

Revisión

Péptidos antimicrobianos de organismos procaríotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos

RECIBIDO: 13/10/2013

ACEPTADO: 25/10/2013

Tonarelli, G.¹ • Simonetta, A.²

¹ Departamento Química Orgánica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo s/n. 3000, Santa Fe, Argentina. Teléfono: 0342-4575206 (int. 224).

² Dpto. de Ingeniería en Alimentos. Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral. Teléfono: 0342-4571164 (int. 2541).

E-mail: asimonet@fiq.unl.edu.ar

tonareli@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: El uso indiscriminado de los antibióticos ha llevado a un rápido aumento de la resistencia de los microorganismos a estos compuestos convencionales y, en consecuencia, existe la necesidad de desarrollar nuevos fármacos.

Los péptidos antimicrobianos son componentes evolutivamente conservados de la respuesta inmune innata, y están presentes en bacterias, plantas y animales vertebrados e invertebrados, y son considerados como una nueva fuente natural de agentes terapéuticos.

Por otra parte, las bacteriocinas han cobrado gran importancia debido a las posibilidades de su empleo en la biopreservación de alimentos, reemplazando a los conservantes químicos. Especial interés presentan las generadas por bacterias ácido

lácticas, dado que tanto éstas como sus productos metabólicos son seguros para su incorporación a diferentes matrices alimentarias.

En este artículo se presentan los aspectos más relevantes sobre biodiversidad, estructura y aplicaciones en tecnologías de alimentos y en clínica médica de los péptidos antimicrobianos, y se consideran sus principales ventajas y desventajas.

PALABRAS CLAVE: Péptidos antimicrobianos, Bacteriocinas, Agentes terapéuticos, Biopreservadores alimentarios.

SUMMARY: *Antimicrobial peptides of prokaryotic and eukaryotic organisms as therapeutic agents and food preservatives*
The widespread use of antibiotics has led to a rapid increase in the resistance of

microorganisms to conventional antibiotics, and therefore there is a need to develop new drugs. Antimicrobial peptides are evolutionarily conserved components of the innate immune response and are present in bacteria, plants, vertebrates and invertebrates, and are considered as a new natural source of therapeutic agents.

Moreover, bacteriocins have gained great importance due to their potential use in food biopreservation, replacing chemical preservatives. Of particular interest are

those generated by lactic acid bacteria, since they and their metabolic products are safe for incorporation into different food matrices. In this article we present the most relevant aspects of biodiversity, structure and applications in food technology and medical clinic of antimicrobial peptides, and their main advantages and disadvantages are considered.

KEYWORDS: Antimicrobial peptides, Bacteriocins, Therapeutic agents, Food Biopreservatives.

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la resistencia antimicrobiana es una de las amenazas más importantes para la salud humana, la cual surge por mutación del microorganismo o adquisición de genes de resistencia. Un alto porcentaje de infecciones hospitalarias se deben a bacterias muy resistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. El uso inadecuado de los antibióticos crea condiciones favorables a la aparición, propagación y persistencia de microorganismos resistentes (Organización Mundial de la Salud, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194>). Esto evidencia la necesidad de la búsqueda de nuevas opciones que permitan sustituir a los antibióticos convencionales.

Si bien se han desarrollado nuevas tecnologías para el descubrimiento de fármacos, la naturaleza sigue siendo el punto de partida más importante para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (1–3).

En particular, en el caso de los antimicrobianos sólo el 20% de los productos comer-

cializados son totalmente sintéticos, en otras palabras no fueron inspirados en productos naturales (4).

Los péptidos antimicrobianos (PAs) constituyen una característica universal de los sistemas de defensa de prácticamente todas las formas de vida y se han encontrado en diferentes organismos, desde bacterias, plantas, aves, peces, insectos, anfibios y mamíferos.

Estos compuestos contienen entre 12 y 50 aminoácidos, y no solamente destruyen diferentes bacterias, sino también varios hongos, parásitos y células cancerosas (5).

Son considerados importantes moléculas efectoras del sistema inmune innato, el cual es el principal mecanismo de defensa para la mayoría de los organismos vivos durante las etapas iniciales de una infección, y complementan al altamente específico sistema inmune adaptativo (6,7).

La expresión de los PAs puede ser constitutiva o puede ser inducida en respuesta a estímulos infecciosos y/o inflamatorios, tales como bacterias o moléculas presentes en esas bacterias que inducen la inmunidad

innata, como los lipopolisacáridos y las citoquinas proinflamatorias (8).

Como importantes moléculas efectoras del sistema inmune innato son capaces de aumentar la fagocitosis, estimular la liberación de prostaglandinas, neutralizar los efectos de los lipopolisacáridos (LPS) sépticos, promover el reclutamiento y la acumulación de diversas células inmunes en sitios inflamatorios, promover la angiogénesis e inducir la reparación de heridas (9–11).

Los PAs son polipéptidos codificados por genes y sintetizados en los ribosomas, algunos presentan aminoácidos modificados luego de la traducción. Esta definición los distingue de algunos péptidos antibióticos producidos por bacterias y hongos que son sintetizados mediante vías metabólicas específicas, y que generalmente incorporan aminoácidos no naturales en sus secuencias (12).

Poseen ciertas propiedades que los hacen particularmente atractivos, tales como su pequeño tamaño, rápida acción y pocas posibilidades de desarrollar resistencia. Por este motivo, las investigaciones sobre los PAs se ha incrementado notablemente en los años recientes.

No obstante, solamente algunos pocos PAs han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration, USA). Por tal motivo, existe la necesidad de desarrollar estrategias para identificar nuevos PAs que podrían tener aplicaciones terapéuticas.

Pero además de los aspectos farmacológicos y terapéuticos hasta aquí explicados, otro aspecto que ha sido tenido en cuenta en las últimas décadas es el relativo a la biopreservación alimentaria, o sea, la sustitución total o parcial de los conservantes químicos usados tradicionalmente por compuestos antimicrobianos de origen bio-

lógico, a fin de lograr alimentos que sean percibidos como más “naturales”.

Desde este punto de vista han cobrado gran interés unos PAs en particular, los producidos por bacterias y conocidos como bacteriocinas. Éstas se definen como péptidos bioactivos, simples o complejos, sintetizados ribosomalmente y que ejercen su acción de modo extracelular, inhibiendo típicamente el crecimiento de bacterias próximas desde el punto de vista taxonómico (aunque esta característica descripta originalmente no siempre es tan estricta) (13–17). Entre las muchas bacteriocinas caracterizadas, la atención se ha centrado especialmente en las producidas por las bacterias del ácido láctico, en función del *status* de GRAS (generalmente reconocidas como seguras para su incorporación en alimentos de consumo humano) otorgado a este amplio grupo bacteriano por la Organización Mundial de la Salud.

Algunas de estas sustancias han demostrado poseer un amplio espectro de acción antibacteriana, incluyendo a especies alteradoras de los alimentos o causantes de enfermedades de transmisión alimentaria, tales como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium sporogenes*, etc. (15,18–20). Hoy se puede afirmar que en todos los géneros que constituyen el núcleo central del gran grupo bacteriano designado bajo el nombre de bacterias ácido lácticas, tales como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus* y *Pediococcus*, se han detectado cepas productoras de algunas de las muchas bacteriocinas caracterizadas hasta el presente (15–17, 20,21).

Sin embargo, en la actualidad solamente nisina, una bacteriocina producida por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ha sido aceptada como segura para uso alimentario por la FAO/WHO, y más tarde agregada a la lista europea de aditivos alimentarios y también aprobada para uso alimentario por la FDA.

Dada la relevancia que han tenido las investigaciones sobre los PAs en las dos últimas décadas, en este artículo se presentan, entre otros, aspectos básicos de la química y estructura de estas moléculas, conocimientos que son necesarios para poder interpretar sus mecanismos de acción.

Fuentes naturales

Desde que los primeros PAs, tales como cecropinas (22), PGLa (23) y magaininas (24) fueron identificados en insectos y anfibios en la década del 80, hasta la actualidad, se han identificado más de 1200 secuencias de péptidos antimicrobianos procedentes de diferentes fuentes naturales, de acuerdo a datos reportados en la base de datos "Antimicrobial Peptide Database" (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) de la Universidad de Nebraska Medical Center, en Omaha (USA).

En los vertebrados los PAs se localizan en sitios donde comúnmente se encuentran los agentes patógenos, tales como las superficies mucosas y la piel, así como dentro de los gránulos de las células inmunes (11).

Considerando a las bacterias como fuentes naturales de PAs, las primeras bacteriocinas fueron descubiertas en 1925, y las producidas por bacterias ácido lácticas comenzaron a estudiarse en 1928 (25). Sin

embargo, el mayor interés científico-tecnológico por ellas data de la década del 70, incrementándose notablemente desde los 90 hasta hoy, por su valor potencial como biopreservadores alimentarios. La bacteriocina descubierta en 1928 era nisina, que sigue siendo la única aceptada como segura para uso alimentario.

En las últimas décadas se han descrito cientos de bacteriocinas producidas por cepas de distintas especies y subespecies de bacterias ácido lácticas, y se han caracterizado algunas de ellas, que son las que resultaron más promisorias desde el punto de vista tecnológico alimentario. Entre éstas se encuentra, por ejemplo, pediocina PA1, que se comercializa en forma de fermentados que la contienen y que, como tales, se usan en industrias de alimentos con fines de biopreservación (16,17, 26). Al no tratarse de compuestos puros sino de fermentados, no son considerados como aditivos alimentarios y por lo tanto no necesitan la autorización para su empleo de los organismos nacionales o internacionales de control alimentario.

Clasificación de los PAs en función de la composición en aminoácidos

- *Péptidos aniónicos*: representan una parte importante del sistema inmune de vertebrados, invertebrados y plantas. Son activos contra bacterias, hongos, virus y plagas como los insectos. La carga neta varía entre -1 y -7, contienen entre 5 y 70 aminoácidos, y en varios de ellos aparecen modificaciones postraduccionales que parecen ser esenciales para la actividad antimicrobiana. Contienen ácido glutámico (Glu) y aspártico (Asp) y han sido aislados de ovinos, bovinos y humanos.

La estructura de algunos péptidos aniónicos aislados de anfibios es helicoidal y lineal, mientras que otros aislados de plantas son cíclicos, y con varios residuos de cisteína. Algunos parecen utilizar iones metálicos para formar puentes salinos catiónicos con los componentes cargados negativamente de las membranas microbianas. No obstante, en muchos casos el mecanismo de acción de estos péptidos no es claro o no ha sido dilucidado (27).

- *Péptidos catiónicos*: la mayoría de los péptidos antimicrobianos son catiónicos. La carga neta varía entre +2 y +9, poseen en general un alto número de residuos de lisina (Lys), arginina (Arg) y /o histidina (His) y pocos o ningún residuo ácido, tales como Glu o Asp. Los residuos hidrofóbicos como triptófano (Trp), fenilalanina (Phe), leucina (Leu), valina (Val) y otros representan entre el 30–50 % del total de la secuencia del péptido y desempeñan un rol fundamental permitiendo la formación de una estructura anfipática, cuando interactúan con las membranas.

Un análisis de la composición de péptidos antimicrobianos aislados de bacterias, plantas, insectos y anfibios anuros ha demostrado que existen aminoácidos que aparecen con mayor frecuencia. De este modo, alanina (Ala) y glicina (Gly) son los más abundantes en péptidos de origen bacteriano, cisteína (Cys) y Gly son más comunes en péptidos de plantas, Ala, Gly y Lys se encuentran frecuentemente en péptidos de insecto, y Leu, Ala, Gly y Lys aparecen en mayor proporción en péptidos de anfibios. En contraste, metionina (Met) aparece raramente (<1,5 %) y Lys aparece en mayor proporción que Arg (28). Esta distribución de aminoácidos aporta también

información estructural, ya que la abundancia de Cys en péptidos de plantas sugiere que los puentes disulfuro son comunes, y los residuos que predominan en los péptidos de anfibios anuros se correlacionan con la tendencia de estos polipéptidos de adoptar estructuras α -helicoidales.

- *Péptidos con alto contenido en aminoácidos específicos*:

Péptidos enriquecidos en prolina: poseen un alto contenido en prolina (Pro), con residuos como Arg que los hacen catiónicos y actúan sin producir cambios extensos en la membrana, y son activos particularmente hacia bacterias Gram (-).

Por el hecho de haberse demostrado que penetran en las células bacterianas mediante translocación a través de la misma, es que se estima que actúan inhibiendo un blanco intracelular específico, más que produciendo la disrupción de la membrana.

La catelicidina Bac7 es un péptido antibacteriano rico en Pro, que fue aislado de los neutrófilos bovinos, exhibe una fuerte actividad inhibitoria frente a bacterias Gram (-), neutraliza endotoxinas y no es tóxico hacia células de mamíferos, aún en altas concentraciones. Diferentes estudios han sugerido que el modo de acción depende de la concentración, ya que a bajas concentraciones Bac7 inactiva las bacterias por un mecanismo no lítico, siendo incorporada dentro de la célula donde se une a un blanco intracelular, mientras que a elevadas concentraciones tiene un mecanismo membranolítico. Péptidos relacionados incluyen Bac 5 y PR-39, aislados de neutrófilos bovinos y porcinos, respectivamente, y otros aislados de oveja y cabra (29, 30).

Ejemplos de péptidos antimicrobianos enriquecidos en prolina procedentes de insectos incluyen apidaecina aislada de líquido linfático de abejas (*Apis mellifera*) infectadas con bacterias, drosocina aislada de *Drosophila melanogaster* y pirrocoricina aislada del insecto hemíptero *Pyrrhocoris apterus*. Las investigaciones sugieren que estos péptidos actúan inhibiendo procesos metabólicos tales como la síntesis de proteínas o el plegamiento de proteínas asistido por chaperonas (31–35).

- Péptidos enriquecidos en triptófano y arginina: constituyen una subclase importante de péptidos antimicrobianos. El triptófano (Trp) tiene preferencia por la región de la interfase de las bicapas lipídicas y arginina (Arg) es catiónico y puede formar puentes de hidrógeno necesarios para interactuar con los fosfolípidos aniónicos, componentes abundantes de las membranas bacterianas. En combinación, estos dos aminoácidos participan de interacciones catión- π , lo cual favorece las interacciones con membranas.

Entre algunos ejemplos se encuentra indolicidina, un péptido rico en Trp, de tamaño pequeño (13 residuos aminoácidos) y que está amidado en el extremo C- terminal. Contiene 39 % de Trp en su secuencia. Se encuentra en los neutrófilos bovinos (36).

Otros ejemplos de péptidos ricos en triptófano incluyen tripticina aislada de gránulos de neutrófilos porcinos, y puroindolina aislada del endosperma de trigo (37,38).

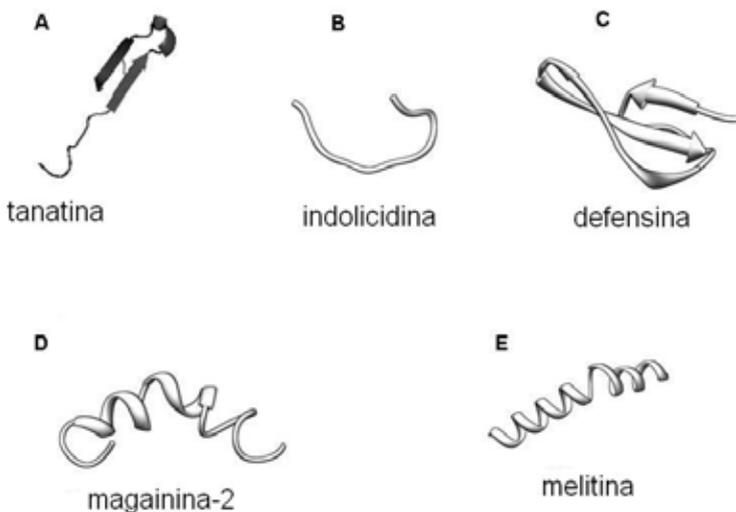
Péptidos enriquecidos en histidina: las histatinas son un grupo de péptidos pequeños, ricos en histidina y secretados en la saliva por las glándulas parótida y submandibular–sublingual. Histatina 1 e histatina 3 son codificadas por genes distintos, mientras que se cree que al menos otros 50 péptidos de histatina que fueron aislados a partir de la saliva surgen por un procesamiento proteolítico postranslacional (39).

