

# BIOCONSERVACIÓN DE ALIMENTOS LÁCTEOS

M<sup>a</sup> JOSÉ GRANDE BURGOS, RUBÉN PÉREZ PULIDO, ANTONIO COBO MOLINOS,  
ROSARIO LUCAS, ANTONIO GÁLVEZ<sup>1</sup>

## RESUMEN

Las bacteriocinas son sustancias de naturaleza peptídica que muestran un elevado potencial como bioconservantes gracias a su actividad antibacteriana frente a microorganismos patógenos y alterantes. En leche y derivados lácteos, se han hecho numerosos estudios que demuestran la eficacia de las bacteriocinas frente a patógenos como *Listeria monocytogenes* o alterantes como los clostridios productores de gas. El efecto antimicrobiano de las bacteriocinas en productos lácteos puede mejorar considerablemente cuando se emplean en combinación con otras barreras como conservantes químicos o tratamientos físicos no térmicos. Otras posibles aplicaciones de las bacteriocinas incluyen acelerar el tiempo de maduración del queso y un mejor control de la fermentación.

**Palabras clave:** bacteriocinas, bioconservación, lácteos

## ABSTRACT

Bacteriocins are antibacterial peptides with a strong potential in food biopreservation due to their antibacterial activities against pathogenic and spoilage bacteria. Many studies have demonstrated the efficacy of bacteriocins in milk and dairy products against human pathogens like *Listeria monocytogenes* or food spoilage bacteria like gas-producing clostridia.

---

<sup>1</sup> Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas, s/n. 23071-Jaén. E-mail: agalvez@ujaen.es

The antibacterial effect of bacteriocins in dairy products can be improved in combination with other hurdles such as chemical preservatives or non-thermal physical preservation methods. Other possible applications of bacteriocins include acceleration of cheese ripening and a better control of lactic acid fermentations in dairy products.

**Keywords:** bacteriocins, biopreservation, dairy foods

## 1. BIOCONSERVACIÓN Y BACTERIOCINAS

Los términos *bioconservación* o *biocontrol* son utilizados para referirse al uso de la microbiota natural o controlada o de los productos antibacterianos para ampliar la vida útil y mejorar la seguridad de los alimentos (Stiles, 1996). Debido a que las bacterias del ácido láctico (BAL) se reproducen de forma natural en muchos sistemas alimentarios y además se utilizan desde hace mucho tiempo en alimentos fermentados, son consideradas generalmente como seguras (GRAS) y presentan un gran potencial para su utilización en la bioconservación.

Las bacteriocinas se definen como proteínas ó péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente, que pueden ser modificados o no después de la etapa de traducción (Jack et al 1995). Las bacteriocinas que proceden de bacterias Gram-positivas se clasifican generalmente según su tamaño, estructura y modificaciones posttraduccionales. Klaenhammer (1993) define cuatro clases de bacteriocinas producidas por las BAL. Bacteriocinas de la Clase I o “lantibióticos” son pequeños péptidos, sintetizados ribosómicamente sometidos a una amplia modificación posterior a la traducción. Contienen lantionina, residuos b-metil-lantionina y aminoácidos deshidratados. Las bacteriocinas de la Clase II son pequeñas (4-6 kDa), son péptidos sintetizados ribosómicamente, estables a la temperatura y que se diferencian de los lantibióticos en que no son sometidos a una amplia modificación post-traducciona, excepto en la pérdida de un péptido señal (si este está presente) durante el transporte celular.

## 2. POTENCIAL DE LAS BACTERIOCINAS EN EL CONTROL DE PATÓGENOS Y ALTERANTES

La leche podría actuar como vehículo de bacterias patógenas humanas (revisado por Claeys et al., 2013). La pasteurización de la leche como paso previo a su consumo o a la elaboración de productos lácteos es necesaria y recomendable. El proceso de pasteurización disminuye la carga microbiana causante del deterioro, pero no esteriliza el producto. Algunos alimentos tradicionales, todavía se elaboran

con fermentos lácteos a partir de leche sin pasteurizar lo que abre un debate sobre los beneficios de consumir leche sin pasteurizar frente a leche pasteurizada (Claeys et al., 2013). Las bacteriocinas son una buena opción para mejorar la inocuidad de la leche y los productos lácteos (especialmente en aquellos elaborados a partir de leche sin pasteurizar) y al mismo tiempo ofrecen algunas ventajas, como la rapidez en la maduración del queso.

