

INTRODUCCIÓN

1. Bacterias del Ácido Láctico

Las bacterias del ácido láctico constituyen un grupo de bacterias Gram-positivas que presentan una considerable variedad de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas.

La descripción general de las bacterias incluidas en el grupo es que son cocos o bacilos no esporulados (con la sola excepción del género *Sporolactobacillus*) y Gram-positivos, los cuales producen ácido láctico como el mayor producto final durante la fermentación de carbohidratos.

Revisiones taxonómicas recientes sugieren que las bacterias del ácido láctico comprenden los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Sporolactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, y *Vagococcus*. Sin embargo los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* conforman el corazón del grupo de bacterias del ácido láctico, y son los comúnmente aceptados como integrantes de este grupo por la gran mayoría de los especialistas.

La clasificación de las bacterias del ácido láctico en diferentes géneros se ha basado tradicionalmente en la morfología, modo de fermentación de la glucosa, desarrollo a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, capacidad de desarrollarse a altas concentraciones salinas, y tolerancia a pH ácidos o alcalinos, pero para algunos géneros descritos recientemente se han usado características adicionales tales como composición en ácidos grasos.

También ha ayudado a la clasificación de las bacterias del ácido láctico la medición de las relaciones filogenéticas con el secuenciamiento de rRNA, clarificando la filogenia del grupo. La mayoría de los géneros del grupo forman a su vez sub-grupos filogenéticamente diferentes, pero algunos, en particular *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, son muy heterogéneos y es así que los grupos filogenéticos no se correlacionan con la clasificación basada en caracteres fenotípicos. Actualmente se desarrollan diferentes herramientas para la clasificación e identificación de las bacterias del ácido láctico; las

más promisorias para su uso rutinario son técnicas de análisis de ácidos nucleicos, secuenciación de rRNA parcial y patrones de proteínas solubles.

Se pueden distinguir entre las bacterias del ácido láctico dos caminos diferentes de fermentación de azúcares. Uno de ellos es la glicólisis (camino de Embden-Meyerhof), que resulta en la producción casi exclusiva de ácido láctico como producto final bajo condiciones estándares, por lo que se le llama fermentación homoláctica. El otro es el camino de la 6-fosfogluconato/fosfocetolasa, que produce cantidades significativas de otros productos finales, tales como etanol, acetato y dióxido de carbono, además de producir ácido láctico. A este metabolismo se lo denomina fermentación heteroláctica. Sin embargo diferentes condiciones de desarrollo pueden alterar significativamente la formación del producto final por las bacterias del ácido láctico.

Las bacterias del ácido láctico producen una fuerza motriz protónica fundamentalmente mediante una H^+ ATPasa localizada en la membrana, que funciona a expensas del ATP. Dicha fuerza motriz protónica conduce el transporte de metabolitos e iones hacia adentro de la célula. La salida de los productos finales del metabolismo puede contribuir a la formación de la fuerza motriz protónica, ahorrando de este modo el consumo de ATP. El transporte de los azúcares está mediado principalmente por un sistema de permeasas dependiente de la fuerza motriz protónica o por un sistema de fosfotransferasa de azúcar-fosfoenolpiruvato. Este último está acoplado al metabolismo de los carbohidratos y es regulado por éste. El transporte de aminoácidos está mediado por sistemas dependientes de la fuerza motriz protónica o sistemas ligados a la unión fosfato (Salminen y col., 1993).

