 2019).

3. Bacteriocinas: ¿qué son?

En los últimos años, las bacteriocinas están llamando la atención como conservantes naturales por su utilidad para obtener alimentos de elevada calidad y seguridad prescindiendo del uso de aditivos químicos. Aunque, por otro lado, hay autores que indican que su aplicación como aditivos puede estar limitada por su elevado precio o por su insuficiente efectividad contra determinados microorganismos patógenos, por lo que aún se siguen llevando a cabo investigaciones para mejorar las condiciones de su empleo. A día de hoy, numerosos estudios ya han conseguido aislar e identificar

bacteriocinas sintetizadas tanto por bacterias Gram-positivas como Gram-negativas que han servido para recopilar información y elaborar bases de datos que permiten la identificación automatizada de bacteriocinas y sus determinantes genéticos a partir de datos genómicos (Silva et al., 2018; van Heel et al., 2013).

Estas sustancias son compuestos biológicamente activos con estructura peptídica y actividad antimicrobiana que son sintetizados ribosomalmente por un gran número de bacterias (de Freire Bastos et al., 2015; Silva et al., 2018). Generalmente tienen una estructura de entre 20 y 60 aminoácidos, son catiónicas e hidrofóbicas y tienen un espectro reducido de actuación, siendo capaces de inhibir a bacterias similares o cercanas filogenéticamente. Existen algunas bacteriocinas que son activas tanto frente a bacterias alterantes como patógenas, ya sean Gram-positivas o Gram-negativas (Kumariya et al., 2019). No obstante, algunos autores afirman que la mayoría de las bacteriocinas descritas hasta el momento actúan en mayor medida frente a bacterias Gram-positivas (Pisoschi et al., 2017; Yildirim et al., 2018). Se estima que el 99% de las bacterias y arqueas pueden producir al menos una bacteriocina (Caulier et al., 2019), aunque las bacterias Gram-positivas han sido las más estudiadas para producir bacteriocinas con posibilidad de aplicación biotecnológica (de Freire Bastos et al., 2015).

Entre sus productores, las más destacadas son las bacterias ácido lácticas. De hecho, *Lactococcus lactis* es la especie bacteriana responsable de la producción de nisina, la bacteriocina que actualmente presenta más aplicaciones en la industria alimentaria y que también es reconocida bajo el estatus GRAS para su aplicación en alimentación (Kumariya et al., 2019). Como ya se ha comentado previamente, las bacterias ácido lácticas son el grupo de bacterias más ampliamente utilizado en la bioconservación de productos alimenticios, por su largo historial de uso seguro en la industria alimentaria y su abundancia en el medio ambiente y en muchos alimentos (da Costa et al., 2019; Skariyachan and Govindarajan, 2019). Pueden ser encontradas en leche y productos lácteos, carne, pescado, vegetales fermentados, vino y pan, entre otros, y se suelen emplear como cultivos iniciadores en fermentaciones, ya que la producción de ácido láctico durante este proceso mejora las características nutricionales, organolépticas y de textura de los productos (Tumbariski et al., 2018). No obstante, existen también otras bacteriocinas como la colicinas, producidas por bacterias coliformes, o aquellas sintetizadas por bacilos formadores de endosporas, aunque su aplicación en la producción de alimentos aún no se ha explorado (Grande et al., 2011).

Las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas y de otras especies bacterianas no tienen carácter tóxico contra células eucariotas y las bacterias productoras son inmunes a ellas (Tumbariski et al., 2018). Opegård et al. (2007) afirman que toda bacteriocina es tóxica para su bacteria productora pero que gracias a un mecanismo donde intervienen proteínas de autoinmunidad se crea una especie de autoprotección hacia el compuesto sintetizado. Todorov et al. (2019) afirman que estos péptidos antimicrobianos, mayoritariamente, actúan letalmente contra cepas de especies que están taxonómicamente relacionadas con sus bacterias productoras. En cambio, recientemente han aparecido estudios que demuestran que su espectro de actividad antimicrobiana puede abarcar un rango bastante más amplio, considerándose este hecho una de sus numerosas ventajas para su aplicación biotecnológica (de Freire Bastos et al., 2015; Harada et al., 2018). Silva et al. (2018) confirman que el espectro de actividad depende de cada bacteriocina, pudiendo afectar a las cepas que sean más próximas taxonómicamente o, en cambio, actuar en un rango bacteriano más grande. Se les valora también porque pueden ser inactivados por acción de enzimas proteolíticas intestinales y son fácilmente digeridas en el tracto gastrointestinal de los humanos, con lo cual, no tienen ningún impacto negativo en nuestra propia microbiota (Silva et al., 2018). Asimismo, son activas en un amplio rango de valores de pH y de temperaturas, y, son interesantes incluso porque su manipulación genética sería viable, siendo incluso posible su transferencia genética a otras cepas con interés industrial (Grande et al., 2011). En cuanto a las resistencias que se puedan originar ante su uso, existen diversas opiniones entre los autores. Por un lado, Bastos et al. (2015), indican que no existen resistencias relevantes firmemente definidas y que las diferentes investigaciones realizadas en el laboratorio no presentan un consenso al respecto. Según Grande et al (2011), al actuar frente a diferentes dianas celulares, no presentan resistencia cruzada a antibióticos de uso clínico. En cambio, otros autores sí que han encontrado bacterias que han desarrollado una clara resistencia al empleo de bacteriocinas, y de hecho las distinguen en resistencias innatas o adquiridas y explican que pueden deberse a adaptaciones en la composición, carga, grosor y/o fluidez de la membrana celular bacteriana (Cotter et al., 2005; Kumariya et al., 2019). En cualquier caso, sí que existe consenso en que aún queda mucho por investigar en cuanto al desarrollo de resistencias bacterianas ante el empleo de estos péptidos antimicrobianos (de Freire Bastos et al., 2015).

Se han llevado a cabo multitud de investigaciones científicas para estudiar la inhibición de bacterias patógenas o microorganismos alterantes mediante el uso de bacteriocinas que ayuden a conservar los alimentos. En estos estudios se ha trabajado con

bacteriocinas aisladas, o en combinación con otros antimicrobianos (ácidos o agentes quelantes) o con otros tratamientos (calor, atmósferas modificadas, envasado activo, altas presiones hidrostáticas, pulsos de luz, etc), obteniendo resultados prometedores que motivan a seguir realizando estudios en este ámbito. De hecho, se ha comprobado que su efectividad y eficacia en combinación con otros sistemas antimicrobianos en ocasiones se ve potenciada sinérgicamente (Grande et al., 2011).

3.1. Clasificación de las bacteriocinas

Existe más de una clasificación de estos heterogéneos compuestos que varía según cada autor atendiendo a sus propiedades físico-químicas, organización génica, secuencia aminoacídica, masa molecular o incluso el modo de acción o el rango de actividad antimicrobiana (Tumbariski et al., 2018). La primera clasificación y la más popular es la establecida por Klaenhammer en 1993 (Silva et al., 2018), aunque ha ido sufriendo varias modificaciones a medida que se han ido descubriendo nuevas bacteriocinas (Baños Arjona, 2016; de Freire Bastos et al., 2015). Existen cuatro clases de bacteriocinas según lo establecido por dicho autor (Kumariya et al., 2019), de las cuales, las más estudiadas son las pertenecientes a las clases I y II (Bolívar-Monsalve et al., 2019), posiblemente por ser resistentes al estrés térmico (Baños Arjona, 2016).