La adición de nisina a la leche sin pasteurizar resolvería problemas específicos de vida útil del producto asociados al mantenimiento de la temperatura adecuada durante el transporte a larga distancia con sistemas de refrigeración inadecuados (Davies y Delves-Broughton, 1999; Thomas et al., 2000). La aplicación de nisina en combinación con tratamientos térmicos disminuyó los valores D de bacterias como *Bacillus cereus* y *Geobacillus stearothermophilus* y de la microbiota natural, lo que demuestra que es posible la aplicación de tratamientos térmicos más leves y al mismo tiempo extender la vida útil de la leche, incluso bajo condiciones de refrigeración mínimas. Otro enfoque sugerido fue utilizar recubrimientos de polietileno que contienen nisina inmovilizada para el envasado de la leche. En los ensayos experimentales, el uso de una película de polietileno de baja densidad recubierta con nisina retrasó el crecimiento de una cepa indicadora de *Micrococcus luteus* en leche pasteurizada y UHT (Mauriello et al., 2005). Resultados similares se demostraron con plástico recubierto con nisina y/o quitosano en un copolímero de acetato de vinilo-etileno durante el almacenamiento de la leche pasteurizada (Lee et al., 2004), o con películas de hidroxipropilmetilcelulosa reticulada (HPMC) que contenían nisina (Sebti et al., 2003). La actividad antibacteriana de la nisina en la leche puede mejorarse combinándola con otros agentes antimicrobianos, como la monolaurina, el sistema de la lactoperoxidasa (LPS), la lisozima o la reuterina (Gálvez et al., 2007).

En los últimos años se han realizado también estudios sobre la aplicación de nisina en combinación con pulsos eléctricos (PEF) o alta presión hidrostática (HHP) con el propósito de aumentar la eficacia en los tratamientos, debido a que originan un menor impacto en el valor nutricional y en las propiedades organolépticas de los alimentos (Black et al., 2005; Sobrino-López y Martín-Belloso, 2008). La combinación de nisina y PEF ha demostrado mejorar la inactivación de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* en sustratos como leche descremada, suero de leche, o medios simulados de leche ultrafiltrada (Calderón-Miranda et al., 1999a; Pol et al., 2001; Terebiznik et al., 2002; Sobrino-López et al., 2006; Sobrino-López y Martín-Belloso, 2008). La aplicación de tratamientos combinados de nisina y HHP (con o sin lisozima) aumentó la inactivación de bacterias asociadas con la leche tales

como *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *L. innocua*, y *Lactobacillus viridescens* (García-Graells et al., 1999; Black et al., 2005).

La nisina se utiliza mucho en la industria láctea no sólo para inhibir la aparición de gas por parte de *Clostridium tyrobutyricum* en quesos, sino también para inhibir la aparición de *Clostridium botulinum* en quesos procesados y productos derivados y prevenir también el crecimiento de bacterias contaminantes como *L. monocytogenes* (Davies y Delves - Broughton, 1999; Thomas et al., 2000; Thomas y Delves-Broughton, 2001; Deegan et al., 2006; Sobrino -López y Martín-Belloso, 2008). También se utiliza muchos en otros productos lácteos pasteurizados, postres refrigerados, leche aromatizada, nata o leches en polvo (Thomas et al., 2000). En el queso de tipo Ricotta, la adición de nisina (2,5 mg/l) inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* durante más de 8 semanas, mientras que el queso elaborado sin nisina contenía altos niveles de esta bacteria en las dos primeras semanas. Además la combinación de nisina y HHP podría ser útil para la inactivación de las endosporas y bacterias mesófilas en el queso (Capellas et al., 2000; López- Pedemonte et al., 2003; Arqués et al., 2005).

Con el fin de evitar los efectos negativos de la nisina en los cultivos iniciadores del queso y también mejorar su estabilidad y conseguir una liberación más lenta y gradual, la nisina Z se encapsuló en liposomas ( Benech et al., 2002a , b). La adición de liposomas cargados con nisina inhibió a *Listeria* en el queso Cheddar ( Benech et al., 2002a , b). En otro ensayo, la nisina encapsulada en nanovesículas de fosfatidilcolina de soja consiguió mejores resultados en comparación con la adición de nisina libre en el control de *L. monocytogenes* en queso Minas Frescal almacenado a 7 °C, manteniendo la concentración de listerias más baja que en los controles no tratados durante al menos 21 días (Malheiros et al., 2012).

La aplicación de nisina inmovilizada en plásticos activados con polietileno/ poliamida, consiguió reducir la población de bacterias lácticas, de *Listeria innocua* y *S. aureus* en quesos loncheados (Scannell et al., 2000). Además, la inmovilización de nisina en películas de caseinato sódico se ensayó frente a *Listeria innocua* tanto en superficie como en profundidad en el queso mini Babybel, disminuyendo en 1,1 log UFC/g los recuentos de *L. innocua* en la superficie del queso después de una semana de almacenamiento a 4 °C en comparación con las muestras control (Cao - Hoang et al., 2010).