La preservación de los alimentos fermentados mediante las bacterias del ácido láctico se debe primariamente a la conversión de los azúcares en ácidos orgánicos (fundamentalmente láctico y acético), causando reducción del pH y removiendo los azúcares como fuente nutriente (Lidgren y col., 1990). Las bacterias del ácido láctico se encuentran involucradas en la producción de alimentos fermentados comerciales como leche, vegetales, frutas, carne, y productos derivados de cereales. Son usadas además como agentes transformadores de la leche (participan en la formación de aromas y cualidades reológicas de quesos y leches fermentadas) y de otros productos alimenticios, y poseen diferentes roles tecnológicos. También juegan un rol higiénico

importante mediante la síntesis de una variedad de compuestos inhibitorios, los cuales evitan el desarrollo de bacterias patógenas; entre ellos se encuentran: peróxido de hidrógeno, diacetilo, productos finales del catabolismo celular (diacetilo, alcoholes, dióxido de carbono, reuterina), enzimas bacteriolíticas como fosfolipasa A, y sustancias antibióticas que son sintetizadas mediante complejos multienzimáticos (Piard y col., 1992). Por último, algunas especies de bacterias lácticas son capaces de sintetizar y secretar al medio sustancias antimicrobianas de naturaleza proteica, conocidas como bacteriocinas, las cuales tienen capacidad potencial de inhibir una gran variedad de otros microorganismos (Tagg y col., 1976).

Desde tiempos de Louis Pasteur y Robert Koch, la ciencia ha reconocido la necesidad esencial de controlar a los microorganismos perjudiciales de nuestro entorno. El descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1929 abrió las puertas al uso de antibióticos terapéuticos por parte de las comunidades médicas y veterinarias, a fin de combatir organismos causantes de enfermedades específicas. Aunque está prohibido el uso de antibióticos terapéuticos en alimentos, la utilización de aditivos antagonísticos con propiedades antimicrobianas o preservadoras se ha vuelto de interés comercial, tanto en la seguridad alimentaria como en la preservación. En alimentos y bebidas, la adición de compuestos antimicrobianos a productos procesados se ha vuelto un arma tradicional en el arsenal para la preservación alimentaria. Dentro de una gran cantidad de preservadores alimentarios comerciales, están como un subgrupo las bacteriocinas. Las bacteriocinas son producidas por bacterias y poseen propiedades antibióticas, pero generalmente no se las llama con el término “antibióticos” a fin de no crear confusión con los antibióticos tradicionales (Cleveland y col., 2001).

Las bacteriocinas difieren de la mayoría de los antibióticos tradicionales en que son de naturaleza proteica y generalmente poseen una especificidad estrecha de acción frente a cepas de especies relacionadas o semejantes (Tagg y col., 1976). Las bacteriocinas son polipéptidos sintetizados ribosomalmente, que poseen actividad bactericida y que son rápidamente digeridos por las proteasas en el tracto digestivo humano (Joerger y col., 2000). Cabe aclarar que la efectividad de las mismas en alimentos se ha vuelto limitada por varias razones, entre ellas los altos costos, que

impiden el amplio uso de las bacteriocinas como aditivos alimentarios. De todos modos, las investigaciones que se llevan a cabo tienen la finalidad no sólo de encontrar nuevas y más efectivas bacteriocinas, sino también de optimizar la producción de las conocidas, a fin de que éstas tengan importancia biológica y viabilidad económica.

Aunque la bacteriocina Nisina se ha usado como preservador alimentario desde 1950 en diferentes países, recién en 1988 la FDA aprobó su uso en quesos pasteurizados, estableciendo un precedente legal en Estados Unidos para la aplicación de las bacteriocinas como aditivos alimentarios (Registro Federal, 1988). Esta bacteriocina aún sigue siendo la más importante comercialmente, aunque otras tantas se han desarrollado y caracterizado a fin de que se apruebe su uso (Chikindas y col., 2002). Debido a que las bacterias del ácido láctico han sido consumidas desde hace muchas generaciones en alimentos cultivados sin efectos adversos, es que las mismas continúan siendo una fuente preferida para obtener bacteriocinas utilizables en alimentos, ya sea bajo la forma de compuestos purificados o extractos de cultivos. Se puede obtener un medio fermentado con bacteriocina cruda mediante el desarrollo de la bacteria del ácido láctico productora de la bacteriocina en un sustrato complejo. El fermentado crudo contiene otras sustancias además de la bacteriocina. El término "bacteriocina purificada" implica que la bacteriocina no es un medio fermentado con la bacteriocina cruda, si no que ésta es el único compuesto antimicrobiano que se encuentra en el preparado purificado.