Las histatinas exhiben potente actividad antifúngica contra especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans*. Dentro de éstas histatina 5 contiene 24 aminoácidos y es la más activa frente a *Candida albicans*. Los pacientes HIV-positivos tienen niveles considerablemente menores de histatina 5, lo cual sugiere que la expresión reducida de estos péptidos de defensa del huésped puede contribuir a una mayor predisposición de esta población a la candidiasis oral (40, 41).

Clasificación de péptidos antimicrobianos en base a la estructura

En esta sección se describen algunos ejemplos de PAs lineales y cíclicos que presentan estructura secundaria tipo helicoidal, lámina β o giro β (β turn), y que fueron seleccionados por su relevancia. Ya se han mostrado ejemplos de péptidos que no presentan estructura secundaria definida, y son aquellos donde predominan aminoácidos específicos tales como Arg, Pro y Trp. En la Figura 1 se muestran ejemplos de péptidos antimicrobianos con diferentes tipos de estructura.

Figura 1. Clases estructurales de péptidos antimicrobianos



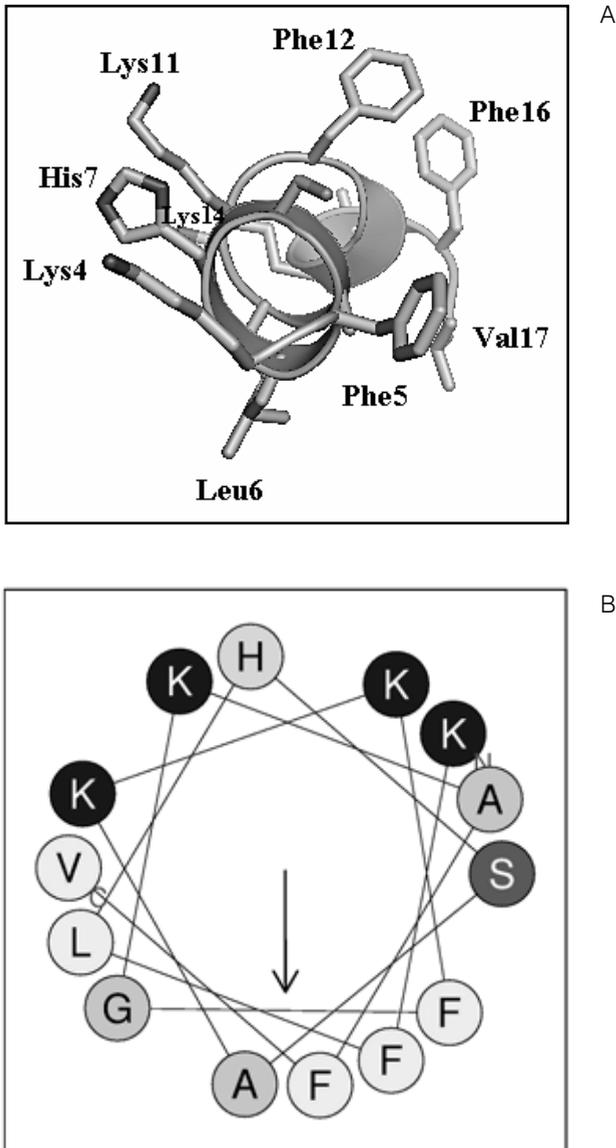
A: Estructura de tipo horquilla beta de tanatina (código PDB: 8TFV), contiene un puente disulfuro entre C11 y C18; B: Estructura extendida de indolicidina (código PDB: 1G8C); C: estructura tipo lámina β de defensina HNP-3 (código PDB: 1dfn). D: estructura helicoidal de magainina 2 (código PDB: 2lsa); E: estructura helicoidal de melitina (código PDB: 2mlt). Las figuras fueron preparadas empleando los programas gráficos UCSF Chimera 1.5.3. y Pymol 1.10.

• Péptidos antimicrobianos α -helicoidales lineales

Un número muy relevante de péptidos α -helicoidales lineales han sido aislados de las glándulas granulares de la piel y de la mucosa del estómago de varios anuros (ranas y sapos). La caracterización estructural de los péptidos de anuros ha mostrado que tienen entre 10 y 48 aminoácidos, y una comparación de sus secuencias revela la falta de dominios conservados que estén asociados con la actividad biológica. Estudios de las secreciones de la piel de anuros de Sudamérica y de Australia, pertenecientes a la familia Hylidae, y de América del Norte y Euroasia, pertenecientes a la familia Ranidae han probado ser fuentes abundantes de PAs (42, 43).

Las magaininas aisladas de las secreciones de la piel del *Xenopus laevis* constituyen el prototipo de los péptidos antimicrobianos helicoidales de anfibios (44). En la Figura 2 se muestra la estructura de la región 4–17 de magainina-2, donde se puede observar la naturaleza anfipática de la región helicoidal. Desde este primer reporte, numerosos péptidos α -helicoidales aislados de otros anfibios han sido documentados, tales como las bombininas, dermaseptinas, caerinas, maculatinas, aureinas, temporinas, etc. Las bombininas se encuentran en el género *Bombina*, mientras que las dermaseptinas fueron aisladas de especies del género *Phyllomedusa* (45, 46).

Figura 2. Estructura anfipática de magainina-2



La figura 2A muestra la estructura de la región 4-17 de magainina-2 (K4FLHSAKKFGKAF16), donde se pueden observar las caras hidrofílica e hidrofóbica de la α -hélice anfipática. Momento hidrofóbico (μM : 0,558). La estructura fue obtenida del pdb: 2lsa y la representación se realizó con el software Pymol versión 1.10. La figura 2B es una representación de la misma región como rueda helicoidal, realizada por medio del servidor web Heliquist (heliquist.ipmc.cnrs.fr/).

Los mamíferos producen catelicidinas, las que se caracterizan por tener un dominio N-terminal común y conservado (catelina) y un dominio C-terminal antimicrobiano variable que puede liberarse de la proteína precursora luego de su ruptura por proteinasas. Los humanos tienen solamente un gen de catelicidina, mientras que en otros mamíferos se han encontrado múltiples genes de catelicidina, tales como en los cerdos que producen PR-39 y protegrinas, y en los bovinos y otros rumiantes que producen indolicinas y bacterenecinas (47).

LL-37 es la parte C-terminal de la única catelicidina humana identificada hasta el momento, y se la conoce como proteína antimicrobiana catiónica humana (hCAP18), la cual es expresada principalmente por los neutrófilos y las células epiteliales. Es una molécula multifuncional que puede mediar varias respuestas del huésped, incluyendo acción bactericida, quimiotaxis, angiogénesis, favorecimiento de la cicatrización de heridas epiteliales y activación de la secreción de quimiocinas. Se considera que hCAP18/LL-37 es un componente importante en la respuesta inmune antimicrobiana (48). La estructura de LL-37 en micelas de dodecilsulfato de sodio (SDS) consiste en una hélice anfipática curvada que se extiende entre los residuos 2-31, seguida de una región C-terminal desordenada (49).

Un pentadecapéptido interno (residuos 98-112) de la lisozima de huevo de gallina que se obtiene después de la digestión con clostripaína posee un amplio espectro de actividad antimicrobiana *in vitro*. De interés particular es el hecho de que el pentadecapéptido tiene un motivo estructural del tipo hélice-loop-hélice (HLH) (residuos 88-114

y 87-115 de la lisozima de gallina y humana, respectivamente) situado en el labio superior de la hendidura del sitio activo de la molécula. Las estructuras tipo horquilla de hélices, tales como las observadas en las lisozimas se encuentran comúnmente en las proteínas bactericidas y citolíticas formadoras de poros (50).

• Péptidos antimicrobianos con estructura cíclica

Los péptidos que contienen residuos de cisteína pueden formar puentes disulfuro intramoleculares dando lugar a moléculas cíclicas. En la mayoría de los casos la conformación que adoptan estas moléculas está relacionada con la actividad biológica específica.

Estructuras con un puente disulfuro

Entre los PAs que contienen sólo un puente disulfuro se encuentra la bacterenecina, péptido catiónico que contiene 12 aminoácidos y que fue aislado de los neutrófilos bovinos. Estudios conformacionales han demostrado que bacterenecina presenta una estructura β -turn tipo I, mientras que su forma reducida y lineal adopta diferentes conformaciones, de acuerdo con la lipofili-cidad del ambiente en que se estudia. Este péptido en su forma cíclica es más activo contra bacterias Gram (-) como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium* que la forma lineal, reducida. Pero los péptidos lineales muestran actividad hacia bacterias Gram (+) como *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococcus faecalis* (51).

Numerosos péptidos aislados de la piel de especies de anfibios del género *Rana*

presentan un loop cíclico sobre el extremo C-terminal, formado por 6 ó 7 aminoácidos (conocido como Rana Box). No obstante, el rol de este motivo estructural altamente conservado no se conoce exactamente. Tanto para ranalexina (52) como para gauregina 4 (53) el puente disulfuro no es crítico para inducir la actividad formadora de poros, mientras que para gauregina 5 (54) el puente disulfuro es relevante para su actividad. En cambio para esculentina-1b, que presenta también un loop cíclico similar (CKIKGEC), se ha determinado que la actividad se centra en el fragmento 1-18, de naturaleza catiónica y alfa-helicoidal (55).

Entre los péptidos antimicrobianos con estructura β que son fragmentos de proteínas se destaca la lactoferrina bovina (LfcinB). Este péptido se libera por digestión con pepsina a partir de la lactoferrina, una glicoproteína de 80 kDa que se une al hierro y que tiene funciones inmunológicas importantes. Lfcin contiene 25 aminoácidos y un puente disulfuro. La estructura de LfcinB fue determinada por RMN demostrándose que consiste en una lámina β antiparalela (56). Posee actividad antibacteriana y antifúngica, y además actividad antiviral y antitumoral. Estudios realizados con análogos de LfcinB han evidenciado que los residuos de Arg, conjuntamente con los de Trp son esenciales para la actividad, mientras que el puente disulfuro no resulta indispensable para su actividad antimicrobiana (57,58). El

centro activo de LfcinB es un hexapéptido que cubre la región 4 a 9. Este péptido tiene actividad antimicrobiana similar al péptido de 25 residuos aminoacídicos (59).

Estructuras con varios puentes disulfuro

Las defensinas se han identificado en mamíferos, incluyendo humanos. Contienen entre 29 y 34 aminoácidos, son catiónicos y abundantes en los epitelios y en los gránulos de las células fagocitarias. Poseen una estructura de lámina β y están estabilizadas por tres puentes disulfuro intramoleculares altamente conservados. De acuerdo a la organización de los tres puentes disulfuro se las divide en α y β -defensinas. Las α -defensinas son producidas principalmente por los granulocitos neutrófilos y las células de Paneth en el tracto intestinal (HNPs, péptidos de neutrófilos humanos). HNP-1, HNP-2 y HNP-3 son altamente homólogas y difieren solamente en el residuo N-terminal. Por otra parte, las β -defensinas son producidas particularmente por los tejidos epiteliales, tales como la piel, y las mucosas de los tractos respiratorios, gastrointestinal y urogenital (hBDs, β -defensinas humanas) (60, 61).

En la Tabla 1 se presentan ejemplos de péptidos antimicrobianos producidos por bacterias y animales vertebrados e invertebrados, incluyendo las secuencias y el tipo de estructura secundaria predominante.

Tabla 1. Ejemplos de péptidos antimicrobianos aislados de fuentes naturales

| Identificación | Secuencia | Origen | Características estructurales |
|---------------------------|--|----------------------------|----------------------------------|
| Sakacina P | KYYGNGVHCCKHSCTVDWGTAIGNIGNINAANWATGG-NAGWNK | bacterias ácido lácticas | α -helicoidal-lineal |
| Cecropina A | KWKLFKIEKVGONIFDGIKAGPAVAVVGOATQIAK | mariposa de la seda | α -helicoidal-lineal |
| Dermaseptina s1 | ALWKTMLKKLGMTALHAGKKAALGAAADTISQGTQ | anfibio | α -helicoidal-lineal |
| Magainina 1 | GIGKFLHSAGKFGKAFVGMWMS | anfibio | α -helicoidal-lineal |
| Magainina-2 | GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS | anfibio | α -helicoidal-lineal |
| Buforina I | AGRKQGGKVRAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHLLRKGNY | anfibio | α -helicoidal-lineal |
| Buforina II | TRSSRAGLQFPVGRVHLLRKR | anfibio | α -helicoidal-lineal |
| Brevenina IE | FLP LLAGLAANFLPKIFCKITRC | anfibio | turn-cíclico, 1 puente disulfuro |
| Melitina | GIGAVLKVLTTLGLPALISWIKRKRQ | insecto | α -helicoidal-lineal |
| Pirrocoricina | VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN | insecto | extendida, rico en prolina |
| Tanatina | GSKKVPPIYCNRRRTGKCCQM | insecto | loop-cíclico |
| Bactenecina | RLCRWIRVCR | bovino | cíclico, 1 puente disulfuro |
| Protegrina 1 | RGGRLCYRR RFCVCVGRX | porcino | beta, cíclico, 2 puentes S-S |
| Lactoferricina B | FKCRRWQWRMCKLGAPSITCVRRAF | fragmento de lacto-ferrina | α -helicoidal |
| catelicidina LL37 | LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLRPRTES | humano | α -helicoidal-lineal |
| Indolicidina | ILPWKWPWWPWRR | bovino | extendida-rico en Tip |
| α -defensina PR-39 | DCYCRIPACIAGERRYGTCIYQGRLLWAFCC | humano | tres puentes S-S |
| histatina 5 | RRRPPPYLPRPPPPFPPLPPRIPGFPFRFPFRFP | porcino | rico en Arg y Pro |
| | DSHAKRHGGYKRKFKHEKHHSHRGY | humano | lineal, rico en His |

Especificidad y selectividad de los péptidos antimicrobianos

Las mayores limitaciones para convertir PAs en fármacos son los altos costos de su producción en gran escala, la toxicidad y la susceptibilidad a la degradación proteolítica.

Las membranas microbianas están enriquecidas en lípidos aniónicos, mientras que las membranas de las células de mamíferos generalmente contienen menor cantidad de lípidos aniónicos y poseen colesterol, que tiene un efecto estabilizante sobre la bicapa

lipídica, lo que podría explicar la selectividad de los PAs hacia las células de mamíferos, conjuntamente con otros factores.

Estudios realizados con péptidos helicoidales modelos han demostrado que un incremento en la cationicidad promueve la actividad antimicrobiana mientras que un aumento en la hidrofobicidad, helicidad y anfipaticidad favorece la actividad hemolítica y la pérdida de selectividad hacia las membranas de los microorganismos (62).

Mecanismo de acción

• Interacción con membranas

A pesar de las diferencias estructurales, muchos PAs comparten ciertas características en sus secuencias, como tener carga neta positiva y aproximadamente un 50 % de aminoácidos hidrofóbicos, lo cual les permite plegarse en conformaciones anfipáticas luego de interactuar con las membranas bacterianas (ver Figura 2).