Las cepas productoras de la variante natural de nisina Z también han conseguido reducir los niveles de *C. tyrobutyricum* en el queso. Por ejemplo, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, un productor de nisina Z aislado de queso fresco, fue capaz de producir

nisina Z en queso Vidiago semiduro. La actividad de la nisina Z alcanzó en un día una concentración de 1600 UA/ml que se mantuvo durante 15 días. La producción de nisina disminuyó en 3 unidades logarítmicas los niveles de crecimiento de una cepa de *C. tyrobutyricum* en quesos inoculados, mientras se observaba un considerable crecimiento bacteriano en quesos control inoculados con un cultivo iniciador comercial y suplementados con nitrato (Rilla et al., 2003). En otro estudio de queso manchego contaminado artificialmente con endosporas de *C. beijerinckii*, al ser inoculado con una cepa de *L. lactis* productora de nisina y lacticina 481 como cultivo iniciador, no se observó deterioro tras 120 días de maduración y las concentraciones de ácido láctico y compuestos volátiles fueron similares a los controles (Garde et al., 2011).

La lacticina 3147 es otra bacteriocina procedente de *Lactococcus* con un elevado potencial en la conservación de productos lácteos (Ross et al., 1999; O'Sullivan et al., 2002). La adición de lacticina 3147 en polvo inactiva rápidamente a *L. monocytogenes* y también reduce los recuentos de células viables de *S. aureus* en preparados lácteos para lactantes, además de ser muy eficaz contra *L. monocytogenes* en yogur natural y en el queso Cottage (Morgan et al., 2001). La adición de un 10% de lacticina 3147 en polvo reduce en sólo 60 minutos la concentración de células viables de *Listeria* por debajo de niveles detectables en yogur y una concentración del 85% mata las células en el queso cottage a los 120 min de su aplicación (Morgan et al., 2001). Sin embargo, sería necesaria la optimización de los preparados de lacticina 3147 en polvo para aumentar la actividad específica y disminuir la concentración necesaria para conseguir la total inhibición microbiana. La lacticina 3147 producida por lactococos inhibe la germinación de las esporas de *C. tyrobutyricum* y previene la contaminación en el proceso final de maduración en quesos semiduros, demostrando también una inhibición considerable en lactobacilos heterofermentativos y sus efectos asociados durante la maduración del queso (Martínez-Cuesta et al., 2010). La lacticina 481 muestra un espectro antimicrobiano reducido, siendo activa principalmente frente a otra BAL, *Clostridium tyrobutyricum* (O'Sullivan et al., 2003) y *L. monocytogenes* (Ribeiro et al., 2016). Un estudio reciente demostró que la adición de preparados de lacticina 481 semipurificados en queso fresco almacenado bajo refrigeración reducía los niveles de *L. monocytogenes* en 3 ciclos logarítmicos al cabo de 3-7 días (Ribeiro et al., 2016).

Otros bacteriocinas de interés en la bioconservación de alimentos lácteos son las propionicas. Las propionibacterias se utilizan en algunas fermentaciones lácticas y puede producir bacteriocinas de amplio espectro de inhibición (Holo et al., 2002). Microgard™ es una preparación comercial que contiene un péptido antimicrobiano producido por *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* (Weber et al., 1986), utili-

zado en algunos países como ingrediente principal en productos lácteos como el queso Cottage y el yogur. Las bacteriocinas producidas por las cepas de *Propionibacterium jensenii* P126 y P1264 están patentadas como agentes anti- bacterianos que controlan el crecimiento de ciertas bacterias de ácido láctico. Estas bacteriocinas podría ser particularmente útiles en el control de la sobre-acidificación del yogur disminuyendo el sabor amargo que frecuentemente aparece en este producto.

Los enterococos son un grupo relevante en cuanto a su capacidad de producir bacteriocinas, aunque también son conocidos como patógenos oportunistas. Quizás por este motivo son pocas las enterocinas estudiadas para la bioconservación de leche y derivados lácteos. Por ejemplo, la enterocina CCM 4231 capaz de inhibir a *L. monocytogenes* y *S. aureus* en la leche (Lauková et al., 1999a). La enterocina AS-48 (50 mg / ml) añadida a la leche descremada de vaca reduce parcialmente la población de *S. aureus* durante las primeras 10 h de incubación a 28 °C, pero no inhibe su crecimiento a las 24 h (Muñoz et al., 2007). La enterocina KP muestra una elevada actividad antilisteria, si bien su efecto bactericida en leche se vio disminuido a medida que aumentaba el contenido graso de la leche o la concentración de inóculo (Yildirim et al., 2016). Varias bacteriocinas producidas por enterococos se han utilizado en la bioconservación de productos lácteos (Giraffa, 1995; Foulquié Moreno et al., 2006; Gálvez et al., 2008). Las enterocinas CCM 4231, CRL35 o AS-48 pueden reducir los niveles de *L. monocytogenes*, *S. aureus* o *B. cereus* en productos lácteos. Una concentración de enterocina CRL35 adicionado al queso de cabra (10.400 UA/ml) disminuyó la población de *L. monocytogenes* en 9 unidades logarítmicas en el proceso final de maduración, sin afectar a su calidad (Fariás et al., 1999). Lauková et al. (1999b) publicó que la adición de enterocina CCM 4231 (3200 UA/ml) en yogur inoculado con *L. monocytogenes* redujo en 2 log CFU/ml los niveles de este patógeno tras 24 h de incubación a 30 °C.