Dado que las bacterias del ácido láctico se usan como cultivos iniciadores en la manufactura de alimentos fermentados, ellas son candidatas obvias a las modificaciones genéticas; así es que podría ser necesario que las cepas de uso industrial tengan genes reguladores de la síntesis de bacteriocinas de interés (Chen y col., 2003). Esto se conoce en la actualidad como construcción de bacterias del ácido láctico de grado alimentario modificadas genéticamente (Konings y col., 2000). El conocimiento de las bases genéticas de la síntesis de las bacteriocinas abre nuevas posibilidades a fin de incrementar su producción a escala industrial. Se debería considerar el uso potencial de las bacterias ácido lácticas como huéspedes productores de proteínas heterólogas, muy útiles en alimentos y en la industria alimentaria, o para propósitos médicos.

2. Bacteriocinas

Haciendo una breve reseña histórica, debemos decir que fue Pasteur junto a Joubert en el año 1877, quienes reportaron por primera vez la existencia de interacciones antagonísticas entre las bacterias. Lo más importante de sus descubrimientos fue anunciar aplicaciones prácticas potenciales de esas observaciones. De todos modos, no tuvieron en cuenta ninguna caracterización para el antagonismo que habían observado (Cordiés Jackson y col., 1998).

La primera documentación clara de la naturaleza de un agente antibiótico de este tipo fue dada por Gratia en 1925, quien explicó la producción de colicinas por parte de bacterias coliformes, demostrando que la clase V de *E. coli* (virulenta en infecciones experimentales) producía en el medio líquido una sustancia dializable y termoestable (luego llamada Colicina V), que inhibía a altas diluciones el desarrollo de otras especies de *E. coli*.

En los años siguientes fueron descubiertas muchas colicinas producidas por miembros cercanos de la familia de *E. coli* (*Enterobacteriaceae*) y sustancias antimicrobianas tipo colicina producida por bacterias no coliformes.

El término más general de "bacteriocinas" fue propuesto por Jacob en 1953, quien específicamente definió a los antibióticos proteicos del tipo de las colicinas (Jacob y col., 1953).

2.1 Definición

Según la definición clásica (Tagg y col.,1976), los criterios para considerar como bacteriocina a un compuesto antimicrobiano producido por microorganismos Gram-positivos son seis:

1. Poseer en su estructura un componente proteico activo biológicamente.
2. Tener un espectro de inhibición reducido, generalmente sobre microorganismos relacionados taxonómicamente.
3. Presentar acción bactericida frente a las cepas sensibles.
4. Ser codificada por plásmidos.
5. Tener sitios de unión específicos en la membrana de las cepas sensibles.
6. Ser producidas mediante biosíntesis letal (células suicidas).

Años después de realizada esta primera definición, las excepciones a estos seis criterios fueron tan numerosas que Konisky en 1982 concluyó que los únicos requisitos son: tener naturaleza proteica y no ser letales para la cepa productora. Es así que el término BLIS (sustancia inhibitoria parecida a una bacteriocina), que usó Tagg en 1991 para definir a aquellos compuestos que cumplieran parcialmente con los seis criterios expuestos, ha sido dejado de lado actualmente. Actualmente se puede definir a las bacteriocinas como péptidos bioactivos sintetizados a nivel ribosomal, y liberados extracelularmente, que son capaces de inhibir el desarrollo de bacterias taxonómicamente cercanas a la cepa productora o a otros géneros de bacterias Gram-positivas como : *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Listeria*, entre otros.

Las bacteriocinas no son antibióticos ya que difieren de los antibióticos convencionales en que son proteínas y presentan un espectro inhibitorio relativamente estrecho (Riley y col., 2002). Todo esto fue profundamente discutido y considerado en el año 1964 cuando la OMS aprobó el uso de la bacteriocina Nisina en los alimentos (Delves-Broughton y col., 1990).