Los péptidos de la clase I están compuestos por entre 19 y 50 aminoácidos y se distinguen por tener un peso molecular inferior a 5 kDa y ser activos a nivel de la membrana celular. Pueden ser modificados de forma post-traducciona resultando en aminoácidos menos comunes como lantionina, β -metil-lantionina, dehidro-butirina y dehidro-alanina. A su vez, se subdivide en las clases Ia, Ib y Ic: la primera comprendería a los lantibióticos compuestos por lantionina y β -metil lantionina; la segunda, a los lantibióticos carbocíclicos compuestos por labionina (amino ácido cíclico); y los antimicrobianos que contienen azufre y un carbono- α , más conocidos como sactibióticos, comprenderían la tercera subclase. La nisina es la bacteriocina más conocida perteneciente al grupo I, y más en concreto a la subclase Ia (Bolívar-Monsalve et al., 2019; Kumariya et al., 2019).

Dentro de la clase II se engloban los pequeños péptidos antimicrobianos no modificados con propiedades termoestables. Debido a su naturaleza heterogénea, esta clase también se subdivide en varias subclases. La subclase IIa se compone de pediocinas con la peculiaridad de poseer en común la secuencia Y-G-N-G-V en el

extremo amino-terminal del péptido. Son bacteriocinas que tienen actividad específica en contra de *L. monocytogenes* y son generalmente producidas por bacterias ácido lácticas. Entre ellas se encuentra la pediocina PA-1, producida por aislados del género *Pediococcus* spp. En la subclase IIb se encuentran las bacteriocinas que necesitan la combinación de dos péptidos para formar un complejo operacional óptimo. La plantaricina producida por *Lactobacillus plantarum* y la lactococina generada por *L. lactis* son dos ejemplos de este subgrupo (Bolívar-Monsalve et al., 2019; Kumariya et al., 2019). El tercer subgrupo (IIc) está compuesto por bacteriocinas cíclicas que presentan una unión covalente entre sus extremos carboxilo y amino terminales. Tienen carácter anfifílico y catiónico, poseen un corazón hidrófobo muy compacto y una distribución asimétrica de cargas positivas. Debido a esta perfecta organización, tienen una estabilidad única (Baños Arjona, 2016). Existe una última subclase II d en la que están comprendidas aquellas bacteriocinas lineales que no son pediocinas, que no son modificadas, y que no tienen una secuencia líder, como es por ejemplo la bactofencina A (Kumariya et al., 2019).

En la clase III, ya menos estudiada y con controversia entre autores (Baños Arjona, 2016), se encuentran largas moléculas termolábiles como la colicina, sintetizada por *E. coli*, o la helventicina M y helventicina J, que actúan tanto frente a bacterias Gram-positivas como a bacterias Gram-negativas (Kumariya et al., 2019).

Finalmente, la clase IV está formada por un grupo independiente de bacteriocinas, denominadas bacteriolisinas, que consisten en unos complejos más grandes que pueden ser de naturaleza glucoprotéica o lipoprotéica. La leucocina S y lactocina 27 se incluyen dentro de este grupo (Kumariya et al., 2019).

Alvarez-Sieiro et al. (2016) plantearon una nueva clasificación para categorizar a las bacteriocinas producidas por géneros de bacterias ácido lácticas, que se basa en su biosíntesis y en su actividad biológica. Es una clasificación, no obstante, muy parecida a la anterior, en la que existen tres clases divididas a su vez en subclases. La diferencia es que el número de subclases es mucho mayor. Glicocinas, lantibióticos, sactibióticos y lasso-péptidos, entre otros, se clasifican en la clase I. En la clase II mantienen las pediocinas y los complejos de dos péptidos y añaden las bacteriocinas sin secuencia líder y un cuarto subgrupo misceláneo. En la clase III, al igual que la clasificación anterior, se encuentran las bacteriocinas termolábiles.

Debido al descubrimiento y caracterización constante de nuevas bacteriocinas, Maqueda et al. (2004) propusieron otra variante a la clasificación definida por Klaenhammer en 1993. Insistieron en cambiar la clase II, que está formada por

multitud de pequeñas moléculas que no coinciden más que en su termoestabilidad y en la ausencia de residuos modificados (esta heterogeneidad es mantenida por la clasificación propuesta por Álvarez-Siero (2016)). En concreto, sostienen que hay una bacteriocina incluida dentro de esta clase, la enterocina cíclica AS-48, que tiene unas peculiares características que distan de las demás bacteriocinas, lo que la convierte en el prototipo para conformar una nueva clase de bacteriocinas (Maqueda et al., 2004).

3.2. Modo de acción

Por lo general, en cuanto a su modo de acción, existen dos grupos principales de bacteriocinas: aquellas con efecto bactericida y aquellas con efecto bacteriostático. Es decir, unas llegan a provocar la muerte de la bacteria diana mientras que otras solo inhiben su desarrollo (Silva et al., 2018).

Su principal mecanismo de acción es atacar a la membrana citoplasmática del microorganismo diana afectando a su funcionalidad (Silva et al., 2018), aunque estudios recientes han identificado también otras dianas intracelulares (Pisoschi et al., 2017). Se cree que las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas afectan mayoritariamente a las funciones de la membrana, mientras que las colicinas y sus semejantes, que son producidas por bacterias Gram-negativas, actúan principalmente en procesos intracelulares (Martínez et al., 2019). Debido a la estructura anfipática de las bacteriocinas, su interacción inicial con la membrana celular se ve favorecida gracias a interacciones electroestáticas de la parte catiónica de la bacteriocina con las cargas aniónicas de los grupos fosfato presentes en la bicapa fosfolipídica celular (de Freire Bastos et al., 2015; Pisoschi et al., 2017). Tras esto, puede haber varios mecanismos de inactivación de la célula diana, aunque, de manera general, lo que se suele originar es la formación de poros en la membrana, comprometiendo su permeabilidad (de Freire Bastos et al., 2015). Esto antecede la pérdida de pequeños compuestos intracelulares e iones a través de los poros formados, y, por consiguiente, la producción de interferencias en el gradiente protónico transmembrana. El resultado acaba siendo la disfunción de la membrana como consecuencia de la permeabilización de la misma. Esta interacción con la membrana celular bacteriana explica por qué la nisina y otras bacteriocinas con mecanismos de acción similar ejercen primordialmente su acción antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas, puesto que la membrana externa de las bacterias Gram-negativas dificulta su acceso a la membrana citoplasmática diana. Asimismo, hay varios parámetros de las envolturas celulares que

condicionan este proceso, como su composición, su grosor y su carácter hidrofóbico (Pisoschi et al., 2017).