La interacción y la permeabilización de las membranas de los microorganismos es un hecho común a un gran número de péptidos antimicrobianos. Dado que esta interacción no implica la unión a un receptor específico, los PAs son comúnmente activos contra microorganismos resistentes a los antibióticos convencionales, debido a su diferente modo de acción.

Actualmente existen varios modelos que permiten explicar el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. En este artículo solamente haremos mención a los más conocidos (ver Figura 3). En el modelo de alfombra (*carpet model*) los péptidos actúan en forma similar a un detergente, cubriendo la superficie de la célula hasta que se alcanza una concentración umbral que lleva a la disrupción de la membrana, como consecuencia de cambios en la flui-

dez por el desplazamiento de los fosfolípidos. Se ha demostrado que este mecanismo aparece en PAs helicoidales que son selectivos hacia las membranas de los microorganismos (63, 64). Algunas bacteriocinas helicoidales actúan por este mecanismo, tales como Pln149a, producida por una cepa de *Lactobacillus plantarum* (65).

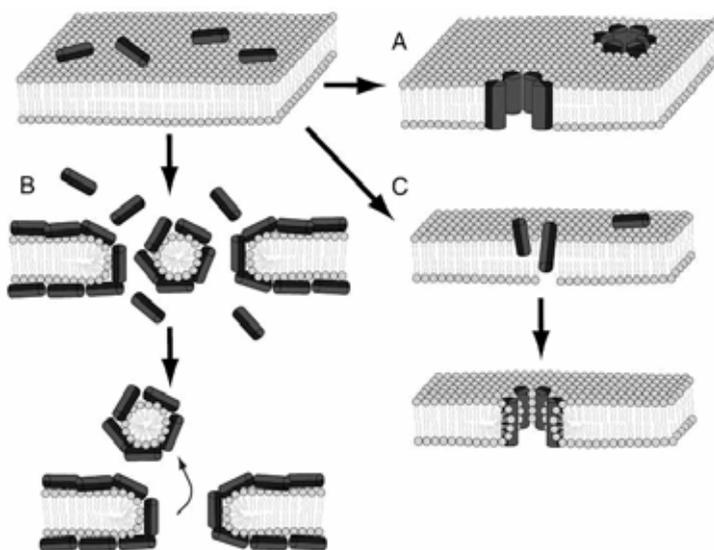
El segundo mecanismo es el modelo de duela de barril (*barrel-stave*) donde las hélices anfipáticas se agrupan y agregan formando poros de transmembrana con los residuos hidrofílicos mirando hacia la luz del poro, mientras que las superficies hidrofóbicas interaccionan con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos. De este modo se forma un canal acuoso. Se ha demostrado que las ceratotoxinas, péptidos alfa-helicoidales y catiónicos aislados de *Ceratitis capitata* (mosca de la fruta) y el péptido Ctx-Ha aislado de *Hypsiboas albopunctatus*, que presenta similitud en su secuencia con las ceratotoxinas, actúan por este mecanismo (66, 67). Se considera que PAs helicoidales con propiedades citolíticas frente a las membranas bacterianas y de mamíferos actúan por este mecanismo (68).

En el modelo de poro toroidal (*toroidal pore*), los péptidos se agregan sobre la superficie de la membrana llevando a que ésta se doble continuamente de modo que las monocapas de lípidos involucrados adquieren una curvatura positiva. A través del poro tanto los péptidos insertados como los grupos polares aniónicos de los fosfolípidos se asocian (69). Se ha determinado que las actividades de magainina-2 y aureína-3,3 transcurren a través de la formación de poros toroidales (70).

Por otra parte, muchos de los péptidos con estructura tipo lámina- β , como β -defensinas y protegrina, que están esta-

bilizados por puentes disulfuro y forman estructuras relativamente rígidas, ejercen su actividad antimicrobiana insertándose en la bicapa lipídica formando poros toroidales.

Figura 3. Mecanismos de acción de péptidos que interaccionan con membranas



La fig.3 muestra los tres mecanismos de acción más comunes descritos para péptidos que interaccionan con membranas. (A) modelo duela de barril; (B) modelo alfombra; (C) modelo poro toroidal. La figura fue adaptada del trabajo publicado por Chan et al., 2006 (64). La parte en negro de los cilindros representa la región hidrofílica de los péptidos y la parte en gris la región hidrofóbica.

• Acción sobre blancos intracelulares

Además de la habilidad para interaccionar con las membranas, existen evidencias que indican que los péptidos antimicrobianos pueden tener blancos intracelulares. En este sentido, se pueden unir al ADN, al ARN y a proteínas, inhibir la síntesis de la pared celular, y la síntesis de los ácidos nucleicos o de proteínas.

Se ha demostrado que muchos péptidos con estructuras extendidas, enriquecidos en aminoácidos específicos pueden pasar a través de la membrana citoplasmática sin alterarla. Varios péptidos lineales enriquecidos en arginina y/o prolina han sido

evaluados como péptidos que penetran en las células (*cell penetrating peptides*, CPP), resultando este hecho de gran interés actual, por su relación con los sistemas de liberación de fármacos. Los CPP más frecuentemente usados son poliargininas, Tat, penetratina y péptidos derivados de calcitonina, entre otros (71, 72).

Buforina I es un PA de 39 aminoácidos que fue aislado del tejido estomacal del *Bufo bufo gargarizans*. Se ha demostrado que el mecanismo de acción de buforina II, un péptido de 21 aminoácidos derivado de buforina I consiste en inhibir las funciones celulares mediante su unión al ADN y

al ARN de las células, luego de penetrar las membranas, lo cual resulta en una rápida muerte celular. El mecanismo es diferente al de magainina 2 a pesar de que poseen estructuras helicoidales anfipáticas lineales similares (73, 74).

Estudios peptidómicos para la identificación de péptidos antimicrobianos naturales

Tal como ha sido comentado en párrafos anteriores, los péptidos antimicrobianos han sido aislados de diversos organismos. No obstante, estas moléculas generalmente se encuentran en muy baja concentración, dificultando los procedimientos de aislamiento e identificación.

Tradicionalmente, la secuencia de nuevos péptidos se ha determinado por el método químico conocido como Degradación de Edman. El avance en nuevas tecnologías ha llevado a la incorporación de técnicas de Espectrometría de Masas para el secuenciamiento de péptidos.

El conocimiento de la secuencia de aminoácidos de los PAs permite realizar su síntesis química y de este modo disponer de suficiente cantidad de péptido para realizar diferentes estudios. En analogía con la tecnología proteómica, donde todas las proteínas expresadas en una célula o tejido son analizadas, los estudios peptidómicos tienen como objetivo la simultánea visualización e identificación del peptidoma completo de una célula o tejido (75).

Estudios con membranas modelo

Debido a la complejidad estructural de la membrana citoplasmática de las células reales, los estudios de las interacciones péptido–membrana se realizan utilizando sistemas modelos tales como liposomas

y micelas. Estudios espectroscópicos por fluorescencia, dicroísmo circular y ensayos colorimétricos realizados en sistemas modelos como los mencionados, permiten investigar la contribución de parámetros fisicoquímicos y estructurales sobre las interacciones péptido–membrana y sobre las actividades biológicas de los péptidos (76, 77).

Recientemente hemos reportado un estudio sobre la interacción de péptidos modificados de Pln149a, un análogo sintético de la bacteriocina plantaricina 149, empleando vesículas de PDA (polidiacetileno)–fosfolípidos en un bioensayo colorimétrico. Mediante estos ensayos se ha observado una buena correlación entre los estudios de interacción de estos péptidos con las vesículas y los resultados de los ensayos biológicos, relativos a actividad antimicrobiana y hemólisis de glóbulos rojos humanos (78).

Diseño de péptidos antimicrobianos y de miméticos

Como candidatos a nuevos fármacos, los PAs presentan algunas desventajas, además de su poca selectividad (comparada con los antibióticos convencionales). Entre estas desventajas se incluyen la reducida actividad en presencia de sales y de cationes divalentes (79), así como la susceptibilidad a los cambios de pH, a las proteasas y a otros componentes del plasma (80, 81).

En función de estas limitaciones, existe una clara necesidad de desarrollar estrategias alternativas, en particular para su uso como agentes terapéuticos sistémicos.

El punto de partida para el desarrollo de un nuevo fármaco generalmente es la identificación de péptidos naturales activos, y la posterior modificación y optimización de las secuencias. Comprender las relaciones que existen entre la estructura y la actividad de

los PAs es esencial para el diseño y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, con mejores propiedades. Las actuales tendencias se orientan al diseño de moléculas más pequeñas que contienen el fármaco antimicrobiano de los PAs naturales. El objetivo es diseñar nuevas moléculas con alta especificidad hacia las membranas de las células procariotas, pero mínima toxicidad hacia las membranas de eucariotas.

El diseño de nuevas moléculas suele incluir la aplicación de metodologías propias de la química combinatoria, mediante la cual se pueden sintetizar cientos de moléculas a fin de evaluar, por ejemplo, el efecto de la sustitución de aminoácidos sobre la actividad antimicrobiana y/o la selectividad hacia membranas (82).

Estas nuevas moléculas pueden contener aminoácidos no naturales en sus secuencias, tales como D-aminoácidos, β -aminoácidos, N-metil-aminoácidos y fluor-aminoácidos, o bien la estructura conformacional puede ser modificada por ciclización, con el objetivo de mejorar la estabilidad frente a las proteasas o la interacción con las membranas de los microorganismos.

Los peptidomiméticos son secuencias oligoméricas diseñadas para imitar una estructura y/o función peptídica, cuyo esqueleto no sólo se basa en α -aminoácidos. Dentro de éstos, los peptoides son poliglicinas N-sustituidas, que difieren de los péptidos solamente en que las cadenas laterales del peptoide están unidas al N amídico del esqueleto, en lugar de estarlo a los carbonos α , lo que le otorga resistencia a proteasas.

Se ha observado que peptoides miméticos de magainina-2 presentan estructura helicoidal anfipática y son selectivos y potentes antibacterianos contra bacterias

Gram (+) y Gram (-) (83). Trabajos recientes han evidenciado que ciertos peptoides podrían ser usados para prevenir la formación de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (84).

Varios grupos han diseñado β -péptidos construidos a partir de β -aminoácidos (con un grupo metileno adicional en su estructura base, en relación a los α -aminoácidos) los cuales mantienen la arquitectura anfipática (85). Los β -péptidos y los peptoides son significativamente resistentes a las proteasas, lo cual les otorga importantes ventajas respecto de los péptidos α -helicoidales. No obstante son relativamente difíciles de sintetizar y más caros para producir en grandes cantidades (86).

Los oligómeros de tipo arilamida son otra clase de moléculas anfifílicas que fueron diseñadas con la ayuda de simulaciones por dinámica molecular, y que exhiben un amplio espectro de actividad antimicrobiana, con un mecanismo de acción que se asemeja al de los péptidos antimicrobianos nativos (87).

Los lipopéptidos son péptidos modificados por conjugación con ácidos grasos de diferentes longitudes. Se ha reportado que la unión de ácidos grasos a D,L-tetrapéptidos inertes por sí mismos, los transforma en compuestos antimicrobianos muy potentes hacia varios microorganismos, incluyendo cepas resistentes a los antibióticos convencionales (88).

Para mayor información sobre síntesis de peptidomiméticos y aplicaciones se sugiere consultar la bibliografía específica que se cita (89-92).

Bacteriocinas

Las bacteriocinas han sido definidas como péptidos bioactivos, simples o com-

plejos, sintetizados ribosomalmente y que ejercen su acción de modo extracelular, inhibiendo típicamente el crecimiento de bacterias próximas desde el punto de vista taxonómico. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado la existencia de bacteriocinas que impiden la proliferación de otras bacterias Gram (+) no relacionadas estrechamente desde un punto de vista taxonómico con la cepa productora (13–15, 18, 93–96), como así también de algunas especies de bacterias Gram (-) (13, 15–17, 20, 94, 95, 97–102).

Las primeras bacteriocinas descritas fueron las colicinas (1925), producidas por cepas de *Escherichia coli*. Las producidas por bacterias ácido lácticas comenzaron a estudiarse en 1928 (25), pero el mayor interés científico–tecnológico por ellas data de la década del 70, incrementándose notablemente desde los 90 hasta hoy, por su valor potencial como biopreservadores alimentarios. Esto es debido fundamentalmente a que este grupo bacteriano ha recibido el *status* de bacterias “seguras” o GRAS.

La bacteriocina descubierta en 1928 era nisina, producida por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. En 1969 fue aceptada como segura para uso alimentario por la FAO/WHO y más tarde fue agregada a la lista europea de aditivos alimentarios, con la denominación E324, y también aprobada para uso alimentario por la FDA.

Como resultado del notable interés suscitado en el campo de la investigación científico–tecnológica por este aspecto de las bacterias lácticas, se han descrito cientos de bacteriocinas producidas por cepas seleccionadas de diversos orígenes (alimentos fermentados, materias primas alimentarias, medio ambiente, starters artesanales

y comerciales, intestinos de animales, etc.) (13–15, 19, 20, 95, 97, 99, 103–115).

Como ejemplos más notables se pueden citar nisina y lacticina 3147, ambas generadas por cepas del género *Lactococcus*; los beneficios del uso de las cepas productoras de estas dos bacteriocinas en la manufactura de quesos son destacados y han sido muy bien documentados (116, 117). De manera similar, pediocina PA1, producida por *Pediococcus acidilactici*, ha sido utilizada en la elaboración de embutidos secos fermentados (26), y muchas bacteriocinas producidas por *Lactobacillus* han sido empleadas en la producción de embutidos y de aceitunas fermentadas (118–120). Nisina sigue siendo hasta hoy la única bacteriocina aprobada para ser usada como biopreservador alimentario, a pesar de lo cual productos comerciales conteniendo pediocina PA1 y otros fermentados, son empleados actualmente por la industria alimentaria (16, 17).

Dado que algunas de estas sustancias han demostrado poseer un amplio espectro antibacteriano contra especies patógenas o alterantes de alimentos, sumado a que son generalmente inocuas para el consumidor, pueden ser hidrolizadas en el tracto intestinal humano, son resistentes al calentamiento, activas a pH bajo, resistentes a la acción de algunas enzimas y estables en los alimentos, hace que las mismas presenten un gran interés para su utilización como “biopreservadores naturales” en la industria alimentaria. Además, se ha tenido especialmente en cuenta el hecho de que, tanto las bacterias lácticas como los productos de su metabolismo, han sido consumidos desde tiempos inmemoriales a través de la ingesta de alimentos fermentados, asociándose los sólo muy raramente a procesos patológicos (15, 18–20).

La producción de bacteriocinas por bacterias lácticas es un factor importante en la acción inhibitoria frente a microorganismos indeseables, ya sean alteradores o agentes etiológicos de enfermedades. Las principales bacteriocinas caracterizadas procedentes de bacterias lácticas son producidas por cepas pertenecientes a los géneros

Lactococcus, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus* y *Pediococcus*.

En la Tabla 1 se detalla, a modo de ejemplo, un breve resumen de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas, caracterizadas e identificadas con nombres propios.