La adición de enterocina CCM 4231 a leche descremada disminuyó los recuentos de viables de *S. aureus* de 10 log UFC/ml a 2 UFC/ml después de 24 h de incubación a 27°C. Esta bacteriocina también redujo los niveles de *Listeria* en “ bryndza “ (un tradicional queso blando de origen eslovaco de leche de oveja) y en el queso Saint- Paulin (Lauková et al., 2001, Lauková y Czikková, 2001) pero no consiguió una eliminación bacteriana completa. Por ejemplo, la adición de enterocina CCM 4231 durante la preparación del queso Saint- Paulin ( 3200 UA/ml) redujo en casi 5 unidades log la población de *L. monocytogenes* durante una semana, proliferando nuevamente después (Lauková et al ., 2001) .

Las bacteriocinas procedentes de enterococos se han utilizado para preparar películas o recubrimientos activos para su uso en la industria quesera. En un estu-

dio, Iseppi et al. (2008) se han ensayado los efectos de plásticos recubiertos con una película activa de enterocina 416K1 en superficies de queso fresco, frente a *Listeria*. En las muestras de queso fresco envasadas con una película activa de enterocina, los recuentos de *Listeria* fueron menores que los controles en aproximadamente 1 unidad logarítmica durante 28 días en muestras almacenadas a 4 °C y durante 7 días para muestras almacenadas a 22 °C. Esto demuestra que la aplicación de bacteriocinas no sólo reduce los niveles de *Listeria* en superficies de quesos, sino que también es una barrera efectiva contra la contaminación de los mismos.

La enterocina AS-48 podría ser utilizada en la bioconservación de platos preparados y postres lácteos. Las células vegetativas y endosporas de *B. cereus* inoculadas tanto en arroz hervido como en una fórmula infantil a base de arroz disuelto en leche el tratamiento con enterocina AS-48 (20 a 35  $\mu\text{g/g}$ ) redujo el recuento de células viables por debajo de los niveles de detección además de evitar la producción de enterotoxina durante 15 días de almacenamiento en un rango de temperatura de entre 6 y 37 °C (Grande et al., 2006a). En postres y productos de panadería, el efecto bactericida de AS-48 frente a *S. aureus*, *B. cereus* y *L. monocytogenes* dependía del tipo de alimento y de cuáles fueron las bacterias diana (Martínez Viedma et al., 2009). La eficacia demostrada de menor a mayor grado se detectó en postres realizados a base de soja y en pudín de gelatina, respectivamente. *L. monocytogenes* se inactivó completamente con concentraciones de bacteriocina de 5 a 25  $\mu\text{g/g}$ , dependiendo del sustrato, y *B. cereus* fue inactivado con una concentración de 15 a 50  $\mu\text{g/g}$ . Además la bacteriocina inhibió la producción de proteasas por parte de *B. cereus* en el pudín de gelatina evitando así la consecuente licuefacción. La inactivación de *S. aureus* requiere una mayor concentración de bacteriocina (50  $\mu\text{g/g}$ ) y también una menor densidad de población de los estafilococos, no superior a 5 log UFC/g. La bacteriocina también mostró un grado variable de actividad frente a *S. aureus* en otros sustratos como confitura de calabaza, leche de almendras o caramelo líquido, pero fue ineficaz en cremas de vainilla o de chocolate (Martínez Viedma et al., 2009). En crema de chocolate, la interacción de la bacteriocina con el sustrato alimenticio requiere concentraciones más altas de bacteriocina, sin embargo la actividad antimicrobiana se incrementó notablemente con combinaciones de bacteriocina AS-48 y eugenol, 2-nitropropanol o Nisaplina.

Los combinados de pediocina PA-1/AcH son interesantes para su aplicación en productos lácteos debido a la gran actividad bactericida frente a *Listeria*, a la estabilidad en soluciones acuosas a temperatura ambiente o durante procesos de congelación-descongelación, y al amplio rango de pH para el cuál son activos (Nes et al., 1996; Rodríguez et al., 2002). Las preparaciones comerciales que contienen pediocina en

forma de productos Alta™ se pueden utilizar como ingredientes en alimentos lácteos. Varios estudios demuestran que la adición de pediocina PA-1/AcH es eficaz en la reducción de los niveles de *L. monocytogenes* en varios tipos de productos lácteos como queso Cottage duro, semiduro y blando (Rodríguez et al., 2002)