Por otro lado, muchos antibióticos de la clase I y algunas bacteriocinas de la clase II lo que hacen más concretamente es atacar un intermediario de la biosíntesis del peptidoglicano de la pared celular: el lípido II (Silva et al., 2018). Esta molécula es la encargada de transportar monómeros de peptidoglicano a través de la membrana, por lo que la actuación de la bacteriocina entorpecería el ciclo del lípido II. Este bloqueo puede afectar de dos maneras, formando un poro en el lugar de su anclaje, o bien inhibiendo la síntesis de la pared celular (de Freire Bastos et al., 2015). La nisina, tiene la capacidad de actuar de las dos maneras, acoplándose a la membrana y facilitando la formación de poros en ella, e inhibiendo la síntesis del peptidoglicano (Figura 1) (Silva et al., 2018).

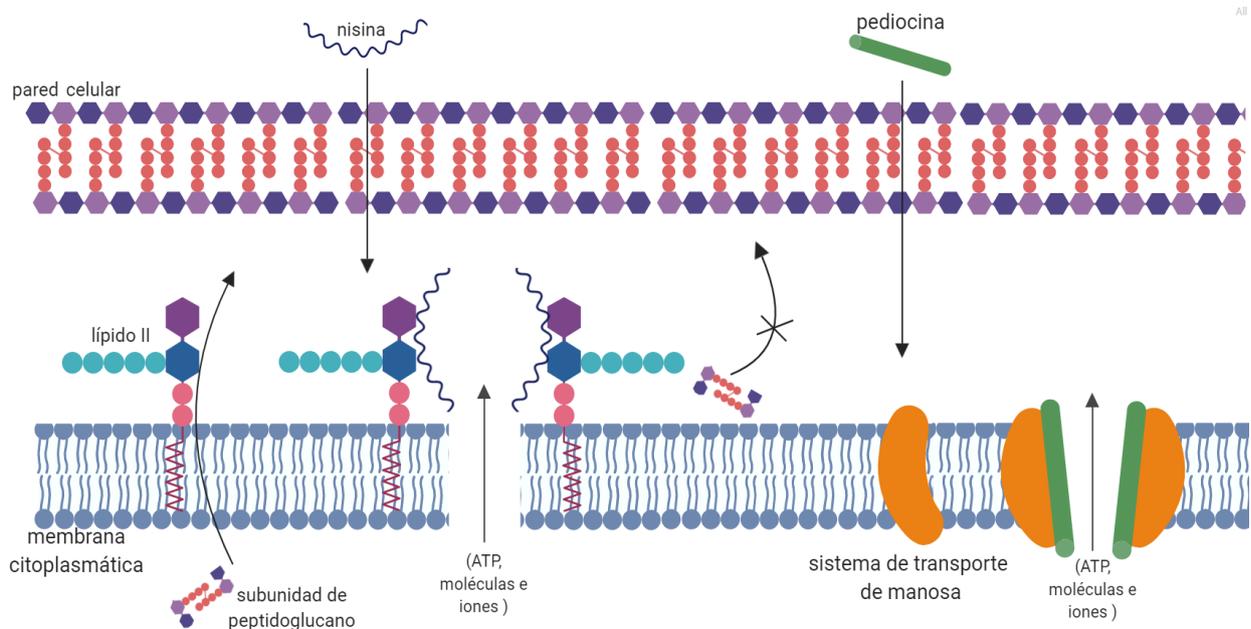


Figura 1. Modo de acción de la nisina y pediocina, pertenecientes respectivamente a las clases I y II de bacteriocinas. En el caso de la nisina, se puede producir la inhibición de la síntesis de peptidoglicano y la formación de poros en la membrana por su anclaje al lípido II. En segundo lugar, la pediocina interactúa con el sistema fosfotransferasa de transporte de manosa provocando también la creación de poros en la membrana. (Fuente: elaboración propia).

Otros modos de acción, especialmente aquellos de las bacteriocinas de la clase II, como la pediocina y sus semejantes (subclase IIa), involucran el anclaje de la bacteriocina al sistema fosfotransferasa de transporte de manosa de la membrana, con la consiguiente formación de poros (Silva et al., 2018). De esta manera, se

permeabiliza la membrana, provocando la disipación de la fuerza protón-motriz y disminuyendo las concentraciones intracelulares de ATP (Figura 1) (Baños Arjona, 2016; de Freire Bastos et al., 2015).

3.3. Aplicaciones de las bacteriocinas en la industria alimentaria

Existen muchos estudios que demuestran el potencial que tiene el uso de bacteriocinas para aumentar la vida útil y mejorar la seguridad de productos cárnicos, productos lácteos, pescado, o vegetales fermentados, entre otros, pero, aún así, su efectividad tiene que ser confirmada para aprobar su uso comercial. Para ello, se deben cumplir algunos criterios. Preferentemente, la cepa productora debe ser de grado alimentario (con estatus GRAS o QPS), debe tener un amplio rango conocido de inhibición y actividad específica y no debe estar asociada a riesgos para la salud del consumidor. Asimismo, la bacteriocina tiene que conllevar efectos beneficiosos y debe presentar estabilidad a la temperatura, a valores extremos de pH, a elevadas concentraciones salinas y no ser modificada en la matriz alimentaria empleada (Beristain-Bauza et al., 2012; Johnson et al., 2018; Silva et al., 2018). Además, se ha comprobado que la acción antimicrobiana de las bacteriocinas puede variar significativamente dependiendo de la matriz alimentaria empleada, por lo que su efectividad debe ser probada individualmente en cada producto (Silva et al., 2018).

Estos compuestos antimicrobianos pueden adicionarse en los productos alimentarios de diferentes maneras. Se puede inocular la cepa productora de bacteriocina en el alimento, o se puede añadir la bacteriocina purificada directamente. El primer caso puede resultar más ventajoso, puesto que si se añade la bacteriocina directamente, ésta puede interactuar con el alimento y/o degradarse perdiendo su actividad. Otra alternativa interesante sería mejorar la estabilidad de la bacteriocina en el sistema alimentario con la incorporación del agente activo en sistemas de envasado activo o mediante su encapsulación (Silva et al., 2018). Aun así, la opción más viable es incorporar el microorganismo productor de bacteriocina en sí mismo, ya que muchas de las cepas productoras son categorizadas en grupos con estatus QPS, mientras que la aprobación de la bacteriocina como aditivo de uso alimentario es más compleja.

Se ha demostrado que la nisina inhibe la germinación de esporas de *C. botulinum* en queso para untar, entre otros alimentos. *Pediococcus* spp. genera pediocina, y cabe destacar que un preparado comercial a base de pediocina PA-1, producido por la especie *P. acidilactici*, inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* y puede alargar la

vida útil de muchos alimentos listos para el consumo. Esta bacteriocina ha demostrado ser más efectiva que la nisina para actuar en contra de patógenos como *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, y otros microorganismos como *Pseudomonas* spp. y *E. coli*. Su potencial anti-listeria se ha estudiado en varios productos lácteos como queso tipo *cottage*, tipo crema y salsa de queso y ha resultado efectiva en contra de *S. aureus* en leche cruda de búfala (Kumariya et al., 2019; Silva et al., 2018; Verma et al., 2017).