Tabla 2. Breve listado de bacteriocinas producidas por cepas de bacterias ácido lácticas (extraído de De Vuyst L.; Vandamme E., 1994) (15)

| Microorganismo productor | Bacteriocina |
|---|---|
| Cepas de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | nisina A; nisina Z; lactostrepcina 1; lactostrepcinas 2 y 3; lactostrepcina 4; Bac V, VI and VII; lacticina 481; dricina; lactococcina DR |
| Cepas de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> | BacWM4; bacteriocina S50; lactocina 0 |
| Cepas de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | diplococcina; lactostrepcina 5; Bac I, II, III y IV; lactococcina A; lactococcina A, B y M; lactococcina G |
| Cepas de <i>Lactobacillus acidophilus</i> | lactocidina; acidophilina; acidolina; lactacina B; lactacina F; bacteriocina M46; acidophilucina A; acidocina 8912 |
| Cepas de <i>Lactobacillus brevis</i> | lactobrevina; brevicina 37 |
| Cepas de <i>Lactobacillus casei</i> | caseicina 80; caseicina LHS |
| Cepa de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | bulgaricana |
| Cepas de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> | lactobacillina; lacticina A; lacticina B |
| Cepa de <i>Lactobacillus fermentum</i> | bacteriocina 466 |
| Cepa de <i>Lactobacillus gasserii</i> | gassericina A |
| Cepas de <i>Lactobacillus helveticus</i> | lactocina 27; helveticina J; helveticina V-1829 |
| Cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> | lactolina; plantaricina SIK-83; plantacina B; plantaricina A; plantacina BN; plantaricina S; plantaricina 406 |
| Cepa de <i>Lactobacillus reuteri</i> | reutericina 6 |
| Cepas de <i>Lactobacillus sake</i> | sakacina A; lactocina S; sakacina P |
| Cepas de <i>Carnobacterium piscicola</i> | carnobacteriocina A, B1 y B2; piscicolina 61; carnocina UI49 |
| Cepas de <i>Pediococcus acidilactici</i> | pediocina Ach; pediocina PA-1; pediocina 1D; pediocina S1-1 |
| Cepas de <i>Pediococcus pentosaceus</i> | pediocina A; pediocina N5p |
| Cepas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | mesenterocina 5; mesentericina Y105; mesenterocina 52 |
| Cepa de <i>Leuconostoc paramesenteroides</i> | leuconocina S |
| Cepas de <i>Streptococcus thermophilus</i> | bacteriocina STB40; bacteriocina STB78; bacteriocina St10; thermofilina 13 |
| Cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> | bacteriocina Bc-48; enterocina 226NWC |

Clasificación de las bacteriocinas

Una de las clasificaciones más aceptadas para las bacteriocinas es la que propuso Klaenhammer en 1993 (121), quien define cuatro clases diferentes de bacteriocinas de bacterias lácticas, las que se detallan a continuación:

Clase I: lantibióticos, péptidos pequeños (menos de 5000 Da), como por ejemplo nisina, lacticina 481 y lacticina S. Son termoestables, con aminoácidos modificados, de los cuales los más comunes son dehidroalanina (DHA) y dehidrobutirina (DHB), originados por deshidratación postraduccional de la serina y la treonina, respectivamente. La condensación de los residuos DHA y DHB con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas presentes en la molécula, origina los aminoácidos lantionina y β -metil-lantionina (122). Esta clase es, a su vez, subdividida en lantibióticos tipo A y tipo B, de acuerdo a sus estructuras químicas y a sus propiedades antimicrobianas. Ejemplos característicos de lantibióticos de tipo A son nisina y lacticina S, y de lantibióticos de tipo B, mersacidina y aconvenina (123).

Clase II: péptidos pequeños (menos de 10000 Da), termoestables, y sin aminoácidos modificados en su estructura primaria. Se los puede subdividir en cuatro subclases:

Subclase II_a: se caracterizan por ser particularmente activas frente al género *Listeria*. Sus secuencias aminoácidas muestran un elevado grado de homología (38–55%), que es mucho más pronunciado en la parte N-terminal de los péptidos, la cual es altamente hidrofílica y catiónica (124). Todos los miembros de esta subclase comparten la secuencia consenso N-terminal <Y-G-N-G-V-X-C>. Esta subclase se conoce como “familia pediocina”, en alusión a la bacteriocina más estudiada de este grupo, la pediocina PA-1.

Subclase II_b: contiene bacteriocinas cuya actividad requiere de la acción complementaria de dos péptidos, como la lactococina G (125, 126).

Subclase II_c: incluye a las bacteriocinas de la clase II que se transportan utilizando un sistema sec-dependiente (por ejemplo, enterocina P) (127).

Subclase II_d: son las bacteriocinas de la clase II que, como sucede con la lactocina A, no se pueden clasificar en ninguno de los subgrupos anteriores. Algunos autores han sugerido la creación de otra subclase para las bacteriocinas que requieren cisteínas reducidas para su actividad, como la lactocina B (128).

Clase III: proteínas termolábiles de peso molecular superior a 30000 Da. (helveticina J, helveticina V-1829, acidofilucina A, caseicina 80 y lactacinas A y B), que no poseen aminoácidos modificados en su estructura primaria. Estas bacteriocinas son las que poseen un menor interés industrial en la actualidad.

Clase IV: bacteriocinas de estructura compleja (plantaricina S, leuconocina S, lactocina 27 y pediocina SJ-1), que junto a su estructura peptídica parecen presentar un componente glucídico o lipídico esencial para su actividad biológica. Sin embargo, estas bacteriocinas complejas parecen ser meros artefactos de laboratorio, ya que cuando se purifican correctamente se demuestra su naturaleza exclusivamente peptídica (129).

No clasificables: grupo integrado por aquellas que no se pueden clasificar en ninguna de las clases citadas, como por ejemplo la enterocina AS-48 (130), o las producidas por *Enterococcus faecium* L50 (131, 132).

En la actualidad, prácticamente sólo se tienen en cuenta dos grupos de la classifica-

ción original de Klaenhammer (1993) (121), en los que se reúnen todas las bacteriocinas producidas por bacterias Gram (+): la clase I, constituida por bacteriocinas con modificación postranslacional; y la clase II, integrada por bacteriocinas no modificadas (133, 134).

Estructura de las bacteriocinas

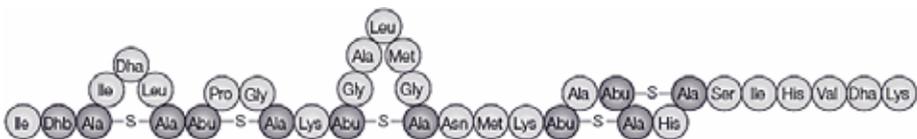
Las bacteriocinas de la clase I y II (especialmente II_a) son las que han recibido mayor atención científica debido, en parte, a que son las de mayor interés industrial. En general se trata de péptidos catiónicos y anfipáticos compuestos por entre 12 y 45 aminoácidos. Sus moléculas no suelen estar estructuradas en soluciones acuosas, pero tienden a formar estructuras α -hélice cuando se exponen a solventes como el trifluorotanol, o cuando se mezclan con membranas compuestas por fosfolípidos aniónicos. Algunas bacteriocinas poseen ciertas restricciones estructurales debido a la presen-

cia de puente disulfuro (por ejemplo pediocina PA-1) o anillos tioéter intramoleculares (nisina). La estructura de diversos lantibióticos ha sido elucidada mediante resonancia magnética nuclear (123). La estructura tridimensional de una bacteriocina de clase II, la leucocina A, se ha determinado también por este método (135).

Las bacteriocinas de la subclase II_a poseen una carga positiva neta y sus secuencias de aminoácidos oscilan desde 37 a 48 residuos. Todos los miembros de esta subclase comparten la secuencia consenso N-terminal $\langle Y-G-N-G-V-(x)-C(X)_4-c-(x)-v-(x)_4-A \rangle$, donde X denota cualquier aminoácido (136). Su dominio C-terminal suele ser más variable, con características hidrofóbicas o anfifílicas.

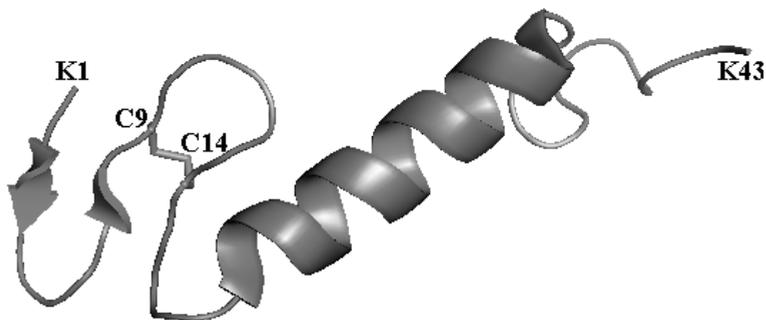
En las Figuras 1 y 2 se muestran, a modo de ejemplos, la estructura primaria de la nisina y la estructura tridimensional propuesta para la pediocina en presencia de micelas lipídicas.

Figura 4. Estructura primaria de la nisina



Ala-S-Ala representa al anillo de lantionina, Abu-S-Ala representa al anillo de β -metil-lantionina y los aminoácidos deshidratados se indican como: Dha (dehidroalanina) y Dhb (dehidrobutirina) [extraído de Cotter et al., 2005 (133); Cheigh et al., 2005 (219)].

Figura 5. Estructura tridimensional de sakacina P en micelas lipídicas



La estructura fue determinada mediante espectroscopía RMN (extraído de Uteng et al., 2003) (220).

Biosíntesis de bacteriocinas

La mayoría de las bacteriocinas son sintetizadas como prepéptidos biológicamente inactivos que transportan un péptido señal N-terminal, de entre 14 y 30 aminoácidos (137), que está unido al propéptido C-terminal. Para los lantibióticos, los residuos de serina, treonina y cisteína en su propéptido, experimentan modificaciones post-traduccionales extensivas para formar lantionina y metil-lantionina. La vía biosintética ocurre según el siguiente esquema: formación del prepéptido, reacciones de modificación, clivaje proteolítico del péptido líder (puede ocurrir antes, durante o luego de su exportación de la célula) y translocación del prepéptido modificado o propéptido maduro a través de la membrana citoplasmática.

Las bacteriocinas de clase II son sintetizadas como prepéptidos que poseen una secuencia señal N-terminal y un sitio de procesamiento proteolítico doble glicina característico, que se encuentra en el extremo C-terminal del péptido señal (138, 139). Luego de la formación del prepéptido,

el péptido líder es removido concomitantemente a su exportación fuera de la célula a través del transportador ABC dedicado y su proteína accesoria (137, 140). Por otro lado, las bacteriocinas de la clase II_c (acidocina B, enterocina 31, divergicina A, enterocina P), poseen una secuencia señal N-terminal típica del tipo "sec", y son procesadas y secretadas a través de la vía secretoria general (127,141-143).

Se han propuesto varias funciones que ejercería el péptido líder. Éste serviría como sitio de reconocimiento que dirige al prepéptido hacia su maduración y hacia las proteínas de transporte; además, protege a la cepa productora manteniendo a la bacteriocina en un estado inactivo e interactúa con el dominio propeptídico para asegurar una adecuada conformación, la cual es esencial para la interacción enzima-sustrato (144, 145).

Los determinantes genéticos de la biosíntesis de una bacteriocina se pueden localizar a nivel plasmídico o cromosómico (146).

Además, pueden residir en transposones insertados de forma estable en el genóforo de las células hospedadoras, como sucede en el caso de la nisina (147).

La producción de muchos lantibióticos y de algunas bacteriocinas de la clase II está regulada transcripcionalmente mediante un sistema de transducción de señal que

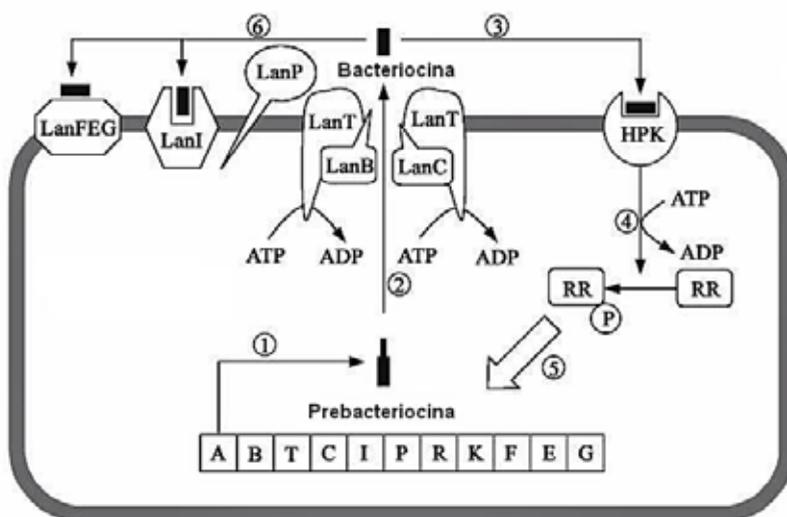
consta de tres componentes, como se observa en los diagramas esquemáticos representados en las Figuras 3 y 4:

* una proteína histidín-quinasa unida a la membrana celular (HPK);

* un regulador de respuesta citoplasmático (RR);

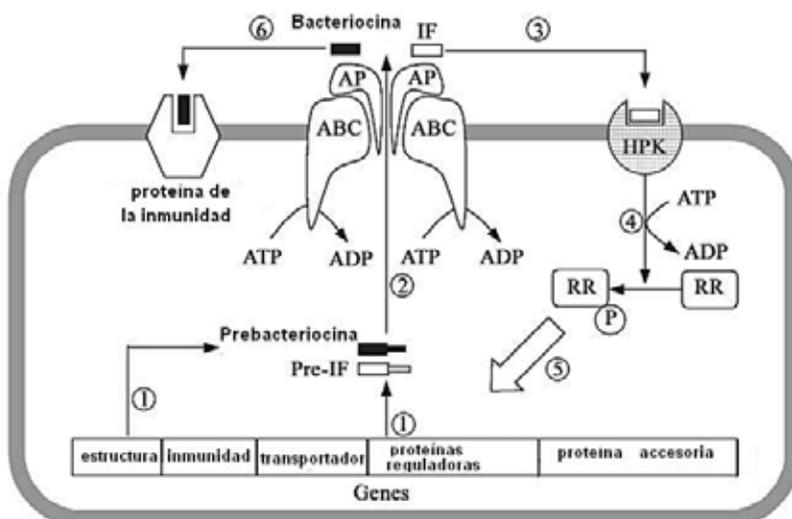
* un péptido inductor (137,148, 149).

Figura 6. Diagrama esquemático de la biosíntesis de lantibióticos



(1) formación de la prebacteriocina; (2) la prebacteriocina es modificada por LanB y LanC, translocada a través del transportador ABC dedicado LanT y procesada por LanP, resultando en la liberación de la bacteriocina madura; (3) la proteína histidín-quinasa (HPK) sensing la presencia de la bacteriocina y se autofosforila; (4) el grupo fosforil es subsecuentemente transferido al regulador de respuesta (RR); (5) RR activa la transcripción de los genes regulados; y (6) inmunidad del productor mediada por proteínas de inmunidad, LanI, y proteínas del transportador ABC dedicado, LanFEG (extraído de Chen y Hoover, 2003) (221).

Figura 7. Diagrama esquemático de la biosíntesis de las bacteriocinas de clase II



(1) formación de la prebacteriocina y del prepéptido del factor de inducción (IF); (2) la prebacteriocina y el pre-IF son procesados y translocados por el transportador ABC, desembocando en la liberación del IF y la bacteriocina maduros; (3) la proteína histidín-quinasa (HPK) sensa la presencia del IF y se autofosforila; (4) el grupo fosforilo (P) es transferido subsecuentemente al regulador de respuesta (RR); (5) RR activa la transcripción de los genes regulados; y (6) inmunidad del productor (extraído de Chen y Hoover, 2003) (221).