2.2 Clasificación

Mientras que la definición establecida por Tagg en 1976 es cierta para muchas de las bacteriocinas estudiadas, los resultados obtenidos en la caracterización de estos compuestos han mostrado una gran heterogeneidad en cuanto a propiedades bioquímicas, peso molecular, espectro de inhibición, mecanismo de acción, sistemas de producción y secreción, así como en la organización genética de los operones que codifican estas funciones. Por ello Klaenhammer, en el año 1993, define tres clases diferentes de bacteriocinas:

2.2.1 Bacteriocinas Clase I

Estos péptidos son llamados lantibióticos, ya que contienen en su estructura aminoácidos no usuales como lantionina y beta-metil-lantionina. Son péptidos termoestables y dentro de este grupo están: Nisina A y Z (Sahl y col., 1995), Plantaricina C (Sahl y col., 2000) y Plantaricina W (Holo y col., 2001)

La producción de estas bacteriocinas está caracterizada por extensas modificaciones post-transcripcionales (maduración y procesamiento) del gen que produce el péptido activo.

2.2.2 Bacteriocinas Clase II

Son péptidos termoestables de peso molecular menor a 10 kDa. Al igual que la clase I, la clase II es el grupo más extensivamente estudiado y caracterizado (Ennahar y col., 2000). Estas bacteriocinas no sufren modificaciones postranscripcionales, contienen entre 30 y 60 aminoácidos y suelen ser catiónicas a pH neutro e hidrofóbicas y/o anfífilas. Más de 50 bacteriocinas pertenecientes a esta clase han sido aisladas y caracterizadas; en función de ello se han sub-agrupado de acuerdo a diferentes criterios, en subclases IIa, IIb y IIc.

Subclase IIa (bacteriocinas del tipo de las pediocinas):

El alineamiento de las secuencias de las bacteriocinas de Clase IIa muestra la existencia de regiones hidrofílicas altamente conservadas y cargadas en el extremo N-terminal: **YGNGV(X)C(X)₄C(X)V(X)₄A** (X significa cualquier aminoácido), mientras que la región C-terminal hidrofóbica y/o anfífilica es más variable (Figura 1a). Esta clase de bacteriocinas presenta un fuerte efecto inhibitorio sobre el género *Listeria*, lo que las convierte en excelentes agentes antimicrobianos para ser utilizadas en alimentos. Este subgrupo es uno de los más interesantes de estudiar en cuanto al modo de acción y a la relación entre estructura y función.

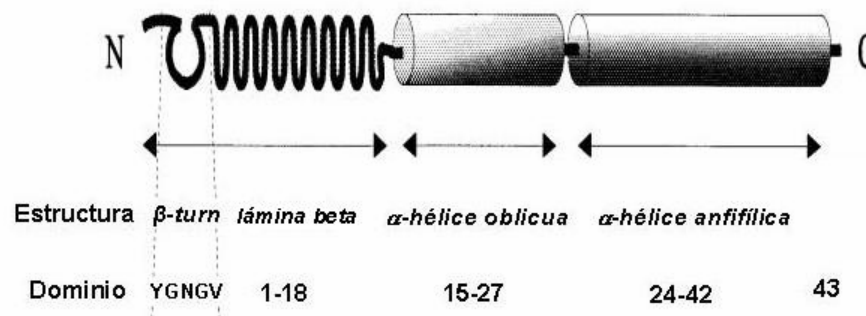
Figura 1a: Alineamiento de secuencias de las bacteriocinas de clase IIa (Ennahar y col., 2000).