Se han encontrado resultados muy satisfactorios y prometedores en varios estudios en los que se ha estudiado el efecto de diversas bacteriocinas aplicadas en envasado activo (Yildirim et al., 2018). La nisina, sintetizada por *L. lactis*, es la bacteriocina sometida a un mayor número de ensayos, quizás por su amplio espectro antibacteriano y porque es comercialmente usada al ser reconocida como GRAS (Abdollahzadeh et al., 2014). Ha demostrado una perfecta incorporación a diversos films elaborados a partir de metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, polietileno e incluso cartón, que han sido utilizados para el envasado de productos como pueden ser perritos calientes, carne de ternera, distintos tipos de leche, salmón ahumado y zumo de naranja (Yildirim et al., 2018). En perritos calientes se observó una reducción en la población de *L. monocytogenes* mayor a 2 log UFC/paquete tras 60 días bajo refrigeración al aplicar un film derivado de celulosa que incluía 10.000 o 7.500 UI/ml de nisina, siendo equivalente una Unidad Internacional (UI) a 0,025 µg (Franklin et al., 2004; JECFA, 2013). En carne de ternera y lomo de cerdo, se ha demostrado que la aplicación de nisina en combinación con EDTA alarga su vida útil a nivel microbiológico, obteniéndose en el caso del lomo de cerdo una prolongación de la misma de hasta más de 5 semanas. En otras carnes, las poblaciones de *E. coli* y de *L. monocytogenes* se vieron reducidas al aplicar films con nisina y EDTA. En jamón cocido, se obtuvieron buenos resultados al verse inhibidos los patógenos *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. por la aplicación de nisina en combinación con enterocinas, sakacinas y lactato de potasio (Yildirim et al., 2018). Por otro lado, en queso también se ha demostrado que el desarrollo de *Clostridium* spp. puede controlarse con este péptido (Pisoschi et al., 2017). El empleo conjunto de bacteriocinas con otras técnicas de conservación, ya sea en conjunto con otras bacteriocinas, otras moléculas o con tecnologías más sofisticadas de conservación, puede tener efectos sinérgicos a la hora de obtener alimentos seguros, de calidad y mínimamente procesados. Por otro lado, el efecto antimicrobiano puede verse disminuido por la influencia de otros componentes de las materias primas, las técnicas de procesado, el pH, o la temperatura. Por ejemplo, la actuación de enzimas

proteolíticas propias de la carne fresca podría suponer un factor limitante en la eficacia antimicrobiana de las bacteriocinas, ya que estas pueden degradar estos péptidos (Abdollahzadeh et al., 2014). Estos mismos autores comprobaron que las proteasas de la carne de pescado pueden inhibirse por acción del calor, lo que sería positivo para la actuación de la bacteriocina, pero, aún así, la eficacia de la nisina no se vio favorecida posiblemente por el establecimiento de uniones con proteínas o grasas de la matriz alimentaria. Lo que sí confirmaron Abdollahzadeh et al. (2014) en su estudio con nisina en carne de pescado es que el nivel de inhibición bacteriana aumenta conforme se incrementa la cantidad de nisina de 500 UI/g a 1000 UI/g.

Hasta el día de hoy, solo está permitido el uso como aditivo alimentario de la nisina (E-234) y la natamicina (E-235) (Yildirim et al., 2018). De hecho, está bien documentado que la combinación de nisina y natamicina inhibe el crecimiento de mohos y levaduras en la producción de aceitunas (Hondrodimou et al., 2011; Pisoschi et al., 2017). El empleo de nisina como aditivo alimentario, bajo el número E-234, está regulado por la directiva 95/2/EC de la Unión Europea (Yildirim et al., 2018), siendo posible su utilización en más de 50 países (Abdollahzadeh et al., 2014; Pisoschi et al., 2017).

Al contrario que la nisina, la natamicina no tiene actividad frente a bacterias, pero sí actúa contra mohos y levaduras. Tiene estructura de polieno macrólido, lo que nos indica que contiene un anillo de lactona con dobles enlaces. Esta estructura, más compleja que los demás péptidos antimicrobianos, es lo que la hace alejarse de la clasificación como bacteriocina. Presenta dos grandes ventajas: por un lado, ni los hongos ni las bacterias pueden volverse resistentes a esta sustancia porque interactúa con el ergosterol de la membrana citoplasmática de los hongos, y, por otro lado, difícilmente migra hacia el interior del alimento, lo que la convierte en la mejor opción para aplicar en superficies de quesos y embutidos (Comisión del Codex Alimentarius, 2000; Pisoschi et al., 2017).

Además de la nisina, existen otras bacteriocinas que se caracterizan por su estabilidad ante cambios de temperatura y por su funcionalidad dentro de un amplio rango de valores de pH. Se trata de las pediocinas, que son secretadas por la especie *Pediococcus* spp. y han sido evaluadas en productos cárnicos y vegetales. Son eficaces contra *L. monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* y *Clostridium perfringens* (Pisoschi et al., 2017). Por otro lado, la reuterina, producida por *Lactobacillus reuteri*, resiste ante cambios térmicos y en presencia de enzimas líticas, y además se caracteriza por su elevada solubilidad en agua y estabilidad en un amplio rango de valores de pH (Pisoschi et al., 2017).

En el año 2018, la FDA aprobó con el estatus GRAS a la preparación comercial que incluye la cepa *Carnobacterium divergens* M35 y sus metabolitos como la divergicina M35 para su uso como antimicrobiano frente a *L. monocytogenes* en tres especies de salmón ahumado -coho, sockeye y del Atlántico- y en trucha arcoíris ahumada. Pero esta no es la primera especie de *Carnobacterium* spp. que adquiere este estatus, pues en 2005 y 2010 se aprobó la cepa *Carnobacterium maltaromaticum* CB1 como inhibidor de *L. monocytogenes* en varios productos listos para el consumo (FDA, 2019).

En la Tabla 1 se muestran algunas bacteriocinas pertenecientes a varios grupos que son activas frente a diversos microorganismos patógenos y alterantes y que pueden emplearse en productos cárnicos, lácteos y vegetales.

Tabla 1. Ejemplos de bacteriocinas activas frente a diversos microorganismos patógenos o alterantes en diferentes productos alimenticios.