Actualmente se sabe que una misma cepa de origen natural puede producir más de una bacteriocina, fenotipo que parece relativamente común entre las bacterias lácticas bacteriocinogénicas (137). En este sentido, se han aislado diversas cepas (*Lactobacillus plantarum* C11, *Carnobacterium piscicola* LV17B, *C. piscicola* VI y *Enterococcus faecium* T136), capaces de producir más de una bacteriocina de la clase II (150–153).

Mecanismo de acción de las bacteriocinas sobre las bacterias blanco

En general, la acción antimicrobiana de las bacteriocinas se debe a la desestabili-

zación funcional de las membranas citoplasmáticas de las células sensibles o blanco. Las bacteriocinas actúan sobre sus dianas primarias, las membranas, a través de diferentes mecanismos, que ya han sido descritos en “Mecanismos de acción”.

Una alternativa a estos mecanismos ha sido enunciada por Ramakrishnan *et al.* en 2012 (154). Según estos investigadores puede darse un efecto sinérgico combinado entre lipasas y enterocinas producidas por cepas de enterococos muy lipolíticas, efecto que resulta letal frente a bacterias Gram (-). Mediante estudios aplicando microscopía electrónica de barrido, determinaron que las lipasas degradan

la capa externa de lipopolisacáridos de la pared celular Gram (-), generando poros a través de los cuales las enterocinas pueden llegar hasta la membrana citoplasmática, produciendo luego la muerte celular como lo hacen frente a bacterias Gram (+).

Este mecanismo de acción explica los resultados de muchas investigaciones que han probado la eficacia bactericida de enterocinas cuando actúan individualmente contra bacterias Gram (-) tales como enterobacterias, *V. cholerae*, *Pseudomonas*, etc. (94, 96, 98, 100, 102, 155, 156).

Propiedades bioquímicas de las bacteriocinas

• Tolerancia de las bacteriocinas al calor, la acidez y las enzimas

Las bacteriocinas de bacterias lácticas presentan una serie de propiedades bioquímicas comunes, como lo son la sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas y la tolerancia a elevadas temperaturas y a bajos valores de pH.

La termotolerancia de las bacteriocinas de bacterias lácticas de mayor interés tecnológico es generalmente elevada (157–161). La nisina purificada, por ejemplo, se caracteriza por su elevada termoestabilidad (100 °C durante 10 minutos) a pH 2,0 (162). Esta característica parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria.

Otras bacteriocinas, en su mayor parte producidas por lactobacilos, son termolábiles; las mismas poseen un mayor peso molecular y probablemente una estructura molecular más compleja.

La termoestabilidad de las bacteriocinas está íntimamente relacionada con el pH, y se han descrito numerosas bacteriocinas

que son más termorresistentes a pH ácido (131, 163, 164).

La termorresistencia generalizada de las bacteriocinas permite que permanezcan activas después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche (63°C 30 min; 72°C 15 s), lo que supone una ventaja adicional para su utilización en productos pasteurizados (97).

Las bacteriocinas de bacterias lácticas son generalmente estables a pH ácido o neutro (97, 156, 160, 161). La máxima solubilidad y estabilidad de la nisina se logra a pH 2,0, y se inactiva reversiblemente a pH 7,0 (162). Sin embargo, la mayoría de las bacteriocinas son activas en un amplio rango de pH, generalmente entre 3,0 y 9,0 (165). También se ha descrito tolerancia a valores de pH extremos, entre 1,0 y 2,0 y entre 11,0 y 12,0 (108, 166).

Debido a su naturaleza proteica, todas las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y α -quimotripsina), y algunas de origen gástrico (pepsina). Esta característica es bastante interesante con respecto a la utilización de bacteriocinas en productos alimentarios, puesto que serían inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidas como compuestos activos y sin causar los riesgos relacionados con el uso de antibióticos (167).

La nisina puede ser inactivada por α -quimotripsina (168), por pancreatina y por determinadas enzimas específicas o nisinasas (169), pero no lo es por tripsina, pepsina, erepsina, elastasa y carboxipeptidasa A (170).

Se han descrito otras bacteriocinas sensibles a enzimas no proteolíticas, que se inactivan por lipasas y α -amilasa (171–

173). Estas observaciones indican que la zona activa de estas bacteriocinas presenta una composición heterogénea (121).

Actualmente se acepta que la pronasa E y la proteinasa K, proteasas de amplio espectro, inhiben totalmente la actividad antimicrobiana de cualquier bacteriocina. Por ello es que durante los ensayos de screening es esencial su utilización para confirmar el origen proteico del inhibidor (20).

• Estabilidad

La estabilidad de las bacteriocinas disminuye a medida que aumenta su purificación (174–176). La adición de sero-albúmina bovina protege de la pérdida excesiva de actividad experimentada por algunas bacteriocinas durante su purificación.

Influencia de factores exógenos en la bacteriocinogénesis

La biosíntesis de bacteriocinas ocurre en la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, y en la mayoría de los casos guarda relación con la biomasa producida (97), si bien la producción máxima en los medios de cultivo puede ocurrir en diferentes fases del ciclo de crecimiento (13).

Algunos investigadores han señalado que ciertos componentes específicos del medio de cultivo interfieren sensiblemente en la producción de alguna bacteriocina individual. Así, varios trabajos indican la necesidad de algunos nutrientes, como extracto de levadura, aminoácidos, manganeso y manitol, para aumentar, disminuir o suprimir la producción de diversas bacteriocinas (176–179).

Las variaciones de las condiciones de cultivo, como por ejemplo temperatura, tiempo y pH, ejercen un profundo efecto

en la producción de bacteriocinas activas. Generalmente, se produce más bacteriocina cuando la cepa productora se cultiva a su temperatura óptima de crecimiento y, además, cuando el pH se mantiene constante (13). Aquellas condiciones que favorezcan la alta densidad celular permitirán, de igual modo, un aumento en el rendimiento de bacteriocina. Es por ello que la utilización de fermentadores, especialmente del tipo batch y batch alimentado, que admiten realizar controles constantes de temperatura, pH y agregado de nutrientes, conduce a la optimización de las condiciones experimentales que posibilitan obtener una máxima densidad celular y, por lo tanto, un máximo título bacteriocinogénico. El desarrollo de la cepa productora a temperaturas elevadas puede suprimir completamente la producción de bacteriocina (176, 180), y algunas veces eliminar irreversiblemente esta propiedad (180, 181). Schlegel y Slade (1973) (182) demostraron que la producción de estreptocina es máxima en la fase logarítmica, descendiendo algo cuando el cultivo entra en la fase estacionaria. Por otro lado, Tagg *et al.* (1976) (13) observaron que la producción de estreptocina A se inicia al final de la fase logarítmica del desarrollo de la cepa productora, y que dicha actividad disminuye lentamente tras un período de incubación prolongado. Otras investigaciones también han descrito pérdidas sustanciales en la actividad de las bacteriocinas de cultivos incubados durante mucho tiempo. Este efecto puede deberse a la existencia de inactivadores específicos de las mismas, o bien a la digestión enzimática o a la reabsorción de la bacteriocina por la cepa productora, especialmente en su membrana celular (13).

Aplicaciones de péptidos antimicrobianos

• Potenciales aplicaciones terapéuticas

Las expectativas en las aplicaciones clínicas de los PAs y miméticos radican en su amplio espectro de actividad bactericida, rápida acción y baja tendencia para desarrollar resistencia.

Pueden ser usados como único antimicrobiano, en combinación con otros antibióticos actuando en forma sinérgica, como compuestos neutralizantes de endotoxinas o como inmunomoduladores (5).

Aunque la potencia de los PAs contra los organismos patógenos más susceptibles normalmente es menor que la de los antibióticos convencionales, una de las mayores fortalezas de los PAs es su habilidad para destruir bacterias multirresistentes, a concentraciones similares.

El uso de péptidos actuando en forma sinérgica con otros péptidos y antibióticos convencionales podría contribuir a superar algunas de las barreras que las bacterias resistentes han creado contra los antibióticos actuales.

En el caso de los pacientes con fibrosis quística, más del 90% de las infecciones pulmonares son ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Estudios *in vivo* utilizando un modelo de infección pulmonar crónica en rata, han demostrado que péptidos pequeños inhiben el crecimiento de bacterias como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (183).

La producción de PAs y miméticos en escala industrial se puede realizar empleando técnicas de ADN recombinante o síntesis química en solución y/o en fase sólida. Sin embargo, su producción no es aún económicamente competitiva, como lo

es la de la mayoría de los antibióticos convencionales.

A continuación se presentan algunos ejemplos de antimicrobianos peptídicos que se están desarrollando, y los que recientemente han sido aprobados por la FDA.

Empresas tales como Magainin Pharmaceuticals (<http://www.genaera.com>), Micrologix (Migenix, <http://www.migenix.com>) e Intrabiotics (<http://www.intrabiotics.com>), diseñaron PAs que difieren de los naturales en solamente pocos aminoácidos. Uno de éstos fue pexiganan (MSI-78), un péptido sintético derivado de magainina-2, que es uno de los PAs mejor investigados en términos de desarrollo de un fármaco, y que originalmente fue aislado de la piel del *Xenopus laevis*. Se emplea en el tratamiento de infecciones de úlceras de pie diabético, leves a moderadas, en forma tópica. Estudios por RMN (Resonancia Magnética Nuclear) revelaron que el péptido forma una estructura helicoidal dimérica antiparalela en micelas y bicapas, que sería la forma en la que se inserta en la membrana (184).

A pesar de que los ensayos clínicos de Fase III probaron que pexiganan fue eficiente en la reparación de heridas, no fue aprobado por la FDA.

Un péptido sintético correspondiente a la región N-terminal de lactoferrina e identificado como hLF1-11(GRRRRSQQWCA), presenta un amplio espectro de actividad que incluye bacterias y hongos, siendo también efectivo contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes y *Candida albicans* resistente al fluconazol. La seguridad y tolerabilidad de hLF1-11 fue probada en voluntarios sanos y en receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas, con muy buenos resultados (185, 186).

Este derivado de lactoferrina está siendo desarrollado por la empresa AM-Pharma.

Un nuevo fármaco sintético derivado de la indolicina bovina, conocido como Omiganan (o MX-226) fue desarrollado por la empresa Migenex para la prevención de la contaminación de catéteres. En un estudio completo de Fase III, MX-226 demostró reducir en un 49 % las infecciones locales de catéteres. Luego de extensivos estudios se ha visto que Omiganan no induce resistencia.

Plectasina (Novozymes Inc., [http: www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)) es un nuevo PA con potencial terapéutico, una defensina aislada del hongo *Pseudoplectania nigrella*, que actúa uniéndose al lípido II, precursor de la pared celular bacteriana. Se lo produce en forma recombinante y ha demostrado su utilidad en modelos animales de peritonitis y neumonía (187).

En lo referente a lipopéptidos, Daptomicina (Cubicin®) fue aprobada por la FDA en el 2003, y se trata de un lipopéptido cíclico y del primero en su tipo que se aplicó en la clínica. Está indicado para el tratamiento de infecciones de piel producidas por bacterias Gram (+) resistentes a los antibióticos convencionales, y para bacteriemia producida por *Staphylococcus aureus*. Pertenece a la familia de los péptidos naturales no ribosomales, y es un producto de fermentación de *Streptomyces roseosporus* (188).

Telavancina (Vibativ®) es un lipoglicopéptido, derivado sintético de vancomicina. Este fármaco fue aprobado por la FDA en el año 2009 para el tratamiento de infecciones de piel complicadas. En el corriente año se aprobó su uso en pacientes hospitalizados con neumonía bacteriana (189).

Oritavancina (The Medicines Company) es también un lipoglicopéptido semisin-

tético que se encuentra en evaluación en ensayos clínicos de Fase III para el tratamiento de infecciones bacterianas de piel producidas por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (190).

Un aspecto muy novedoso y de reciente aparición en la literatura especializada es el uso de algunas bacteriocinas, específicamente los lantibióticos, como agentes terapéuticos.

Aproximadamente 50 lantibióticos se han descrito desde 1928, año en que se descubrió el primero de ellos, la nisina. Los lantibióticos son conocidos por ser agentes antibióticos potentes, pero los intentos para investigar su utilidad como agentes terapéuticos han encontrado el inconveniente causado por la incapacidad de producir cantidades suficientes de cualquiera de estas moléculas puras como para poder probarlas en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Métodos de fermentación estándar, tales como los utilizados para hacer una variedad de otros antibióticos, por lo general dan como resultado la producción de cantidades sólo mínimas de lantibióticos. En el caso de la nisina, en que sí se logran obtener cantidades relativamente importantes, su estructura química única ha impedido alcanzar la purificación necesaria requerida para los ensayos clínicos.

MU1140 es un lantibiótico que ha demostrado actividad contra una amplia variedad de enfermedades (típicas infecciones intra-hospitalarias) causadas por bacterias Gram (+), incluyendo a *S. aureus* meticilino-resistentes, enterococos vancomicina-resistentes, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis* y también contra el ántrax. La empresa Orogenics ha llevado a cabo extensas pruebas preclínicas con MU1140, que han demostrado un novedoso meca-

nismo de acción de la molécula. Con el fin de poder producir cantidades suficientes para los ensayos clínicos y para su potencial comercialización, la empresa tiene la intención de utilizar una versión sintética de MU1140, conocida como MU1140-S (<http://www.oragenics.com/lantibiotics/mu1140>).

Por otra parte, el lantibiótico denominado NAI-107, activo contra bacterias Gram (+) tales como cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina y cepas de enterococos resistentes a la vancomicina, presenta una rápida actividad bactericida *in vitro*. Pero además de ello, actualmente ha sido confirmada su eficacia en varios modelos de infecciones experimentales inducidas por patógenos Gram (+) (191).

En 2011, la empresa Novacta Biosystems comenzó ensayos clínicos en fase I con voluntarios sanos, de un nuevo antibiótico para tratar infecciones hospitalarias causadas por *C. difficile*. El nuevo compuesto, denominado NVB302, ha resultado efectivo contra todas las cepas ensayadas de esta bacteria, sin causar efectos adversos sobre la microbiota intestinal normal de los voluntarios. *C. difficile* causa infecciones intrahospitalarias que provocan diarreas graves y que pueden ser potencialmente mortales, sobre todo para las personas mayores. Pocos antibióticos actualmente disponibles son eficaces contra la infección por *C. difficile*, y la resistencia a los mismos es una amenaza cada vez mayor.

NVB302 se está probando actualmente para determinar su seguridad y tolerabilidad en voluntarios sanos. Es un lantibiótico de tipo B, los que han mostrado un gran potencial para el tratamiento de infecciones tales como las causadas por *C. difficile* o por *S. aureus* meticilino-resistentes. Sin embargo, la química médica convencional no ha sido

aún capaz de optimizar la estructura de estos compuestos de origen natural de modo de alcanzar el potencial necesario para tratar estas enfermedades a nivel humano.

Tecnologías patentadas por la empresa Novacta han permitido la manipulación estructural y la optimización de la actividad antibiótica de los lantibióticos, para tratar de alcanzar el máximo potencial de esta novedosa clase de compuestos, aún sin explorar (<http://www.wellcome.ac.uk/News/2011/News/WTVM053339.htm>).

Aplicaciones de las bacteriocinas en tecnologías alimentarias

El interés científico-tecnológico actual por las bacteriocinas de bacterias lácticas como bioconservantes alimentarios se debe a tres características fundamentales: en primer lugar, y como ya se ha dicho, son sustancias producidas por microorganismos que gozan del *status* de GRAS; en segundo lugar, a que debido a su naturaleza peptídica son degradadas e inactivadas enzimáticamente en el tracto digestivo, por lo que no originan disbiosis intestinales ni trastornos de tipo alérgico; y finalmente, a que la mayor parte de las bacteriocinas de interés industrial tienen un espectro antimicrobiano bastante amplio y actúan sinérgicamente con otros sistemas de conservación.