Los enterococos están bien adaptados al crecimiento en leche donde producen cantidades suficientes de bacteriocina para inhibir bacterias patógenas como *L. monocytogenes* entre otras. Por ejemplo, *E. faecalis* EJ97 produce enterocina EJ97 durante su cultivo en leche desnatada, aunque su capacidad de inhibición frente a *L. monocytogenes* está limitada a una población baja ( $\leq 10^3$  UFC/ml; García et al, 2004). *E. faecium* cepa F58, aislada de queso de cabra Jben marroquí, también produce bacteriocina en leche y consiguió una inhibición parcial de *L. monocytogenes* durante su cultivo (Achemchem et al., 2006). También, un preinóculo de la cepa F58 en leche durante 12 horas antes de la inoculación de listeria (3 log UFC/ml) produjo suficiente bacteriocina para su inactivación durante todo el proceso de incubación. La cepa *E. faecalis* A-48-32 es capaz de producir suficiente bacteriocina en leche de vaca desnatada como para reducir la población de *Bacillus cereus* por debajo de niveles de detección durante 72 h de incubación a 30 °C (Muñoz et al., 2004). En co-cultivos hechos en leche descremada, esta cepa también era capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* (Muñoz et al., 2007).

A menudo se encuentran enterococos formando parte de la microbiota accidental en alimentos fermentados, entre ellos muchos quesos tradicionales que muestran diversas propiedades bioquímicas de interés tecnológico en las fermentaciones lácticas, como la producción de ácidos orgánicos y la acidificación, actividades proteolíticas y peptidolítica, actividades lipolíticas y esterasa, metabolismo del citrato y del piruvato, junto con su capacidad para producir bacteriocinas (Giraffa, 2003). Los enterococos productores de bacteriocina se han estudiado como co-cultivos en la fabricación de queso debido a su estabilidad, a la presencia natural en estos y a la producción de varias bacteriocinas con fuerte actividad frente a *Listeria* (Giraffa, 1995; Foulquié Moreno et al., 2003; Franz et al., 2007; Gálvez et al., 2008). La inoculación del queso Jben de leche de cabra con la cepa bacteriocinogénica *E. faecium* F58 como co-cultivo, dio lugar a una gran disminución en la concentración de viables de *L. monocytogenes*, indetectables tras 1 semana de almacenamiento 22 °C (Achemchem et al., 2006). La cepa bacteriocinogénica 7C5 de *E. faecium* (productora de enterocina AS-48), fue adicionada como co-cultivo en el queso blando, consiguiendo así la muerte de *L. monocytogenes* y *L. innocua* sin alterar la actividad de acidificación del cultivo iniciador (Giraffa et al., 1995). El ensayo de cepas productoras de enterocina AS-48 en quesos, mostró una gran inhibición de *L. monocytogenes*, de *B. cereus* y de *S. aureus* (Núñez et al., 1997; Muñoz



et al., 2004, 2007). Durante la producción de queso manchego, la cepa de *E. faecalis* INIA 4 compitió con la microbiota del queso produciendo enterocina (Núñez et al., 1997). En quesos inoculados con la cepa INIA 4, los recuentos de *L. monocytogenes* Ohio disminuyeron por debajo de 1 log UFC / g en el queso madurado durante un máximo de 60 días. Sin embargo, *L. monocytogenes* Scott A no parece verse afectada por la inoculación de la cepa productora de enterocina en el queso. En un estudio diferente, cuando se inoculó un cocultivo de la cepa de *E. faecalis* A-48-32 productora de enterocina AS-48 con *B. cereus* durante la elaboración del queso, el recuento de células viables de bacilos disminuyó 5,6 unidades logarítmicas con respecto a los controles tras 30 días de maduración (Muñoz et al., 2004). La eficacia de la cepa A-48-32 frente a *S. aureus* fue menor que frente a *B. cereus*, pero los recuentos de estafilococos en quesos tratados disminuyeron al menos 1 log CFU/g por debajo de los controles durante un mes de almacenamiento (Muñoz et al., 2007).

Las cepas de enterococos y lactococos productoras de bacteriocinas (como enterocinas I, TAB 7, TAB 57, AS-48, nisina A, nisina Z y lacticina 481) han sido ensayadas en combinación con tratamientos por HHP con el objetivo de mejorar la seguridad de los quesos elaborados a partir de leche cruda. La inoculación de la leche con cepas bacteriocinogénicas se llevó a cabo antes de la elaboración del queso, después se aplicó el tratamiento HHP para aumentar la actividad bactericida frente a *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* O157: H7.

Durante la elaboración de quesos *smear-ripened*, ciertas manipulaciones aumentan el riesgo de contaminación en superficie y de contaminación cruzada con *L. monocytogenes*. En el proceso de elaboración del queso Taleggio, se inoculó *E. faecium* 7C5 para producir bacteriocina (Giraffa et al., 1995b) e inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* Ohio en la superficie del queso (Giraffa y Carminati, 1997). Cuando *E. faecium* WHE 81 aislada de queso Munster, productora de varias bacteriocinas, se inoculó en la superficie del queso durante el proceso de untando, junto con un inóculo de baja concentración de *L. monocytogenes* (50 UFC/g) se observó la inhibición completa del crecimiento en comparación con los controles inoculados con una cepa no productora (Izquierdo et al., 2009).