Bacteriocina	Clase (sub clase)	Microorganismo productor	Microorganismo diana	Producto	Método de aplicación	Fuentes
Nisina (E-234)	I (Ia)	<i>L. lactis</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. botunillum</i> <i>S. aureus</i>	Quesos, leche pasteurizada, vegetales, perritos calientes, carne	Bacteriocina purificada en solución acuosa durante el procesado; pulverizada sobre la superficie o añadida en envasados activos, sola o en combinación con otros agentes conservantes	(Cotter et al., 2005; Gharsallaoui et al., 2016; Silva et al., 2018)
Plantaracina	I (Ic)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>C. botunillum</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>L. monocytogenes</i>	Productos lácteos, carne, conservas	Adición de bacteriocina purificada	(Johnson et al., 2018)
Lacticina	I (Ic)	<i>L. lactis</i>	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>	Yogur, queso tipo cottage y queso fresco, carne picada de ternera.	Adición de bacteriocina purificada	(Johnson et al., 2018; Silva et al., 2018)

Tabla 1. (Continuación)

Bacteriocina	Clase (sub clase)	Microorganismo productor	Microorganismo diana	Producto	Método de aplicación	Fuentes
Pediocina PA-1	II (IIa)	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>L. innocua</i> , <i>Salmonella</i> spp.	Jamón cocido	Preparado comercial ALTA 2431 (Quest) y ALTA 2351 añadido en polvo	(Cotter et al., 2005; Santiago-Silva et al., 2009)
Lactocina	II (IIb)	<i>L. lactis</i>	<i>L. plantarum</i> y <i>L. innocua</i>	Salchichas	Añadida en envasado activo	(Yildirim et al., 2018)
Enterocina EJ97	II (IIc)	<i>E. faecalis</i> EJ97	<i>Bacillus</i> spp., <i>E. faecalis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Vegetales enlatados y bebidas	Adición de bacteriocina purificada	(Johnson et al., 2018)
Enterocina AS-48	IV	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>S. aureus</i> y <i>B. cereus</i>	Carnes, vegetales, productos lácteos	En solución acuosa combinado con otros métodos de conservación	(Gálvez et al., 2007; Silva et al., 2018)

4. Bacteriófagos: clasificación y modo de acción

Los bacteriófagos, también llamados fagos, son virus que atacan específicamente a las bacterias. Tienen un aspecto en común con las bacteriocinas, y es que, al igual que las anteriores, también poseen actividad antimicrobiana, aunque su modo de acción es totalmente diferente (Martínez et al., 2019).

La clasificación de los fagos se puede enfocar desde diferentes puntos de vista. Si prestamos atención a su morfología podemos encontrarnos con fagos de dos tipos: con envuelta y sin envuelta. En cambio, si la clasificación se hace en base a su ácido nucleico, podemos tener fagos con ADN o con ARN, y estos a su vez, pueden ser de doble cadena o de cadena simple. Finalmente, su material genético puede aparecer de manera circular o lineal (Esther and Sánchez, 2013).

Por otro lado, según su modo de actuación también se pueden clasificar los fagos en dos categorías: los que siguen un ciclo de vida lítico y los que siguen un ciclo de vida lisogénico (Figura 2) (Esther and Sánchez, 2013). En el primer caso, los ácidos nucleicos de los fagos penetran en la célula hospedadora, donde llevarán a cabo su replicación, se sintetizarán enzimas virales y se producirá el ensamblaje de nuevas partículas fágicas, que serán liberadas al exterior de la célula una vez se haya provocado la lisis celular de la bacteria (Martínez et al., 2019). Los que siguen el ciclo lisogénico, integran su ADN en el material genético de la bacteria huésped, que más tarde se multiplicará en procesos de división celular, pasando la información genética fágica a la progenie bacteriana (Esther and Sánchez, 2013). En seguridad alimentaria, los bacteriófagos con ciclo lisogénico no son susceptibles de ser utilizados en estrategias de bioconservación ya que pueden dotar de virulencia o transferir genes de resistencia a los antibióticos a la célula hospedadora. Por lo tanto, solo sería interesante el empleo de virus con ciclo de vida lítico (Harada et al., 2018).

4.1. Aplicaciones de los bacteriófagos

Recientemente, se está prestando especial atención al uso de fagos como nuevos antimicrobianos para reducir brotes de toxoinfección alimentaria, y también para minimizar la diseminación de bacterias zoonóticas multirresistentes a los antibióticos a lo largo de la cadena alimentaria. Por lo tanto, la terapia con fagos, que ya se usaba en el pasado para tratar infecciones bacterianas, se está abriendo paso en los ámbitos de la agricultura y la seguridad alimentaria (Martínez et al., 2019).

Además del empleo directo del fago en sí, alternativamente se pueden utilizar enzimas líticas producidas por bacteriófagos, como las endolisinas y las hidrolasas de peptidoglicanos asociadas a viriones (Figura 2). Estas enzimas tienen importantes propiedades como su capacidad de actuación en numerosas matrices, su idoneidad para la manipulación genética y su supuesta inmunidad a resistencias microbianas (Martínez et al., 2019).

Los fagos son susceptibles de perder actividad en la matriz alimentaria, por lo que su aplicación a través de diferentes tipos de envasado activo ha sido estudiada también. De esta manera, se conseguiría una liberación controlada de partículas fágicas en el alimento (Martínez et al., 2019). Por ejemplo, se ha estudiado su inmovilización en una membrana modificada de celulosa cargada positivamente, o la impregnación de una suspensión fágica en papel, e incluso también la incorporación de bacteriófagos encapsulados en geles de alginato que posteriormente se aplican en papel (Lone et al., 2016). Otro estudio realizado por Cui et al. (2017) demuestra una prometedora técnica de encapsulación de bacteriófagos en liposomas, que se aplican sobre un film de quitosano, y que mostró actividad contra *E. coli* O157:H7 sin tener impacto sobre la calidad sensorial de la carne de ternera. También se están explorando la aplicación combinada de endolisinas de origen fágico con otros bioconservantes como nisina (Ibarra-Sánchez et al., 2018) o con otras tecnologías de conservación como las altas presiones hidrostáticas (Misiou et al., 2018). Ibarra-Sánchez et al (2018) obtuvieron resultados sinérgicos contundentes con la combinación de la endolisina PlyP100 (producida por el fago de *Listeria* P100) con nisina para combatir *L. monocytogenes* en queso fresco, sin presentar desarrollo de resistencias a ninguno de los dos antimicrobianos. Asimismo, en un estudio que consistía en la combinación de endolisinas con altas presiones hidrostáticas, se observó que la eficacia de la técnica empleada es dependiente del medio donde se aplica, es decir, que la composición y características químicas del alimento influyen determinantemente, por lo que se requiere una optimización individualizada de cada estrategia de bioconservación (Misiou et al., 2018).

Otro estudio ha evaluado la inhibición de *S. aureus*, uno de los patógenos más comunes en brotes de toxoinfección alimentaria, con la utilización de la endolisina Lysdb, producida por un fago con actividad infectiva en *Lactobacillus delbrueckii*. Esta endolisina actúa anclándose a la pared celular del patógeno provocando su lisis celular (Figura 2). Para estudiar su aplicación en queso, se ha modificado genéticamente a *Lactobacillus casei* para que libere la endolisina Lysdb progresivamente durante el proceso de maduración del queso. Los resultados del estudio concluyen la efectiva

inactivación de *S. aureus* durante la fermentación de leche cruda de vaca para la obtención de queso (Guo et al., 2016).