Esta última característica es particularmente relevante desde un punto de vista práctico. Frecuentemente se ha observado que la aplicación de bacteriocinas en sistemas alimentarios provoca reducciones típicas de entre 1 y 4 ciclos logarítmicos en las poblaciones de los microorganismos sensibles (192, 193). Aunque estos niveles de inhibición pueden considerarse inaceptables como método de conservación único o primario, resultarían muy útiles como fac-

tor de seguridad adicional en un sistema de barreras (194). La acción sinérgica de las bacteriocinas con otras barreras (temperatura, atmósferas modificadas, NaCl, altas presiones, nitratos, etc.), podría contribuir tanto a la obtención de alimentos con una calidad higiénica óptima, como a una reducción en las concentraciones de ciertos aditivos químicos o en la intensidad de algunos tratamientos tecnológicos (195–197).

La adopción de un sistema de barreras es especialmente recomendable para evitar la presencia en los alimentos de microorganismos que, como *Listeria monocytogenes*, son difíciles de erradicar por medio de sistemas de conservación clásicos como la acidificación o la refrigeración.

Nisina se comercializó por primera vez en Inglaterra, en 1953, y actualmente es un producto ampliamente disponible bajo el nombre comercial de Nisaplin TM, producida por la empresa Danisco (Dinamarca), así como bajo la forma de otras preparaciones comerciales de menor difusión. Su empleo está aceptado en más de 50 países, existiendo notables diferencias en cuanto a qué alimentos y en qué concentraciones puede añadirse (198).

Si bien nisina sigue siendo la única bacteriocina aprobada para su uso como biopreservador alimentario, existen otros productos como el denominado Alta 2341® (Kerry Bioscience Carrigaline, Co. Cork, Ireland), que contiene pediocina PA-1, y otros fermentados que se comercializan y se emplean en la industria alimentaria. En Estados Unidos se ha aprobado el uso como ingrediente alimentario de este fermentado Alta 2341®, y a pesar de que la presencia de la bacteriocina es el hecho más remarcado publicitariamente, el pro-

ducto no está sujeto a las restricciones de los aditivos alimentarios al comercializarse en forma de fermentado.

Actualmente existen también algunas patentes europeas y estadounidenses que protegen el empleo de la pediocina PA-1 en productos lácteos (199) y cárnicos (200, 201).

Por otra parte, las empresas dedicadas a la producción y distribución mundial de cultivos iniciadores para la elaboración de alimentos lácteos, cárnicos y vegetales fermentados, ofrecen una amplia variedad de estos fermentos que contienen cepas de bacterias ácido lácticas capaces de producir diferentes bacteriocinas *in situ* durante el proceso de fermentación. De igual modo, se ofrecen fermentos adjuntos o secundarios, constituidos por cepas de bacterias lácticas que no participan del proceso fermentativo de las materias primas alimentarias, sino que sólo se encargan de producir distintas bacteriocinas *in situ*. También existe en el mercado mundial la disponibilidad de cultivos bioprotectores, los cuales se utilizan para hacer tratamientos superficiales de alimentos no fermentados, y cuya única función es la biopreservación de estos alimentos por bacteriocinogénesis (17).

Formas de aplicación

Existen tres estrategias principales para la aplicación de las bacteriocinas en la conservación de los alimentos (197, 202–205):

- Inoculación del alimento con la bacteria láctica, la cual produce la bacteriocina *in situ*.
- Empleo de un medio previamente fermentado con una cepa bacteriocinogénica como ingrediente alimentario.
- Adición de la bacteriocina purificada o semipurificada.

Tendencias actuales y futuras del empleo de bacteriocinas en tecnologías alimentarias

Para eliminar o reducir los factores antes expuestos, se aplican las estrategias que se detallan a continuación:

Combinación de bacteriocinas

Se ha observado que una combinación de sakacina A y nisina A inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* de una forma más intensa que cualquiera de las dos bacteriocinas por separado (204). De forma similar, Hanlin *et al.* (1993) (206) demostraron la mayor actividad de una combinación de nisina A y pediocina PA-1 cuando se la comparaba con ambas bacteriocinas por separado. Mulet-Powell *et al.* (1998) (207) también han demostrado el efecto sinérgico de diversas combinaciones de bacteriocinas pertenecientes a clases distintas.

Ingeniería proteica y síntesis química

Con estrategias de ingeniería proteica se puede introducir un gran número de modificaciones en las moléculas de bacteriocinas (208-210). Esto ha abierto la posibilidad de producir variantes de bacteriocinas con propiedades ventajosas, como una mayor actividad biológica, un mayor espectro de inhibición o una mejor estabilidad y/o solubilidad.

Alternativamente, y dado que la mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas son péptidos de pequeño tamaño, también se pueden obtener variantes de bacteriocinas de composición conocida mediante los procedimientos de síntesis química de péptidos (211, 212).

Producción heteróloga

Se dedica mucha atención a la producción heteróloga de bacteriocinas de interés

tecnológico, por parte de bacterias lácticas no bacteriocinogénicas pero bien adaptadas al alimento en el que se desea aplicar. Por ejemplo, los pediococos son microorganismos normalmente asociados con productos vegetales y cárnicos. Algunas cepas de *Pediococcus acidilactici* producen pediocina PA-1. Sin embargo, los pediococos están escasamente adaptados para la colonización de alimentos en los que no residen de forma natural (213). Por lo tanto, no son los candidatos ideales para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en leche y productos lácteos.

En este contexto, se han obtenido cepas de *Lactococcus lactis*, un microorganismo bien adaptado a los ambientes lácteos, que producen pediocina PA-1 u otras bacteriocinas de la clase II (214-216). Adicionalmente, se han desarrollado cepas de lactococos capaces de producir heterológamente nisina A y pediocina PA-1 (217). Finalmente, también se han desarrollado cepas de levaduras que producen pediocina PA-1 (218). En este caso, el objetivo es la inhibición de las bacterias lácticas alterantes del vino y de otras bebidas alcohólicas obtenidas mediante procesos fermentativos.

Conclusiones

Los péptidos antimicrobianos son moléculas estructuralmente diversas cuyas características los ubican como una actual y potencial alternativa para combatir infecciones causadas por patógenos resistentes a los antibióticos convencionales.

Por otra parte, algunos de ellos tales como las bacteriocinas, representan una nueva fuente de preservadores naturales a utilizar en tecnologías alimentarias avanzadas.

Agradecimientos

Las líneas de investigación en el área péptidos antimicrobianos de los grupos participantes han sido desarrolladas en el marco de proyectos subsidiados por la ANPCyT (PICT 2010, PICTO-CIN 2010) y UNL (CAI+D 2009).

Referencias bibliográficas

1. Newman, D.J.; Cragg, G.M., 2012. Natural Products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J.Nat. Prod.* **75**, 3: 311–335.
2. Butler, M.S.; Buss, A.D., 2006. Natural products—the future scaffolds for novel antibiotics?. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 7: 919–929.
3. Saleem, M.; Nazir, M.; Ali, M.S.; Hussain, H.; Lee, Y.S.; Riaz, N.; Jabbar, A., 2010. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 2: 238–254.
4. Radić N. and Bratkovič T., 2012. Future antibiotic agents: Turning to Nature for inspiration. "Antimicrobial Agents". (Ed. Dr. Varaprasad Bobbala). InTech, DOI: 10.5772/33588 (<http://www.intechopen.com/books/antimicrobial-agents/future-antibiotic-agents-turning-to-nature-for-inspiration>).
5. Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389–395.
6. Bowdish, D.M.; Davidson, D.J.; Lau, Y.E.; Lee K.; Scott, M.G.; Hancock, R.E., 2005. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 4: 451–459.
7. Brown, K.L.; Hancock, R.E., 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 1: 24–30.
8. Cunliffe R.N. and Mahida Y.R., 2004. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 1: 49–58.
9. Yang, D.; Biragyn, A.; Kwak L.W.; Oppenheim J.J., 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* **23**: 291–296.
10. Chan Y.R.; Gallo R.L., 1998. PR-39, a syn-decan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130(Cas). *J. Biol. Chem.* **273**, 44: 28978–28985.
11. Jenssen H.; Hamill P.; Hancock R.E., 2006. Peptide Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 3: 491–511.
12. Ganz, T., 2003. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr. Comp. Biol.* **43**, 2: 300–304.
13. Tagg, J.R.; Dajani, A.S.; Wannamaker, L. W., 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**: 722–756.
14. Sobrino, O.J.; Rodríguez, J.M.; Moreira, W.L.; Fernández, M.F.; Sanz, B.; Hernández, P.E., 1991. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **13**: 1–10.
15. De Vuyst, L.; Vandamme, E. J. (eds.), 1994. "Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, genetics and applications". Blackie Academic & Professional. London, UK.
16. Mills, S.; Stanton, C.; Hill, C.; Ross, R.P., 2011. New Developments and Applications of Bacteriocins and Peptides in Foods. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2**: 299–329.
17. McNeil, B.; Archer, D.; Giavasis, I.; Harvey, L. (eds.), 2013. "Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals". Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, UK.
18. Raccach, M.; Geshell, D.J., 1995. The inhibition of *Listeria monocytogenes* in milk by dehydrated pediococcal spent medium. *Food Microbiol.* **12**: 229–235.
19. Roller, S., 1991. The biotechnological development of new food preservatives. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **9**: 183–206.

20. Ray, B.; Daeschel, M. (eds.), 1992. "Food bio-preservatives of microbial origin". CRC Press. Boca Ratón, Florida, USA.
21. Martínez Magro, M.I.; Martínez Corbacho, J.M.; Herranz Sorribes, C.; Suárez Gea, A.M.; Rodríguez Gómez, J.M., 2000. Las Bacteriocinas de las Bacterias Lácticas. 1 – Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. *Alimentaria*, nº **314**: 59–66.
22. Steiner H.; Hultmark D.; Engström A.; Benich H.; Boman H.G., 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**: 246–248.
23. Gibson B.W.; Poulter L.; Williams D.H., 1985. A mass spectrometric assay for novel peptides: Application to *Xenopus laevis* skin secretions. *Peptides* **6**: 23–27.
24. Zasloff, M., 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**: 5449–5453.
25. Rogers, I.A.; Whittier, E.O., 1928. Limiting factors in the lactic fermentation. *J. Bacteriol.* **16**: 211–229.
26. Foegeding, P.M.; Thomas, A.B.; Pilkington D.H.; Klaenhammer, T.R., 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by *in situ*-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 884–890.
27. Harris F.; Dennison, S.R.; Phoenix, D.A., 2009. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* **10**, 6: 585–606.
28. Wang, G.; Li, X.; Wang, Z., 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* **37** (Database issue): D933–D937.
29. Podda E.; Benincasa, M.; Pacor, S.; Micali, F.; Mattiuzzo, M.; Gennaro, R.; Scocchi, M. 2006. Dual mode of action of Bac7, a proline-rich antibacterial peptide. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**, 11: 1732–1740.
30. Scocchi M.; Tossi A.; Gennaro, R., 2011. Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action. *Cell Mol. Life Sci.* **68**, 13: 2317–2330.
31. Anderson, R.C.; Hancock, R.E.; Yu, P.L., 2004. Antimicrobial activity and bacterial-membrane interaction of ovine-derived cathelicidins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2: 673–676.
32. Shamova, O.; Brogden, K.A.; Zhao, C.; Nguyen, T.; Kokryakov, V.N.; Lehrer, R.I., 1999. Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. *Infect. Immun.* **67**, 8: 4106–4111.
33. Bulet, P.; Hetru, C.; Dimarcq, J.L.; Hoffmann D., 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 4–5: 329–344.
34. Otvos L. Jr., 2002. The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell Mol. Life Sci.* **59**, 7: 1138–1150.
35. Kragol, G.; Hoffmann, R.; Chattergoon, M.A.; Lovas, S.; Cudic, M.; Bulet, P.; Condie, B.A.; Rosengren, K.J.; Montaner, L.J.; Otvos, L. Jr., 2002. Identification of crucial residues for the antibacterial activity of the proline-rich peptide, pyrrhocoricin. *Eur. J. Biochem.* **269**, 17: 4226–4237.
36. Falla, T.J.; Karunarathne, D.N.; Hancock, R.E., 1996. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J. Biol. Chem.* **271**, 32: 19298–19303.
37. Lawyer, C.; Pai, S.; Watabe, M.; Borgia, P.; Mashimo, T.; Eagleton, L.; Watabe, K., 1996. Antimicrobial activity of a 13 amino acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine precursor protein of a novel family of antibacterial peptides. *FEBS Lett.* **390**, 1: 95–98.
38. Blochet J.E.; Chevalier, C.; Forest, E.; Pebay-Peyroula, E.; Gautier, M.F.; Joudrier, P.; Pézolet, M.; Marion D., 1993. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton x-114 phase partitioning. *FEBS Lett.* **329**, 3: 336–340.

- 39.** Oppenheim, F.G.; Xu, T.; McMillian, F.M.; Levitz, S.M.; Diamond, R.D.; Offner, G.D.; Troxler, R.F., 1988. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. J. Biol. Chem. **263**, 16: 7472–7477.
- 40.** Torres, S.R.; Garzino-Demo, A.; Meiller T.F.; Meeks, V.; Jabra-Rizk, M.A., 2009. Salivary histatin-5 and oral fungal colonisation in HIV+ individuals. Mycoses **52**, 1: 11–15.
- 41.** Tsai, H.; Bobek, L.A., 1998. Human salivary histatins: promising antifungal therapeutic agents. Crit. Rev. Oral Biol. Med. **9**, 4: 480–497.
- 42.** Amiche, M; Ladram, A; Nicolas, P., 2008. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. Peptides **29**, 11: 2074–2082.
- 43.** Conlon, J.M.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N., 2009. Antimicrobial peptides from the skins of North American frogs. Biochim. Biophys. Acta **1788**, 8: 1556–1563.
- 44.** Wakamatsu, K.; Takeda, A.; Tachi, T.; Matsuzaki K., 2002. Dimer structure of magainin 2 bound to phospholipid vesicles. Biopolymers **64**, 6: 314–327.
- 45.** Conlon, J.M.; Iwamuro, S.; King, J.D., 2009. Dermal cytolytic peptides and the system of innate immunity in anurans. Ann. N. Y. Acad. Sci. **1163**: 75–82.
- 46.** Amiche, M.; Galanth, C., 2011. Dermaseptins as models for the elucidation of membrane-acting helical amphipathic antimicrobial peptides. Curr. Pharm. Biotechnol. **12**, 8: 1184–1193.
- 47.** Zanetti, M.; Gennaro, R.; Romeo, D., 1995. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. FEBS Lett. **374**, 1: 1–5.
- 48.** Méndez-Samperio, P., 2010. The human cathelicidin hCAP18/LL-37: A multifunctional peptide involved in mycobacterial infections. Peptides **31**, 9: 1791–1798.
- 49.** Wang, G., 2008. Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. J. Biol. Chem. **283**, 47: 32637–32643.
- 50.** Ibrahim H.R.; Thomas, U.; Pellegrini, A., 2001. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. J. Biol. Chem. **276**, 47: 43767–43774.
- 51.** Wu, M.; Hancock, R.E., 1999. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. J. Biol. Chem. **274**, 1: 29–35.
- 52.** Clark, D.P.; Durell, S.; Maloy, W.L.; Zasloff, M., 1994. Ranalexin: a novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, Polymyxin. J. Biol. Chem. **269**, 14: 10849–10855.
- 53.** Kim, H.J.; Kim, S.S.; Lee, M.H.; Lee, B.J.; Ryu, P.D., 2004. Role of C-terminal heptapeptide in pore-forming activity of antimicrobial agent, gaegurin 4. J. Pept. Res. **64**, 4: 151–158.
- 54.** Park, S-H.; Kim, H-E.; Kim, C-M; Yun, H-J.; Choi, E-C.; Lee, B.J., 2002. Role of proline, cysteine and disulphide bridge in the structure and activity of the anti-microbial peptide gaegurin 5. Biochem. J. **368**: 171–182.
- 55.** Mangoni, M.L.; Fiocco, D.; Mignogna, G.; Barra, D.; Simmaco, M., 2003. Functional characterisation of the 1–18 fragment of esculentin-1b, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*. Peptides **24**, 11: 1771–1777.
- 56.** Hwang P.M.; Zhou, N.; Shan, X.; Arrowsmith, C.H.; Vogel, H.J., 1998. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. Biochemistry **37**, 12: 4288–4298.
- 57.** Gifford, J.L.; Hunter, H.N.; Vogel, H.J., 2005. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. Cell Mol. Life Sci. **62**, 22: 2588–2598.