### 3. MEJORA DE LA MADURACIÓN DEL QUESO

Las bacteriocinas podrían ser utilizadas para acelerar la maduración del queso. *L. lactis* DPC3286 (productora de lactococinas A, B, y M) se ensayó como cocultivo iniciador en la elaboración de queso cheddar para inducir la lisis de una cepa

iniciadora acidificante sensible a esta bacteria (Morgan et al., 1997) o en combinación con un cultivo iniciador resistente a estas bacteriocinas. En los quesos tratados con el cultivo iniciador resistente a las bacteriocinas, los niveles de aminoácidos libres aumentaron junto con una mayor liberación de la enzima intracelular lactato deshidrogenasa (LDH), y los quesos mostraron un sabor menos amargo en comparación con los controles (Morgan et al., 2002). Otro estudio mostró que la síntesis de nisina Z por la cepa productora *L. lactis* ssp. *lactis* biovar diacetylactis UL719 durante la elaboración de queso cheddar aumentaba la lipólisis y proteólisis, así como la formación de péptidos hidrófilos e hidrófobos, mejorando las características sensoriales del queso (Benech et al., 2003). La producción de lacticina 481 por la cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* DPC5552 induce la liberación de las enzimas intracelulares LDH y postprolina dipeptidil aminopeptidasa por la cepa iniciadora *L. lactis* HP sin producir una inhibición completa de su crecimiento (O'Sullivan et al., 2002b). La síntesis de bacteriocinas también induce la liberación de niveles elevados de LDH del cultivo iniciador sin aumentar la acidificación en el queso cheddar. Otros estudios indican que la lacticina 481 es capaz de acelerar el inicio de la lisis celular (O'Sullivan et al., 2003), y que cultivos productores de lacticina 481 producen la lisis temprana de las células de *Lactobacillus helveticus* en el queso Hispánico aumentando de esta forma la actividad proteolítica (Garde et al., 2006). La aplicación de cocultivos de cepas productoras de bacteriocina para acelerar la maduración del queso puede ser una alternativa más económica que adicionar enzimas líticas exógenas (Papagianni y Anastasiadou, 2009).

#### 4. CONTROL DE LA FERMENTACIÓN LÁCTICA

Otro uso de cultivos productores de bacteriocinas sería para conseguir la inactivación de las BAL no estárter (NSLAB) durante la maduración del queso. NSLAB pueden proliferar durante la maduración y, a menudo tienden a convertirse en la microbiota dominante en el queso. El papel exacto de cepas NSLAB en el desarrollo del sabor aún no está claro, pero sin duda contribuye a la calidad de muchos quesos (Fox et al., 1998). El control de NSLAB sigue siendo una asignatura pendiente en las industrias lácteas. Su crecimiento puede inducir variaciones sensoriales en el queso y causar defectos como formación de cristales de lactato de calcio (debido las isoformas de L-lactato y D-lactato), aparición de mal sabor, pero también pueden ejercer efectos beneficiosos sobre los quesos. Se sugiere la adición de cepas productoras de lacticina 3147 para mejorar la calidad del queso a través de la inhibición de la microbiota NSLAB durante la maduración (Ryan et al., 2001; Deegan et al., 2006). El cocultivo de una cepa adaptada de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* productora de lacticina-3147

(aislada a partir de un queso Cheddar) junto con un cultivo iniciador de lacticin-3147 mejoró el control de la microbiota de las NSLAB durante la maduración.

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las bacteriocinas han sido objeto de numerosos estudios que demuestran su potencial aplicación en la industria láctea. A pesar de ello, tan solo unas pocas bacteriocinas han conseguido establecerse en el mercado como bioconservantes. No obstante, otros aspectos como la imperiosa necesidad de controlar a los patógenos y la diseminación de resistencias a antibióticos están haciendo que el uso de la bacteriocinas sea nuevamente reconsiderado. A su vez, el desarrollo de nuevas herramientas como la secuenciación masiva o el análisis bioinformático están aportando contribuciones importantes que permiten nuevos enfoques como el desarrollo de bacteriocinas de diseño, más activas, con mayor estabilidad en los alimentos, y con nuevas propiedades funcionales (Field et al., 2018).