Pediocina PA.1:	KYYGNGVTCGKHSCSVDWGKATTCIINNGAMAWATGGHQGNHKC
Psicocina V1a:	KYYGNGVSCNKNGCTVDWSKAIGIIGNNAAAANLTTGGAAGWNKG
Sakacina P:	KYYGNGVHCGKHSCCTVDWGTAIGNIGNNAAAANWATGGNAGWNK
Leucocina A:	KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW
Mesentericina Y10:	KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAASAGIHLRANGGNGFW
Divercina V41:	TKYYGNGVYCNKCKWVDWQASGCIGQTVVGGWLGGAIIPGK
Bavaricina MN:	TKYYGNGVYCNKCKWVDWQAAGGIGQTVVGGWLGGAIIPGK
(*)Carnob. B2:	VNYGNGVSCSKTKCSVNWQAFQERYTAGINSFVSGVASGAGSIGRRP
Bacteriocina 31:	ATYYGNGLYCNKQKCVVDWKNASREIGKIIVNGWVQHGPWAPR
Curvacina A:	ARSYGNGVYCNKCKWVNRGEATQSIIGGMISGWASGLAGM
Enterocina:	TTHSGYYGNGVYCTKNKCTVDWAKATTCIAGMSIGGFLGGAI

(*) Carnobacteriocina B2

Diferentes partes de la secuencia de esta clase de bacteriocinas desempeñan un rol distinto en el mecanismo de acción: la secuencia consenso N-terminal, YGNGV, que forma una estructura tipo β -turn; la parte hidrofílica N-terminal, que forma una estructura lámina beta anfifílica y que contiene un grupo de aminoácidos cargados positivamente (K_1 , K_{11} y H_{12}) y una serie de aminoácidos hidrofóbicos (V_7 , C_9 , C_{14} , V_{16} y W_{18}), responsables del proceso de interacción inicial con la membrana bacteriana; el dominio central formado por la α -hélice hidrofílica y ligeramente anfifílica; el extremo C-terminal hidrofóbico bajo la forma de α -hélice anfifílica y los puentes disulfuro, en el caso de Pediocina PA-1 (Figura 1b).

Figura 1b: Representación esquemática de la estructura de las bacteriocinas de Clase IIa Ennahar y col., (2000).



Subclase IIb: comprende bacteriocinas cuya actividad antimicrobiana depende de la acción complementaria de dos péptidos, que actúan en forma sinérgica, y están relacionados a una única proteína inmune, cuyo gen está unido a los genes estructurales, usualmente en una estructura tipo operón. Ej: Plantaricina W (Holo y col., 2001), Plantaricina 1.25 α y β (Remiger y col., 2000).

Subclase IIc: dentro de este grupo se ubican bacteriocinas de clase II que no se pueden ubicar en los otros dos grupos (IIa y IIb), comprende dos subgrupos, uno con péptidos que poseen uno o dos residuos de cisteína (tiolbióticos y cistibióticos respectivamente), entre ellos podemos mencionar a Enterocina B y Lactococina B; el otro subgrupo abarca péptidos sin residuos de cisteína (Lactococina A y Acidocina B) (Oscariz y col., 2001).

2.2.3 Bacteriocinas Clase III

Proteínas termolábiles, de peso molecular mayor a 30 kDa, formadas por complejos terciarios de proteína con lípidos y/o glúcidos, siendo estos últimos esenciales para la actividad antimicrobiana; por ej: Plantaricina B (West y col., 1988); Helveticina J (Joerger y col., 1990); Millericina B (Beukes y col., 2000).

2.3 Espectro de Inhibición

Es importante considerar ciertas observaciones generales aplicables a la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas (Ray y col., 1992):

1. Dentro de una misma especie, algunas cepas pueden ser sensibles y otras resistentes a una bacteriocina en particular.
2. Una cepa que aparece como sensible a una bacteriocina puede tener algunas células en su población que sean resistentes.
3. Una cepa puede ser sensible a una bacteriocina mientras es resistente a otro tipo muy similar de bacteriocina.
4. Las células de una cepa productora de una bacteriocina pueden ser sensibles a otra bacteriocina.
5. Los esporos de una cepa sensible a una determinada bacteriocina se vuelven sensibles luego de la germinación y bajo condiciones normales, las bacterias Gram-negativas no son sensibles a las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas.