- 58.** Jenssen, H.; Hancock, R.E., 2009. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie* **91**, 1: 19–29.
- 59.** Tomita, M.; Takase, M.; Bellamy, W.; Shimamura, S., 1994. A review: the active peptide of lactoferrin. *Acta Paediatr. Jpn.* **36**, 5: 585–591.
- 60.** Hoffmann, J.A.; Kafatos, F.C.; Janeway, C.A.; Ezekowitz, R.A., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 5418: 1313–1318.
- 61.** Ganz, T., 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 9: 710–720.
- 62.** Dathe, M.; Wieprecht, T.; Nikolenko, H.; Handel, L.; Maloy, W.L.; MacDonald, D.L.; Beyersmann, M.; Bienert, M., 1997. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Lett.* **403**, 2: 208–212.
- 63.** Shai, Y; Oren, Z., 2001. From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides* **22**, 10: 1629–1641.
- 64.** Chan, D.I.; Prenner, E.J.; Vogel, H.J., 2006. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**, 9: 1184–1202.
- 65.** Müller D.M.; Carrasco, M.S.; Simonetta, A.C.; Beltramini, L.M.; Tonarelli, G.G., 2007. A synthetic analog of plantaricin 149 inhibiting food-borne pathogenic bacteria: evidence for alpha-helical conformation involved in bacteria-membrane interaction. *J. Pept. Sci.* **13**, 3: 171–178.
- 66.** Bessin, Y.; Saint, N.; Marri, L.; Marchini, D.; Molle, G., 2004. Antibacterial activity and pore-forming properties of ceratotoxins: a mechanism of action based on the barrel stave model. *Biochim. Biophys. Acta* **1667**, 2: 148–156.
- 67.** Cespedes, G.F.; Lorenzón, E.N.; Vicente, E.F.; Mendes-Giannini, M.J.; Fontes W.; Castro, M.S.; Cilli, E.M., 2012. Mechanism of action and relationship between structure and biological activity of Ctx-Ha: a new ceratotoxin-like peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Protein Pept. Lett.* **19**, 6: 596–603.
- 68.** Shai, Y., 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 1–2: 55–70.
- 69.** Yeaman, M.R.; Yount, N.Y., 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* **55**, 1: 27–55.
- 70.** Kim, C.; Spano, J.; Park, E.K.; Wi, S., 2009. Evidence of pores and thinned lipid bilayers induced in oriented lipid membranes interacting with the antimicrobial peptides, magainin-2 and aurein-3.3. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 7: 1482–1496.
- 71.** Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y., 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* **276**, 8: 5836–5840.
- 72.** Brooks, H.; Lebleu, B.; Vivès, E., 2005. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 4: 559–577.
- 73.** Park C.B.; Yi, K.S.; Matsuzaki, K.; Kim, M.S.; Kim, S.C., 2000. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 15: 8245–8250.
- 74.** Park, C.B.; Kim, H.S.; Kim, S.C., 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 1: 253–257.
- 75.** Baggerman, G.; Verleyen, P; Clynen, E.; Huybrechts, J.; De Loof, A.; Schoofs, L., 2004. Peptidomics. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **803**, 1: 3–16.

- 76.** Jelinek, R; Kolusheva, S., 2005. Membrane interactions of host–defense peptides studied in model systems. *Curr. Protein Pept. Sci.* **6**: 103–114.
- 77.** Papo, N.; Shai, Y., 2003. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipids membranes? *Peptides* **24**: 1693–1703.
- 78.** Siano, A.; Húmpola, M.V.; Rey, M.C.; Simonetta, A.; Tonarelli, G.G., 2011. Interaction of acylated and substituted antimicrobial peptide analogs with phospholipid–polydiacetylene vesicles. Correlation with their biological properties. *Chem. Biol. Drug Des.* **78**, 1: 85–93.
- 79.** Minahk, C.J.; Morero, R.D., 2003. Inhibition of enterocin CRL35 antibiotic activity by mono– and divalent ions. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 5: 374–379.
- 80.** Rydlo, T.; Rotem, S.; Mor, A., 2006. Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives under extreme incubation conditions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2: 490–497.
- 81.** Rozek, A.; Powers, J.P.; Friedrich, C.L.; Hancock, R.E., 2003. Structure–based design of an indolicidin peptide analogue with increased protease stability. *Biochemistry* **42**, 48: 14130–14138.
- 82.** Hilpert, K., 2011. Identifying Novel Antimicrobial Peptides with Therapeutic Potential Against Multidrug–Resistant Bacteria by Using the SPOT Synthesis. *Mini–Rev.Org.Chem.* **8**, 2: 157–163.
- 83.** Patch, J.A.; Barron, A.E., 2003. Helical peptoid mimics of magainin–2 amide. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 12092–12093.
- 84.** Kapoor R.; Wadman, M.W.; Dohm, M.T.; Czyzewski, A.M.; Spormann, A.M.; Barron A.E., 2011. Antimicrobial peptoids are effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**, 6: 3054–3057.
- 85.** Schmitt, M.A.; Weisblum, B.; Gellman, S.H., 2007. Interplay among folding, sequence, and lipophilicity in the antibacterial and hemolytic activities of alpha/beta–peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **129**: 417–428.
- 86.** Rotem, S.; Mor, A., 2009. Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 8: 1582–1592.
- 87.** Tew, G.N.; Liu, D.; Chen, B.; Doerksen, R.J.; Kaplan, J.; Carroll, P.J.; Klein, M.L.; DeGrado, W.F., 2002. De novo design of biomimetic antimicrobial polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 8: 5110–5114.
- 88.** Makovitzki, A.; Avrahami, D.; Shai, Y., 2006. Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 43: 15997–16002.
- 89.** Hruba V.J.; Cai, M., 2013. Design of peptide and peptidomimetic ligands with novel pharmacological activity profiles. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**: 557–580
- 90.** Wetzer, M.; Kapoor, R.; Huang, W.; Barron A.E., 2012. Peptoid Oligomers: Peptidomimetics for Diverse Biomedical Applications. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, **9**: 267–287.
- 91.** Jahnsen R.D.; Frimodt–Møller, N.; Franzyk, H., 2012. Antimicrobial activity of peptidomimetics against multidrug–resistant *Escherichia coli*: a comparative study of different backbones. *J. Med. Chem.* **55**, 16: 7253–7261.
- 92.** Giuliani A.; Rinaldi, A.C., 2011. Beyond natural antimicrobial peptides: multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. *Cell Mol. Life Sci.* **68**, 13: 2255–66.
- 93.** Okereke, A.; Montville, T. J., 1991., Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* **55**: 349–353.
- 94.** Lauková, A.; Mareková, M.; Javorsky, P., 1993. Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin–like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM 4231. *Lett. Appl. Microbiol.* **16**: 257–260.
- 95.** Vignolo, G.M.; Suriani, F.; Ruiz Holgado, A.A.P.; Oliver, G., 1993. Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 334–349.
- 96.** Susani, T.; Neviani, E.; Carminati, D.; Giraffa, G., 1995. Inibizione in latte di *Clostridium tyrobu-*

- tircum* e *Propionibacterium* spp. da batteriocine prodotte da enterococchi". *Industria Latte* **31**: 3–15.
- 97.** Piard, J. C.; Desmazeaud, M., 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 2–Bacteriocins and other antibacterial substance. *Lait* **72**: 113–142.
- 98.** Simonetta, A. C.; Moragues de Velasco, L. G.; Frisón, L. N., 1997. Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**: 139–143.
- 99.** Müller, D.; Carrasco, M.; Tonarelli, G.; Simonetta, A., 2009. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* LP 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *J. Appl. Microbiol.* **106**: 2031–2040.
- 100.** Cardoso, M.; Manzo, R.; Tonarelli, G.; Simonetta A., 2012. Characterisation of a cell-free supernatant obtained from cultures of *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24 with antagonistic activity against bacteria, yeasts and moulds. *Int. J. Dairy Technol.* **65**, 4: 568–577.
- 101.** Roldán, M.; Otero, J.; Villarreal, F.; Baroni, M.; Carrasco, M.; Álvarez, C.; Russell-White, K.; Méndez, E.; Simonetta, A., 2011. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, **31**, 1: 37–41.
- 102.** Carrasco, M.; Scarinci, H.; Simonetta, A., 2002. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products. *Aust. J. Dairy Technol.* **57**: 15–19.
- 103.** Barefoot, S. F.; Klaenhammer, T. R., 1983. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1808–1815.
- 104.** Talarico, T.L.; Casas, I.A.; Chung, T.C.; Dobrogosz, W.J., 1988. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produce by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 1854–1858.
- 105.** Klaenhammer, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**: 337–349.
- 106.** Schillinger, U., 1990. Bacteriocins of lactic acid bacteria. En: "Biotechnology and Food Safety". Bills, D.D.; Kung, S. (eds.), Butterworth-Heinemann. Boston, USA, 55–74.
- 107.** Toba, T.; Yoshieka, E.; Itoh, T., 1991. Lactacin, a bacteriocin produce by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **12**: 43–45.
- 108.** Larsen, A.G.; Vogensen, F.K.; Josephsen, J., 1993. Antimicrobial activity of a lactic acid bacteria isolated from sourdoughs: purification and characterization of Bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 2: 113–122.
- 109.** Vaughan, F. E.; Caplice, E.; Looney, R.; O'Rourke, N.; Coveney, H.; Daily, C.; Fitzgerald, G. F., 1994. Isolation from food sources of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. *J. Appl. Bacteriol.* **76**: 118–123.
- 110.** Malik, R.K.; Kumar, N.; Nageswara Rao, K.; Mathur, D.K., 1994. Bacteriocins–antibacterial proteins of lactic acid bacteria: a Review. *Microbiol. Alim. Nutr.* **12**, 2: 117–132.
- 111.** Kelly, W.J.; Asmundson, R.V.; Huang, C.M., 1996. Characterization of plantaricin Kw30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 657–662.
- 112.** Tahara, T.; Oshimura, M.; Umezawa, C.; Kanatani, K., 1996. Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin j1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JMC 1132. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 892–897.
- 113.** Revol-Junelles, A.M.; Mathis, R.; Krier, F.; Fleury, Y.; Delfour, A.; Lefebvre, G., 1996. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 syntetizes two distinct bacteriocins. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**, 2: 120–124.
- 114.** Manca de Nadra, M.C.; Sandino de Lameilas, D.; Strasser de Saad, A. M., 1998. Pediocin

- n5p from *Pediococcus pentosaceus*: adsorption on bacterial strains. *Int. J. Food Microbiol.* **39**: 79–85.
- 115.** Yanagida, F.; Chen, Y.; Onda, T.; Shinohara, T., 2005. Duracin L28–1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28–1, isolated from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* **40**: 430–435.
- 116.** Roberts, R.F.; Zottola, E.A.; McKay, L.L., 1992. Use of a nisin-producing starter **culture** suitable for cheddar cheese manufacture. *J. Dairy Sci.* **75**: 2353–2363.
- 117.** Ryan, M.P.; Rea, M.C.; Hill, C.; Ross, R.P., 1996. An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *App. Environ. Microbiol.* **62**: 612–619.
- 118.** Dicks, L.M.T.; Mellett, F.D.; Hoffman, L.C., 2004. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Sci.* **66**: 703–708.
- 119.** Messens, W.; Verluyten, J.; Leroy, F.; de Vuyst, L., 2003. Modelling growth and **bacteriocin** production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *Int. J. Food Microbiol.* **81**: 41–52.
- 120.** Ruiz-Barba, J.L.; Cathcart, D.P.; Warner, P.J.; Jiménez-Díaz, R., 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. *App. Environ. Microbiol.* **60**: 2059–2064.
- 121.** Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 39–86.
- 122.** De Vos W.M.; Kuipers, O.P.; Van Der Meer, J.R.; Siezen, R.J., 1995. Maturation pathway of nisin and other lantibiotic: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **17**: 427–437.
- 123.** Moll, G.N.; Konings, W.N.; Driessen, A.J.M., 1999. Bacteriocins: mechanisms of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J.* **76**: 185–198.
- 124.** Aymerich, T.; Holo, H.; Håvarstein, L. S.; Hugas, M.; Garriga, M.; Nes, I.F., 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1676–1682.
- 125.** Nissen-Meyer, J.; Holo, H.; Havarstein, L.S.; Sletten, K.; Nes, I.F., 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* **174**: 5686–5692.
- 126.** Moll, G.N.; Ubbink-Kok, T.; Hildeng-Hauge, H.; Nissen-Meyer, J.; Nes, I.F.; Konings, W.N.; Driessen, A.J.M., 1996. Lactococin G is a potassium ion-conducting, two component bacteriocin. *J. Bacteriol.* **178**: 600–605.
- 127.** Cintas, L.M.; Casaus, P.; Havarstein, L.S.; Hernández, P.E.; Nes, I.F., 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4321–4330.
- 128.** Venema, K.; Abee, T.; Haandrikman, A.J.; Leenhouts, K.J.; Konings, W.N.; Venema, G., 1993. Mode of action of lactococin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1041–1048.
- 129.** Jiménez-Díaz, R.; Ruiz-Barba, J.L.; Cathcart, D.P.; Holo, H.; Nes, I.F.; Sletten, K.H.; Warner, P.J., 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4459–4463.
- 130.** Martínez-Bueno, M.; Maqueda, M.; Gálvez, A.; Samyn, B.; van Beeumen, J.; Coyette,

- J.; Valdivia, E. 1994. Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **176**: 6334–6339.
- 131.** Cintas, L.M.; Rodríguez, J.M.; Fernández, M.F.; Stetten, K.; Nes, I.F.; Hernández, P.E.; Holo, H., 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2643–2648.
- 132.** Cintas, L.M.; Casaus, P.; Holo, H.; Hernández, P.E.; Nes, I.F.; Havarstein, L.S., 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* **180**: 1988–1994.
- 133.** Cotter, P.D.; Hill, C.; Ross, R.P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* **3**: 777–788.
- 134.** Rea, M.C.; Ross, R.P.; Cotter, P.D.; Hill, C.; Drider, D.; Rebuffat, S., 2011. Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. En: Drider, D.; Rebuffat, S. (eds.), "Prokaryotic Antimicrobial Peptides". Springer (New York, USA), **I** 29–53.
- 135.** Gallagher, N.L.; Sailer, M.; Niemczura, W.P.; Nakashima, T.T.; Stiles, M.E.; Vederas, J.C., 1997. Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecyl-phosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type II_a bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* **36**: 15062–15072.
- 136.** Drider, D.; Fimland, G.; Héchard, Y.; McMullen, L. M.; Prévost, H., 2006. The continuing story of class II_a bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 2: 564–582.
- 137.** Nes, I.F.; Diep, D.B.; Havarstein, L.S.; Brurberg, M.B.; Eijsink, V.; Holo, H., 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J.* **70**: 113–128.
- 138.** Håvarstein, L.S.; Holo, H.; Nes, I.F., 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with the leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology* **140**: 2383–2389.
- 139.** Håvarstein, L.S.; Diep, D.B.; Nes, I.F., 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* **16**: 229–240.
- 140.** Ennahar, S.; Sashihara, T.; Sonomoto, K.; Ishizaki, A., 2000. Class II_a bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 85–106.
- 141.** Leer, R.J.; van der Vossen, J.M.B.M.; van Giezen, M.; van Noort, J.M.; Pouwels, P.H., 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* **141**: 1629–1635.
- 142.** Worobo, R.W.; VanBelkum, M.J.; Sailer, M.; Roy, K.L.; Vederas, J.C.; Stiles, M.E., 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.* **177**: 3143–3149.
- 143.** Tomita, H.; Fujimoto, S.; Tanimoto, K.; Ike, Y., 1996. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative element pY117. *J. Bacteriol.* **178**: 3583–3593.
- 144.** Sablon, E.; Contreras, B.; Vandamme, E., 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* **68**: 21–60.
- 145.** McAuliffe, O.; Ross, R.P.; Hill, C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 285–308.
- 146.** Jack, R.W.; Tagg, J.R.; Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 171–200.
- 147.** Rodríguez, J.M.; Dodd, H.M. 1996. Genetic determinants for the biosynthesis of nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. *Microbiología* **12**: 61–74.