## BIBLIOGRAFÍA

- Achemchem F, Abrini J, Martínez-Bueno M et al (2006). Control of *Listeria monocytogenes* in goat's milk and goat's yben by the bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* F58 strain. *J Food Protect* 69:2370–2376.
- Arqués JL, Rodríguez E, Gaya P et al (2005a). Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *Int Dairy J* 15:893-900.
- Benech RO, Kheadr EE, Lacroix C et al (2002b). Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during Cheddar cheese ripening. *Appl Environ Microbiol* 68:5607-5619.
- Benech RO, Kheadr EE, Lacroix C et al (2003). Impact of nisin producing culture and liposome-encapsulated nisin on ripening of *Lactobacillus* added-Cheddar cheese. *J Dairy Sci* 86:1895-1909.
- Benech RO, Kheadr EE, Laridi R et al (2002a). Inhibition of *Listeria innocua* in Cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or in situ production by mixed culture. *Appl Environ Microbiol* 68:3683-3690.
- Black EP, Kelly AL, Fitzgerald GF (2005). The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk. *Inn Food Sci Emerg Technol* 6:286-292.
- Calderón-Miranda ML, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG (1999). Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *Int J Food Microbiol* 51:19-30.
- Cao-Hoang L, Chaîne A, Grégoire L et al (2010). Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food Microbiol* 27(7):940-4.
- Capellas M, Mor-Mur M, Gervilla R et al (2000). Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goats' milk fresh cheese. *Food Microbiol* 17:633-641.

- Claeys WL, Cardoen S, Daube G et al (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control* 31:251-262.
- Davies EA, Delves-Broughton J (1999). Nisin. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*. R. Robinson, C. Batt, and P. Patel, eds., pp. 191-198. Acad. Press, London.
- Deegan LH, Cotter PD, Hill C et al (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy J* 16:1058-1071.
- Farías ME, Nuñez de Kairuz M, Sesma F et al (1999). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin enterocin CRL35 during goat cheese making. *Milchwissenschaft* 54:30-32.
- Field D, Ross RP, Hill C (2018). Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. *Curr Opin Food Sci* 20: 1-6.
- Foulquié Moreno MR, Rea MC, Cogan TM et al (2003). Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int J Food Microbiol* 81: 73-84.
- Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E et al (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 106:1-24.
- Fox PF, McSweeney PLH, Lynch CM (1998). Significance of non-starter lactic acid bacteria in cheddar cheese. *Aust J Dairy Technol* 53:83-89.
- Franz CMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH et al (2007) Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping into a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* 31:293-310.
- Gálvez A, Abriouel H, López RL et al (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 120:51-70.
- Gálvez A, Lopez RL, Abriouel H et al (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 28:125-152.
- García MT, Martínez Cañamero M, Lucas R et al (2004a). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Int J Food Microbiol* 90:161-170.
- García-Graells C, Masschalck B, Michiels CW (1999). Inactivation of *Escherichia coli* in milk by high-hydrostatic-pressure treatment in combination with antimicrobial peptides. *J Food Prot* 62:1248-1254.
- Garde S, Ávila M, Arias R et al (2011). Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. *Int J Food Microbiol* 150(1):59-65.
- Garde S, Ávila M, Gaya P et al (2006). Proteolysis of Hispánico cheese manufactured using lactacin 481-producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* INIA 639. *J Dairy Sci* 89:840-849.
- Giraffa G (1995). Enterococcal bacteriocins: their potential as *anti-Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol* 12:291-299.
- Giraffa G (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol* 88(2-3):215-222.
- Giraffa G, Carminati D, Tarelli GT (1995). Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 705. *J Food Prot* 58:621-623.
- Giraffa G, Carminati D (1997). Control of *Listeria monocytogenes* in the rind of Taleggio, a surface-smear cheese, by a bacteriocin from *Enterococcus faecium* 7C5. *Sci Aliment* 17:383-391.
- Giraffa G, Picchioni N, Neviani E et al (1995). Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during Taleggio cheesemaking and ripening. *Food Microbiol* 12:301-307.
- Grande M<sup>ª</sup>J, Lucas R, Abriouel H et al (2006). Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *Int J Food Microbiol* 106:185-194.
- Holo H, Faye T, Brede DA et al (2002). Bacteriocins of propionic acid bacteria. *Lait* 82:59-68.