Posiblemente, el mecanismo de resistencia de algunas bacterias Gram positivas y negativas a las bacteriocinas, esté asociado a las propiedades (composición) de la membrana externa y la pared celular de las células. El efecto inhibitorio de Nisina y Pediocina PA-1 sobre *Pseudomonas* no se observa a menos que se altere el componente lipopolisacárido de la membrana externa de dichos microorganismos (Stevens y col., 1992).

A pesar de estas afirmaciones, existen reportes recientes que describen nuevas bacteriocinas poseedoras de efecto inhibitorio directo sobre especies bacterianas Gram-negativas. Por ejemplo: bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum*

ST23LD y ST341LD, activas sobre bacterias Gram-positivas (*E. faecalis*, *L. casei* y *Streptococcus pneumoniae*), sobre *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* (Todorov y col., 2005); y una bacteriocina producida por *L. plantarum* activa sobre enterobacterias (Laniewska-Moroz y col., 2001).

Klaenhammer en 1988 definió dos clases de bacteriocinas en función de su espectro de actividad: una incluye a las bacteriocinas activas contra bacterias taxonómicamente cercanas a la cepa productora, que suelen ser utilizadas para facilitar el desarrollo de una especie bacteriana en particular, en competición con la flora natural; la otra comprende a aquellas bacteriocinas como Nisina y pediocinas con un espectro relativamente amplio de actividad contra bacterias Gram-positivas, las cuales tienen un valor adicional, ya que pueden combatir cierta flora patógena (Klaenhammer y col., 1998).

2.3.1 Espectro de inhibición de las bacteriocinas Clase I

Tienen en general amplio espectro de inhibición, como Nisina, única comercialmente aceptada como aditivo alimentario (Delves-Broughton., 1990), que es activa contra estreptococos, lactococos, lactobacilos, leuconostoc, pediococos, estafilococos, micrococos, *Listeria* y esporos de *Clostridium* y *Bacillus*. Lacticina 481 es un lantibiótico que además de ser activo contra muchas especies de bacterias lácticas, inhibe a *Clostridium tyrobutyricum*.

2.3.2 Espectro de inhibición de las bacteriocinas Clase IIa

El espectro de inhibición de esta clase de bacteriocinas es mucho más estrecho en comparación con los lantibióticos, como Nisina. Está dirigido primariamente contra cepas de *Listeria*, y además contra otras bacterias Gram-positivas tales como: estreptococos, lactococos, lactobacilos, leuconostoc, stafilococos, pediococos, micrococos, *Clostridium*, *Bacillus* y *Bochothrix* (Klaenhammer., 1993).

A pesar de poseer similitud de estructuras, las bacteriocinas de la clase IIa presentan disparidad considerable en cuanto a su espectro de acción. En parte, esto se explica considerando que tanto la especificidad y potencia de la actividad de esta

clase está influenciada por la composición lipídica de las membranas de las células sensibles (Chen y col., 1997a).

2.3.3 Espectro de inhibición de las bacteriocinas Clase III

Presentan un espectro de acción variado y en general amplio, dirigido contra bacterias taxonómicamente lejanas a la cepa productora (Klaenhammer y col., 1993).

2.4 Características fisicoquímicas

Las bacteriocinas producidas por las bacterias del ácido láctico 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 bajos pH.

Debido a su naturaleza proteica, todas las bacteriocinas son inactivadas por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y α -quimotripsina) y algunas de origen gástrico, como la 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, por tanto, los riesgos relacionados con el uso de antibióticos tradicionales (Lloyd y col., 1975).

Se han descrito otras bacteriocinas sensibles a enzimas no proteolíticas, como Plantaricina B, que se inactiva por una lipasa y por una alfa-amilasa (West y col., 1988); Plantaricina S, que se inactiva por enzimas glicolíticas, lipolíticas y fosfolipídicas (Jiménez -Díaz y col., 1990) y Leucocina S, que se inactiva por una amilasa (Lewus y col., 1990). Estas observaciones indican que la zona activa de estas bacteriocinas presenta composición heterogénea (Klaenhammer, 1993).