- 148.** Diep, D.B.; Håvarstein, L.S.; Nes, I.F., 1995. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Microbiol.* **18**: 631–639.
- 149.** Nissen-Meyer, J.; Nes, I.F., 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* **167**: 67–77.
- 150.** Quadri, L.E.N.; Sailer, M.; Roy, K.L.; Vederas, J.C.; Stiles, M.E., 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV 17B. *J. Biol. Chem.* **269**, 16: 12204–12211.
- 151.** Quadri, L.E.N.; Sailer, M.; Terebiznik, M.R.; Roy, K.L.; Vederas, J.C.; Stiles, M.E., 1995. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 y BM1. *J. Bacteriol.* **177**: 1144–1151.
- 152.** Bhugaloo-Vial, P.; Dousset, X.; Metivier, A.; Sorokine, O.; Anglade, P.; Boyaval, P.; Marison, D., 1996. Purification and amino acid sequences of piscicocins VIa y VIb, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* VI that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4410–4416.
- 153.** Casaus, P.; Nielsen, T.; Cintas, L.M.; Nes, I.F.; Hernández, P.E.; Holo, H., 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* **143**: 2287–2294.
- 154.** Ramakrishnan, V.; Narayan, B.; Halami, P., 2012. Combined effect of enterocin and lipase from *Enterococcus faecium* NCIM5363 against food borne pathogens: mode of action studies. *Curr. Microbiol.* **65**: 162–169.
- 155.** Moragues, L.; Frisón, L.; Simonetta, A., 1998. Antibacterial activity of bacteriocin-like substances produced by enterococci strains. *Microbiol. Alim. Nutr.* **16**: 281–288.
- 156.** Moragues, L.; Rozeck, C.; Simonetta, A., 2003. Caracterización preliminar de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas de enterococos. *Revista Argentina de Lactología* **22**: 21–32.
- 157.** Barefoot, S.F.; Klaenhammer, T.R., 1984. Purification and characterization of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**: 328–334.
- 158.** Stoffels, G.; Nes, I.F.; Guthmundsdóttir, A., 1992. Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J. Appl. Bacteriol.* **73**: 309–316.
- 159.** Tichaczek, P.S.; Nissen-Meyer, J.; Nes, I.F.; Vogel, R.F.; Hammes, W.P., 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 460–468.
- 160.** Carrasco, M.; Scarinci, H.; Simonetta, A., 1997. Inhibitory spectrum of bacteriocin-like substances produced by *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiol. Alim. Nutr.* **15**: 299–306.
- 161.** Carrasco, M.; García, M.; Scarinci, H.; Simonetta, A., 1999. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiol. Alim. Nutr.* **17**: 49–58.
- 162.** Hurst, A., 1981. Nisin. En: "Advances in Applied Microbiology". Perlman, D.; Laskin, A.I. (Eds.), Academic Press, Inc. New York, USA. 85–123.
- 163.** Hastings, J.W.; Sailer, M.; Jonson, K.; Roy, K.L.; Vederas, J.C.; Stiles, M.E., 1991. Characterization of leucocin A–UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.* **173**: 7491–7500.
- 164.** Cintas, L. M., 1995. Caracterización bioquímica y genética parcial de la pediocina L50, una nueva bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* L50 aislado de embutidos crudos curados". Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. España.

- 165.** Piard, J.C.; Delorme, F.; Giraffa, G.; Commissaire, J.; Desmazeaud, M., 1990. Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ481. *Neth. Milk Dairy J.* **44**: 143–158.
- 166.** Ten Brink, B.; Minekus, M.; van der Vossen, J.M.B.M.; Leery, R.J.; Huis in't Veld, J.H.J., 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.* **77**: 140–148.
- 167.** Lloyd, A.G.; Drake, J.J., 1975. Problems posed by essential food preservatives. *Br. Med. Bull.* **31**, 3: 214–219.
- 168.** Jarvis, B.; Mahoney, R.R., 1969. Inactivation of nisin by alpha-chymotrypsin. *J. Dairy Sci.* **52**: 1448–1449.
- 169.** Jarvis, B.; Farr, J., 1971. Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin-inactivating enzyme from *Bacillus cereus*. *Biochem. Biophys. Acta*, **227**: 232–240.
- 170.** Hurst, A., 1983. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. En: "Antimicrobials in Foods". Braun, A.L.; Davidson, P.M. (eds.), Marcel Dekker New York, USA. 327–351.
- 171.** West, C.A.; Warner, R.J., 1988. Plantaricin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. *FEMS Microbiol. Lett.* **49**: 163–165.
- 172.** Jiménez-Díaz, R.; Ríos-Sánchez, R.M.; Desmazeaud, M.; Ruiz-Barba, J.L.; Piard, J.C., 1993. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1416–1424.
- 173.** Lewus, C.B.; Sun, S.; Montville, T.J., 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 143–149.
- 174.** Ellison, J.S.; Kauter, J. A., 1970. Purification and some properties of two botocins. *J. Bacteriol.* **104**: 19–26.
- 175.** Mahony, D.E., 1974. Bacteriocin susceptibility of *Clostridium perfringens*: a provisional typing schema. *Appl. Microbiol.* **28**: 172–176.
- 176.** Tagg, J.R.; Dajani, A.S.; Wannamaker, L.W., 1975. Bacteriocin of a group B *Streptococcus*: partial purification and characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **7**: 764–772.
- 177.** Rogers, A. H., 1972. Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *Streptococcus mutans*. *Appl. Microbiol.* **24**: 294–295.
- 178.** Clarke, D.J.; Robson, R.M.; Morris, J.G., 1975. Purification of two *Clostridium* bacteriocins by procedures appropriate to hydrophobic proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **7**: 256–264.
- 179.** Hale, E.M.; Hinsdill, R.D., 1973. Characterization of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* strain 462. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**: 634–640.
- 180.** Dajani, A.S.; Taube, Z., 1974. Plasmid mediated production of staphylococcin in bacteriophage type 71 *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **5**, 6: 594–598.
- Jetten, A.M.; Vogels, G.D., 1973. Characterization and extrachromosomal control of bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**: 49–57.**
- 182.** Schlegel, R.; Slade, H.D. 1973. Properties of a *Streptococcus sanguis* (group H) bacteriocin and its separation of the competence factor of transformation. *J. Bacteriol.* **11**: 655–661.
- 183.** Zhang, L.; Parente, J.; Harris, S.M.Woods; D.E.; Hancock, R.E.; Falla, T.J., 2005. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 7: 2921–2927.
- 184.** Ramamoorthy, A.; Thennarasu, S.; Lee, D.K.; Tan, A.; Maloy, L., 2006. Solid-state NMR investigation of the membrane-disrupting mechanism of antimicrobial peptides MSI-78 and MSI-594 derived from magainin 2 and melittin. *Biophys. J.* **91**, 1: 206–216.
- 185.** Brouwer, C.P.; Rahman, M.; Welling, M.M. , 2011. Discovery and development of a synthetic

peptide derived from lactoferrin for clinical use. *Peptides* **32**, 9: 1953–1963.

186. Velden, W.J.; van Iersel, T.M.; Blijlevens, N.M.; Donnelly, J.P., 2009. Safety and tolerability of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1–11 (hLF1–11). *BMC Med.* **7**, 44. doi: 10.1186/1741-7015-7-44.

187. Mygind, P.H.; Fischer, R.L.; Schnorr, K.M.; Hansen, M.T.; Sönksen, C.P.; Ludvigsen, S.; Raventós, D.; Buskov, S.; Christensen, B.; De Maria, L.; Taboureau, O.; Yaver, D.; Elvig-Jørgensen, S.G.; Sørensen, M.V.; Christensen, B.E.; Kjaerulf, S.; Frimodt-Møller, N.; Lehrer, R.I.; Zasl-off, M.; Kristensen, H.H., 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* **437**, 7061: 975–980.

188. Vilhena, C.; Bettencourt A., 2012. Daptomycin: a review of properties, clinical use, drug delivery and resistance. *Mini Rev. Med. Chem.* **12**, 3: 202–209.

189. Stryjewski, M.E.; Barriere, S.L.; Rubinstein, E.; Genter, F.C.; Lentnek, A.L.; Magana-Aquino, M.; Luna, C.M.; Niederman, M.S.; Torres, A.; Corey, G.R., 2013. Telavancin versus vancomycin for bacteraemic hospital-acquired pneumonia. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **42**, 367–369.

190. Karaoui, L.R.; El-Lababidi, R.; Chahine, E.B., 2013. Oritavancin: an investigational lipopeptide antibiotic. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* **70**, 1: 23–33.

191. Jabés, D.; Brunati, C.; Candiani, G.; Riva, S.; Romanó, G.; Donadio, S., 2011. Efficacy of the new lantibiotic NAI-107 in experimental infections induced by multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4: 1671–1676.

192. Muriana, P.M., 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in foods. *J. Food Prot. (suppl.)*, 54–63.

193. Stiles, M.E., 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J.* **70**: 331–345.

194. Leistner, L., 1992. Food preservation by combined methods. *Food Res. Int.* **25**: 151–158.

195. Morgan, S.M.; Galvin, M.; Kelly, J.; Ross, R.P.; Hill, C., 1999. Development of a lactacin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. *J. Food Prot.* **62**: 1011–1016.

196. Morgan, S.M.; Galvin, M.; Ross, R.P.; Hill, C., 2001. Evaluation of a spray-dried lactacin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. *Lett. App. Microbiol.* **33**: 387–391.

197. Lucas, R.; Grande, M.J.; Abriouel, H.; Maqueda, M.; Ben Omar, N.; Valdivia, E.; Martínez-Cañamero, M.; Gálvez, A., 2006. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food Chem. Toxicol.* **44**: 1774–1781.

198. Vandenberg, P.A., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with metabolic growth. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 221–238.

199. González, C.F., 1989. Method for inhibiting bacterial spoilage. Patent 4.883.673. EE UU.

200. Vandenberg, P.A.; Pucci, M.J.; Kunka, B.S.; Vedamuthu, E.R., 1989. Method for inhibiting *Listeria monocytogenes* using a bacteriocin. European Patent Application 89101125.6.

201. Bourdreaux, D.P.; Matrozza, M.A., 1992. Method and composition for extending the shelf life of processed meats. Patent 5.137.319. EE UU.

202. Abee, T., 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanism of producer organism. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**: 1–10.

203. Holzapfel, W.H.; Geisen, R.; Schillinger, U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* **24**: 343–362.

204. Schillinger, U.; Geisen, R.; Holzapfel, W.H., 1996. Potential of antagonistic microorganisms

- and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* **7**: 158–164.
- 205.** Aymerich, M.T.; Hugas, M., 1998. Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. *Eurocarne* **72**: 39–49.
- 206.** Hanlin, M.B.; Kalchayanand, N.; Ray, P.; Ray, B., 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *J. Food Prot.* **56**: 252–255.
- 207.** Mulet–Powell, N.; Lacoste–Armynot, A.M.; Vinas, M.; Simeon De Buochberg, M., 1998. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic bacteria. *J. Food Prot.* **61**: 1210–1212.
- 208.** Dodd, H.M.; Horn, N.; Gasson, M.J., 1995. A cassette vector for protein engineering the lantibiotic nisin. *Gene* **162**: 163–164.
- 209.** Dodd, H.M.; Horn, N.; Giffard, C.J.; Gasson, M.J., 1996. A gene replacement strategy for engineering nisin. *Microbiology* **142**: 47–55.
- 210.** Quadri, L.E.N.; Yan, L.Z.; Stiles, M.E.; Vederras, J.C., 1997. Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2: overproduction of the antimicrobial peptide, its engineered variants and its precursor in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**: 3384–3368.
- 211.** Fimland, G.; Blingsmo, O.R.; Sletten, K.; Jung, G.; Nes, I.F.; Nissen–Meyer, J., 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin–like bacteriocins: the C–terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3313–3318.
- 212.** Fimland, G.; Jack, R.; Jung, G.; Nes, I.F.; Nissen–Meyer, J., 1998. The bactericidal activity of pediocin PA–1 is specifically inhibited by a 15–mer fragment that spans the bacteriocin from the center towards the C terminus. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 5057–5060.
- 213.** Caldwell, S.L.; McMahon, D.J.; Oberg, C.J.; Broadbent, J.R., 1996. Development and characterization of lactose–positive *Pediococcus* species for milk fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 936–941.
- 214.** Chikidans, M.L.; Venema, K.; Ledebøer, A.M.; Venema, G.; Kok, J., 1995. Expression of lactococcin A and pediocin PA–1 in heterologous hosts. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**: 183–189.
- 215.** Horn, N.; Martínez, M.I.; Martínez, J.M.; Hernández, P.E.; Gasson, M.J.; Rodríguez, J.M.; Dodd, H.M., 1998. Production of pediocin PA–1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 818–823.
- 216.** Buyong, N.; Kok, J.; Luchansky, J.B., 1998. Use of a genetically enhanced, pediocin–producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4842–4845.
- 217.** Horn, N.; Martínez, M.I.; Martínez, J.M.; Hernández, P.E.; Gasson, M.J.; Rodríguez, J.M.; Dodd, H.M., 1999. Enhanced production of pediocin PA–1, and coproduction of nisin and pediocin PA–1, by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4443–4450.
- 218.** Schoeman, H.; Vivier, M.A.; Du Toit, M.; Dicks, L.M.T.; Pretorius, I.S., 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 647–656.
- 219.** Cheigh, C.I.; Park, H.; Choi, H.J.; Pyun, Y.R., 2005. Enhanced nisin production by increasing genes involved in nisin Z biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164. *Biotechnol. Lett.* **27**: 155–160.
- 220.** Uteng, M.; Hauge, H.H.; Markwick, P.R.; Mantzilas, D.; Nissen–Meyer, J.; Muhle–Goll, C., 2003. Three–dimensional structure in lipid micelles of the Pediocin–like antimicrobial peptide Sakacin P and a Sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C–terminal disulfide bridge. *Biochemistry* **42**: 11417–11425.
- 221.** Chen, H.; Hoover, D.G., 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci.* **2**, 3: 82–100.