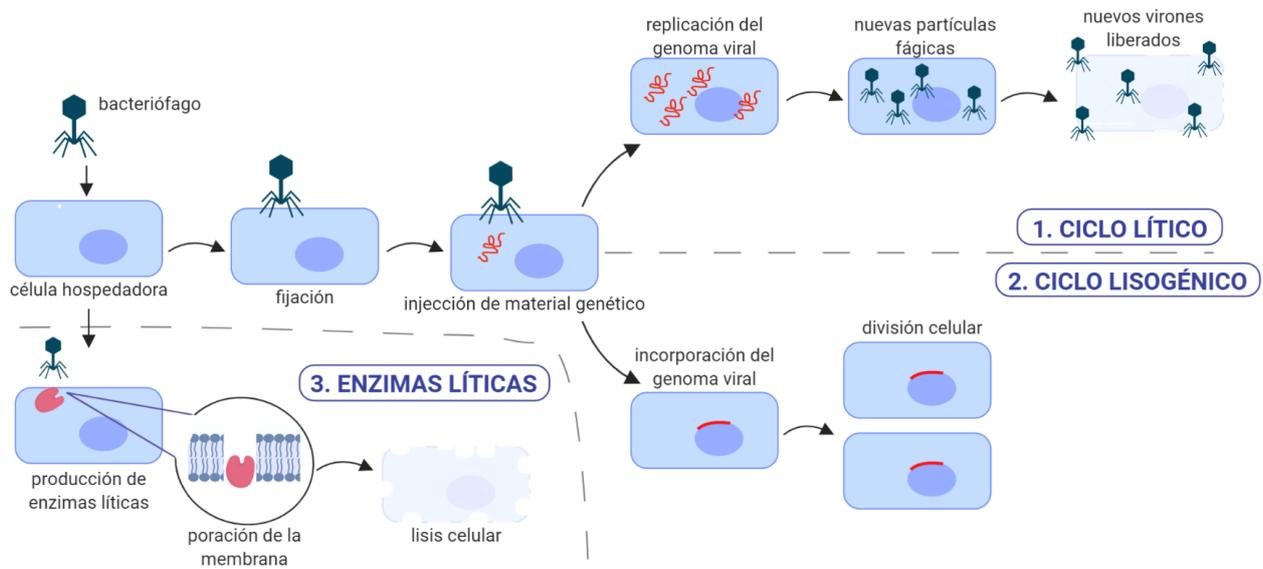


Figura 2. Representación de los modos de actuación de los bacteriófagos. Se puede observar ambos ciclos de vida: ciclo lítico y ciclo lisogénico. Además, se representa la capacidad de las enzimas líticas para provocar la lisis celular. (Fuente: elaboración propia).

En la Tabla 2 se muestran las características más ventajosas del empleo de bacteriófagos y sus enzimas líticas, así como también sus inconvenientes, a la hora de mejorar la seguridad alimentaria.

Tabla 2. Ventajas y desventajas del empleo de bacteriófagos y sus enzimas líticas en seguridad alimentaria (Fuente: Martínez et al. (2019)).

	Bacteriófagos	Enzimas líticas
Ventajas	Alta especificidad	
	Seguras	
Limitaciones	Activas contra bacterias multirresistentes	
	Facilidad de manipulación genética	
Limitaciones	Ubicuidad	No generan resistencias bacterianas
	Necesidad de combinación de varios fagos	Producción costosa
Limitaciones	Possible transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos y de genes de virulencia	No son efectivas contra bacterias Gram-negativas

5. *Quorum sensing* y *quorum quenching*

A finales de los años 70 se desmontó la creencia de que las bacterias eran microorganismos que funcionaban de manera autónoma (Kareb and Aïder, 2019). Se descubrió que estos organismos unicelulares tienen un sistema de interacción intercelular en el que una población de bacterias es capaz de comunicarse y coordinar una respuesta colectiva y apropiada ante variaciones en el ambiente donde se encuentran. Esta comunicación se conoce por el nombre de *quorum sensing* y puede ser definida como un sistema sincronizado de regulación de expresión de genes que es dependiente de la densidad de células y de las condiciones ambientales. Este mecanismo de señalización les permite regular diversas funciones fisiológicas como la formación de biofilms, la expresión de factores de virulencia, la síntesis de bacteriocinas o la producción de bioluminiscencia, que fue el fenotipo que llevó a la primera descripción del fenómeno (Kareb and Aïder, 2019).

El *quorum sensing* se origina en primer lugar por la síntesis, secreción y acumulación de moléculas de señalización de bajo peso molecular, llamadas autoinductores. Cuando estas moléculas alcanzan una determinada concentración (*quorum*) y son detectadas por las células (*sensing*), una respuesta colectiva se induce en toda la población bacteriana para adaptarse al medio que las rodea (Kareb and Aïder, 2019; Reading and Sperandio, 2006).

Los sistemas de *quorum sensing* también modulan la expresión de algunas enzimas líticas que están involucradas en el deterioro de alimentos. Por ejemplo, en el caso de la leche y productos lácteos, las proteinasas, hidrolasas o lipasas bacterianas responsables de su desperdicio están reguladas por sistemas de *quorum sensing*, activados al final de la fase estacionaria de crecimiento cuando la densidad celular bacteriana es alta. De la misma manera, en productos cárnicos, se ha detectado la acción concomitante de autoinductores de tipo acil-homoserín lactona con enzimas proteolíticas (Ammor et al., 2008). Por contra, en muchos casos, la síntesis de bacteriocinas con actividad antimicrobiana es coordinada por *quorum sensing*. Por ambos motivos, este mecanismo influye indirectamente en la conservación de alimentos. En el pasado se observó que la producción de bacteriocinas por algunos microorganismos era dependiente de su densidad celular, por lo que se relacionó con este hecho (Turovskiy et al., 2007). Por ejemplo, los lantibióticos pertenecientes a la clase I son producidos por un sistema de *quorum sensing* compuesto por dos moléculas: la histidina quinasa (LanK) y un regulador transcripcional (LanR). Por otro lado, algunas bacteriocinas de la clase II también son reguladas por un sistema de

quorum sensing, que algunos autores definen como de dos componentes y otros como de tres componentes (Kareb and Aider, 2019). También es posible que el autoinductor actúe por sí sólo como antimicrobiano (Kareb and Aider, 2019), como es el caso de la N-dodecanoyl homoserina lactona producida por *Pseudomonas aeruginosa* (Kaufmann et al., 2005). En cambio, algunos de los autoinductores que también tienen propiedades antibacterianas por sí solos no llegan a ser tan efectivos como la bacteriocina cuya producción regulan (Turovskiy et al., 2007). Por lo general, las bacteriocinas de la clase I, además de actuar como antimicrobianos, se comportan también como autoinductores reguladores del *quorum sensing* (Turovskiy et al., 2007). Así lo corrobora Kleerebezem (2004) en su estudio sobre nisina y subtilina como autoinductores con actividad antimicrobiana.