- Iseppi R, Pilati F, Marini M et al (2008). Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *Int J Food Microbiol* 123: 281-287.
- Izquierdo E, Marchioni E, Aoude-Werner D et al (2009). Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* 26:16-20.
- Jack R W, Tagg JR, Ray B (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59: 171-200.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12: 39-87.
- Lauková A, Czikkova S (1999). The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* 87:182-186.
- Lauková A, Czikková S (2001). Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from *Enterococcus faecium* on "bryndza", a traditional Slovak dairy product from sheep milk. *Microbiol Res* 156:31- 34.
- Lauková A, Czikková S, Burdová O (1999). Anti-staphylococcal effect of enterocin in Sunar® and yogurt. *Folia Microbiol* 44(6):707-711.
- Lauková A, Vlaemynick G, Czikková S (2001). Effect of enterocin CCM 4231 on *Listeria monocytogenes* in Saint-Paulin cheese. *Folia Microbiol* 46:157-160.
- Lee CH, Park H, Lee DS (2004). Influence of antimicrobial packaging on kinetics of spoilage microbial growth in milk and orange juice. *J Food Eng* 65:527-531.
- López-Pedemonte TJ, Roig-Sagués AX, Trujillo AJ (2003). Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin of lysozyme. *J Dairy Sci* 86:3075-3081.
- Malheiros Pda S, Sant'Anna V, Barbosa Mde S et al (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *Int J Food Microbiol* 156(3):272-7.
- Martínez-Cuesta M, Bengoechea J, Bustos I et al (2010). Control of late blowing in cheese by adding lacticin 3147-producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter. *Int Dairy J* 20:18-24.
- Martínez-Viedma P, Abriouel H, Ben Omar N et al (2009). Assay of enterocin AS-48 for inhibition of foodborne pathogens in desserts. *J Food Protect* 72:1654-1659.
- Mauriello G, De Luca E, La Storia A et al (2005). Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Lett Appl Microbiol* 41:464-469.
- Morgan S, Ross RP, Hill C (1997) Increasing starter cell lysis in Cheddar cheese using a bacteriocin-producing adjunct. *J Dairy Sci* 8:1-10.
- Morgan SM, Garvin M, Ross RP et al (2001). Evaluation of a spray-dried lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. *Lett Appl Microbiol* 33:387-391.
- Morgan SM, O'Sullivan L, Ross RP et al (2002). The design of a three strain starter system for Cheddar cheese manufacture exploiting bacteriocin-induced starter lysis. *Int Dairy J* 12:985-993.
- Muñoz A, Ananou S, Gálvez A et al (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism through heat and AS-48. *Int Dairy J* 17:760-769.
- Muñoz A, Maqueda M, Gálvez A et al (2004). Biocontrol of psychrotrophic enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a non fat hard type cheese by an enterococcal strain-producing enterocin AS-48. *J Food Prot* 67:1517-1521.
- Nes IF, Diep DB, Havarstein LS et al (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:113-128.

- Núñez M, Rodríguez JL, García E (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *J Appl Microbiol* 83:671- 677.
- O'Sullivan L, Morgan SM, Ross RP et al (2002b). Elevated enzyme release from lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic lactacin 481, produced by *Lactococcus lactis* DPC5552. *J Dairy Sci* 85:2130-2140.
- O'Sullivan L, Ross RP, Hill C (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84:593-604.
- O'Sullivan L, Ryan MP, Ross RP et al (2003). Generation of food-grade lactococcal starters which produce the lantibiotics lactacin 3147 and lactacin 481. *Appl Environ Microbiol* 69:3681-3685.
- Papagianni M, Anastasiadou S (2009). Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories* 8:3.
- Pol IE, Mastwijk HC, Slump RA et al (2001). Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment, and carvacrol. *J Food Prot* 64:1012-1018.
- Ribeiro SC, O'Connor PM, Ross RP, Stanton C, Silva CC (2016). An anti-listerial *Lactococcus lactis* strain isolated from Azorean Pico cheese produces lactacin 481. *Int Dairy J* 63: 18–28.
- Rilla N, Martínez B, Delgado T et al (2003). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *Int J Food Microbiol* 85:23–33.
- Rodríguez JM, Martínez MI, Kok J (2002). Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42:91-121.
- Ross RP, Galvin M, McAuliffe O et al (1999). Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:337-346.
- Ryan MP, Ross RP, Hill C (2001). Strategy for manipulation of cheese flora using combinations of lactacin 3147-producing and -resistant cultures. *Appl Environ Microbiol* 67:2699-2704.
- Scannell AG, Hill C, Ross RP et al (2000). Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins Lactacin 3147 and Nisaplin®. *Int J Food Microbiol* 60:241-249.
- Sebti I, Delves-Broughton J, Coma V (2003). Physicochemical properties and bioactivity of nisin-containing cross-linked hydroxypropylmethylcellulose films. *J Agric Food Chem* 51:6468–6474.
- Sobrino-López A, Martín-Belloso O (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *Int Dairy J* 18:329–343.
- Stiles EM (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 70: 331-345.
- Terebiznik MR, Jagus RJ, Cerrutti P et al (2002). Inactivation of *Escherichia coli* by a combination of nisin, pulsed electric fields, and water activity reduction by sodium chloride. *J Food Prot* 65:1253-1258.
- Thomas LV, Clarkson MR, Delves-Broughton J (2000). Nisin. In: A,S, Naidu, ed., pp. 463-524. *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC-Press, FL.
- Thomas LV, Delves-Broughton J (2001). New advances in the application of the food preservative nisin. *Adv Food Sci* 2:11-22.
- Weber GH, Broich WA (1986). Shelf-life extension of cultured dairy foods. *C Dairy Prod J* 21:19.
- Yildirim Z, Öncül N, Yildirim M, Karabiyikli Ş (2016). Application of lactococin BZ and enterocin KP against *Listeria monocytogenes* in milk as biopreservation agents. *Acta Aliment* 45: 486–492.