Si los sistemas de *quorum sensing* son responsables de coordinar los comportamientos de las bacterias, interfiriendo sobre ellos se podrían bloquear las funciones de estos microorganismos, lo que sería especialmente deseable en el caso de bacterias patógenas. Es por eso por lo que se están llevando a cabo estudios sobre lo que se denomina *quorum quenching*, que no es otra cosa que la obstaculización del *quorum sensing* (Turovskiy et al., 2007; Weiland-Bräuer et al., 2019). Los agentes con actividad de *quorum quenching* no ocasionan la muerte de las células bacterianas, pero impiden la proliferación de microorganismos patógenos y responsables del deterioro de alimentos y la expresión de su pleno potencial de virulencia y/o de alteración de los alimentos.

Estos sistemas de bloqueo del *quorum sensing* se han estudiado en profundidad en la macroalga *Delisea Pulchra*, que de esta manera controla la formación de biofilms bacterianos en su superficie. Esta especie marina produce una variedad de furanonas halogenadas que ejercen una acción antagónica frente a moléculas autoinductoras claves en el *quorum sensing* de bacterias Gram-negativas (Weiland-Bräuer et al., 2019). Las furanonas halogenadas interfieren por tanto en la interacción entre la acil homoserina lactona (autoinductor) y su receptor específico, impidiendo así la comunicación bacteriana (Turovskiy et al., 2007).

Existen muchas sustancias naturales que son comúnmente empleadas en la formulación de alimentos y que actúan como inhibidores de *quorum sensing*, por lo que podría fomentarse su empleo a modo de conservantes naturales (Ammor et al., 2008). Algunos extractos de ajo han demostrado interferir en el *quorum sensing* y, consecuentemente, en la formación de biofilms de *P. aeruginosa*, reduciendo así su tolerancia al tratamiento con el antibiótico trobramicina (Rasmussen et al., 2005).

También se han llevado a cabo estudios con extractos de vainilla como posibles inhibidores de sistemas de *quorum sensing*, obteniéndose resultados muy satisfactorios con la inhibición del autoinductor de tipo homoserina lactona de la especie *Chromobacterium violaceum* (Choo et al., 2006).

Estos sistemas antagónicos al *quorum sensing* pueden activarse también entre dos bacterias competidoras entre sí, de tal manera que una de ellas degrade o bloquee los autoinductores producidos por la otra. Por lo tanto, el fenómeno de *quorum quenching* puede ser muy prometedor si se emplea una bacteria con reconocido estatus QPS con capacidad para inhibir los sistemas de *quorum sensing* de microorganismos patógenos o alterantes y, por tanto, su virulencia o potencial de alteración de alimentos. A modo de ejemplo, este fenómeno se observa entre *Lactobacillus acidophilus* La-5 y el patógeno *E. coli* O157:H7. El sobrenadante del lactobacilo contiene unas fracciones que son capaces de interactuar con los sistemas de *quorum sensing* de *E. coli* O157:H7 encargados de regular la expresión de genes de virulencia (Kareb and Aïder, 2019).

6. Conclusiones

Las investigaciones realizadas hasta el momento ponen de manifiesto la posibilidad de usar estos antimicrobianos naturales como alternativa al uso de aditivos químicos. Los resultados obtenidos con algunas bacteriocinas como la nisina en combinación con otras sustancias o métodos antimicrobianos son bastante prometedoras, lo que incentiva a seguir estudiando su empleo para alargar la vida útil de productos alimenticios. En términos prácticos, aunque muchas de las aplicaciones se han evaluado con la adición directa de bacteriocinas purificadas, sería interesante priorizar el empleo de la propia bacteria productora, ya que la aprobación de bacteriocinas como aditivos para su uso en aplicaciones industriales puede resultar más complicada. Por otro lado, en cuanto a la clasificación de las bacteriocinas, parece necesario llegar a un consenso de clasificación universal para que queden perfectamente especificadas las diferentes clases y subclases existentes.

En cuanto al uso de bacteriófagos y sus enzimas líticas, se han obtenidos resultados muy satisfactorios, como por ejemplo sus aplicaciones a través de envasado activo o el empleo de endolisinas para combatir a los patógenos *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

Del mismo modo que las anteriores estrategias, la manipulación del *quorum sensing* de bacterias patógenas y alterantes también ha demostrado ser muy interesante para alargar la vida útil de productos alimenticios.

Por último, se puede afirmar abiertamente que es necesario continuar con las investigaciones referidas a bioconservación de alimentos para lograr su aplicación de manera exitosa como sustituto de conservantes químicos en un futuro cercano. Especialmente, es necesaria una optimización individualizada de cada agente antimicrobiano dentro de cada matriz alimentaria concreta.

Referencias bibliograficas

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M., Hosseini, H., 2014. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.004>
- Ammor, M.S., Michaelidis, C., Nychas, G.-J.E., 2008. Insights into the role of quorum sensing in food spoilage. *Journal of Food Protection*. 71, 1510–1525. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.7.1510>
- Baños Arjona, A., 2016. Aplicación de la tecnología de las barreras en el desarrollo de la enterocina AS-48 como bioconservante alimentario: Estudio de probiosis de una cepa productora de AS-48. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Beristain-Bauza, S.C., Palou, E., López-Malo, A., 2012. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 6, 64–78.
- Bolívar-Monsalve, J., Ramírez-Toro, C., Bolívar, G., Ceballos-González, C., 2019. Mechanisms of action of novel ingredients used in edible films to preserve microbial quality and oxidative stability in sausages - A review. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.011>
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., Mahillon, J., 2019. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Choo, J.H., Rukayadi, Y., Hwang, J.-K., 2006. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. *Letters in applied microbiology*. 42, 637–41. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01928.x>
- Codex Alimentarius, 1995. Norma general para los aditivos alimentarios. <http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/en/>
- Comisión del Codex Alimentarius, 2000. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. Ratificación y/o revisión de las dosis máximas para aditivos alimentarios en las normas del codex. http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFAC/ccfac32/fa00_05s.pdf
- Comisión Europea, 2006. Directiva 2006/52/CE del parlamento europeo y del consejo de 5 de julio de 2006 por la que se modifica la Directiva 95/2/CE relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes y la Directiva 94/35/CE relativa a los edulcorantes utilizados en los productos alimentarios. *Diario Oficial de la Unión Europea*. http://www.mcu.es/cine/docs/Novedades/Recomendacion_Parlamento_Europeo_Consejo_Aprendizaje_permanente.pdf
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3, 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Cui, H., Yuan, L., Lin, L., 2017. Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in beef. *Carbohydrate Polymers*. 177, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.137>
- da Costa, R.J., Voloski, F.L.S., Mondadori, R.G., Duval, E.H., Fiorentini, Á.M., 2019. Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. *Journal of Food Quality*. 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/4726510>

- de Freire Bastos, M.D.C., Varella Coelho, M.L., da Silva Santos, O.C., 2015. Resistance to bacteriocins produced by gram-positive bacteria, *Microbiology*. 161, 683-700. <https://doi.org/10.1099/mic.0.082289-0>
- de Oliveira, T.M., De Fátima Ferreira Soares, N., Pereira, R.M., De Freitas Fraga, K., 2007. Development and evaluation of antimicrobial natamycin-incorporated film in gorgonzola cheese conservation. *Packaging Technology and Science*. <https://doi.org/10.1002/pts.756>
- EFSA, 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- EFSA, 2019. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 10: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2019. *EFSA J*. 17. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5753>
- Elsser-Gravesen, D., Elsser-Gravesen, A., 2013. Biopreservatives. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. https://doi.org/10.1007/10_2013_234
- Esther, M., Sánchez, H., 2013. Evaluación de bacteriófagos y bacteriocinas para la eliminación de *Listeria monocytogenes*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad de Oviedo.
- FDA, 2019. GRAS Notices [en línea]. Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search= (accedido el 29/7/19).
- Franklin, N.B., Cooksey, K.D., Getty, K.J.K., 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on the surface of individually packaged hot dogs with a packaging film coating containing nisin, *Journal of Food Protection*. 67, 480-485.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L., Omar, N. Ben, 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 120, 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>
- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., Degraeve, P., 2016. Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56, 1262–1274. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.763765>
- Grande Burgos, M^a J.; Lucas, R; López Aguayo, M^a C; Pérez Pulido, R; Gálvez, A., 2011. Bioconservación de alimentos cárnicos. *Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Orinetal*. 24, 111–123.
- Guo, T., Xin, Y., Zhang, C., Ouyang, X., Kong, J., 2016. The potential of the endolysin Lysdb from *Lactobacillus delbrueckii* phage for combating *Staphylococcus aureus* during cheese manufacture from raw milk. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100, 3545–3554. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7185-x>
- Harada, L.K., Silva, E.C., Campos, W.F., Del Fiol, F.S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V.N., Balcão, V.M., 2018. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological Research*. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>
- Hondrodimou, O., Kourkoutas, Y., Panagou, E.Z., 2011. Efficacy of natamycin to control fungal growth in natural black olive fermentation. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.015>
- Ibarra-Sánchez, L.A., Van Tassell, M.L., Miller, M.J., 2018. Antimicrobial behavior of phage endolysin PlyP100 and its synergy with nisin to control *Listeria monocytogenes* in Queso Fresco. *Food Microbiology*. 72, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.013>
- JECFA, 2013. Nisin [en línea]. Disponible en:

http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/monograph7/additive-295-m7.pdf (accedido el 6/7/19)

- Johnson, E.M., Jung, D.Y.G., Jin, D.Y.Y., Jayabalan, D.R., Yang, D.S.H., Suh, J.W., 2018. Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1340870>
- Kareb, O., Aïder, M., 2019. Quorum sensing circuits in the communicating mechanisms of bacteria and its implication in the biosynthesis of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09555-4>
- Kaufmann, G.F., Sartorio, R., Lee, S.-H., Rogers, C.J., Meijler, M.M., Moss, J.A., Clapham, B., Brogan, A.P., Dickerson, T.J., Janda, K.D., 2005. Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408639102>
- Kim, S.J., Cho, A.R., Han, J., 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.060>
- Kleerebezem, M., 2004. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* 25, 1405–1414. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.10.021>
- 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*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>
- Lone, A., Anany, H., Hakeem, M., Aguis, L., Avdjian, A.-C., Bouget, M., Atashi, A., Brovko, L., Rochefort, D., Griffiths, M.W., 2016. Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 217, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.011>
- Maqueda, M., Galvez, A., Bueno, M., Sanchez-Barrena, M., Gonzalez, C., Albert, A., Rico, M., Valdivia, E., 2005. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Current Protein & Peptide Science*. 5, 399–416. <https://doi.org/10.2174/1389203043379567>
- Martínez, B., García, P., Rodríguez, A., 2019. Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.007>
- Misiou, O., van Nassau, T.J., Lenz, C.A., Vogel, R.F., 2018. The preservation of *Listeria* -critical foods by a combination of endolysin and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*. 266, 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.004>
- 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. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 13, 210–219. <https://doi.org/10.1159/000104750>
- Ordóñez Pereda, J.A., Cambero Rodríguez, M.I., Fernández Álvarez, L., García Sanz, M.L., García de Fernando Minguillón, G.D., de la Hoz Perales, L., Selgas Cortecero, M.D., 1998. Concepto y objetivos de la tecnología de los alimentos. En: *Tecnología de los alimentos*. 1, 13-22. Editorial: Síntesis S.A.
- Paul Ross, R., Morgan, S., Hill, C., 2002. Preservation and fermentation: Past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/S0168->

- Pisoschi, A.M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N.K., Mathe, E., 2017. An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 143, 922-935. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>
- Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M.E., Hentzer, M., Kristoffersen, P., Kôte, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M., 2005. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1799-1814.2005>
- Reading, N.C., Sperandio, V., 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 254, 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00001.x>
- Saltmarsh, M., Insall, L., 2013. Food additives and why they are used. En: *Essential guide to food additives*. 1–13. <https://doi.org/10.1039/9781849734981-00001>
- Santiago-Silva, P., Soares, N.F.F., Nóbrega, J.E., Júnior, M.A.W., Barbosa, K.B.F., Volp, A.C.P., Zerdas, E.R.M.A., Würllitzer, N.J., 2009. Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.02.006>
- Settanni, L., Corsetti, A., 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.09.001>
- Silva, C.C.G., Silva, S.P.M., Ribeiro, S.C., 2018. Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>
- Skariyachan, S., Govindarajan, S., 2019. Biopreservation potential of antimicrobial protein producing *Pediococcus* spp. towards selected food samples in comparison with chemical preservatives. *International Journal of Food Microbiology*. 291, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.12.002>
- Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 70, 331–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8879414>
- Todorov, S.D., de Melo Franco, B.D.G., Tagg, J.R., 2019. Bacteriocins of Gram-positive bacteria having activity spectra extending beyond closely-related species. *Beneficial Microbes*. <https://doi.org/10.3920/BM2018.0126>
- Tumbariski, Y., Lante, A., Krastanov, A., 2018. Immobilization of bacteriocins from lactic acid bacteria and possibilities for application in food biopreservation. *The Open Biotechnology Journal*. 12, 25–32. <https://doi.org/10.2174/1874070701812010025>
- Turovskiy, Y., Kashtanov, D., Paskhover, B., Chikindas, M.L., 2007. Quorum sensing: fact, fiction, and everything in between. *Advances in Applied Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)62007-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)62007-3)
- van Heel, A.J., de Jong, A., Montalbán-López, M., Kok, J., Kuipers, O.P., 2013. BAGEL3: automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Research*. 41, 448–453. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt391>
- Verma, S.K., Sood, S.K., Saini, R.K., Saini, N., 2017. Pediocin PA-1 containing fermented cheese whey reduces total viable count of raw buffalo (*Bubalis bubalus*) milk. *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.031>
- Weiland-Bräuer, N., Fischer, M.A., Pinnow, N., Schmitz, R.A., 2019. Potential role of host-

derived quorum quenching in modulating bacterial colonization in the moon jellyfish *Aurelia aurita*. *Scientific Reports*. 9, 34. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37321-z>

Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M.K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., Radusin, T., Suminska, P., Marcos, B., Coma, V., 2018. Active packaging applications for food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12322>