La resistencia térmica de estas bacteriocinas es generalmente elevada, aunque puede reducirse significativamente luego de su purificación (Davey y col., 1981). Esta característica de resistencia térmica parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria. Por otro lado, algunas bacteriocinas que son termolábiles, poseen mayor peso molecular y probablemente una estructura molecular más compleja.

Dentro de este grupo están las bacteriocinas pertenecientes a la clase III definida por Klaenhammer en 1993.

La termoresistencia generalizada de las bacteriocinas permite que permanezcan activas después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche (63°, 30 min; 72°, 15 min), lo que supondría una ventaja adicional para su utilización en productos pasteurizados. Las bacteriocinas son estables a pH ácido o neutro; esto es una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen (Piard y col., 1992). Por ejemplo, la máxima solubilidad y estabilidad de Nisina se da a pH 2, disminuyendo conforme aumenta el pH; las lactoestreptocinas son estables a pH entre 5,6 y 5,0, y se inactivan reversiblemente a pH igual o mayor a 6,0 (Kozak y col., 1978).

2.5 Mecanismo de Acción

2.5.1 Mecanismo de acción de las bacteriocinas Clase I

Son activas contra bacterias Gram-positivas, y se clasifican en tipo A y B según su modo de acción. Dentro del tipo A (Jung y col., 1991) están Nisina, Epidermina y Pep5. Son péptidos lineales, flexibles, anfipáticos y de carga neta positiva. Ejercen su acción antimicrobiana mucho más rápidamente que las del tipo B, formando poros de transmembrana citoplasmática, no selectivos y dependientes del voltaje. Los grupos hidrofílicos del péptido, cargados positivamente, interactúan mediante fuerzas de tipo electrostáticas con las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana celular y las cadenas laterales hidrofóbicas se introducen en el interior hidrofóbico de la misma, adoptando una conformación especial. Es probable que por el tamaño, este tipo de antibióticos necesiten agregarse para formar el poro.

El tipo B (Cinamicina, Mersacidina) son péptidos mucho más pequeños (20 aminoácidos aproximadamente), de estructura rígida, globular, con carga nula o negativa, y que ejercen su acción antimicrobiana inhibiendo la función de enzimas mediante la formación de complejos con componentes integrales específicos de membrana. Algunos, como la Mersacidina, inhiben la biosíntesis de la membrana celular a nivel de la transglicosilación (adición continua de unidades de disacáridos a moléculas precursoras de la pared celular), sin afectar la biosíntesis de DNA o RNA.

Esta actividad parecería estar relacionada con la presencia de una región conservada (secuencia consenso) que incluye a uno de los anillos tioéter completos.

2.5.2 Mecanismo de acción de las bacteriocinas Clase IIa

Se sabe que este tipo de bacteriocinas ejercen un efecto lítico sobre las células, mediante un mecanismo que involucra dos pasos, (Oscáriz y col., 2001).

1-Unión a la superficie celular.

2-Permeabilización de la membrana celular.

El primer paso consiste en una interacción electrostática, dado que este tipo de bacteriocinas presentan, en su mayoría, carga positiva a pH fisiológico, oscilando sus puntos isoeléctricos entre 8 y 11. De esta manera la porción catiónica conservada N-terminal contacta con las cabezas negativas de los fosfolípidos de membrana. No hay hasta el momento evidencia experimental concluyente que indique la presencia de receptores de membrana específicos para esta clase de bacteriocinas.

Solamente se sabe que el extremo C-terminal es importante en darle especificidad a la acción antimicrobiana (Fimland y col., 1996).

Luego del paso anterior, estas bacteriocinas que están muy poco estructuradas en solución acuosa, adquieren una conformación de hélice anfipática y se insertan en la membrana celular produciendo serios disturbios en sus funciones. Uno de ellos es la formación de canales iónicos a consecuencia de la permeabilidad, que altera el potencial transmembrana y el gradiente iónico, causando la pérdida del contenido celular (K^+ , ATP y moléculas pequeñas) y la muerte por consumo de reservas energéticas (Bruno y col., 1993).

La permeabilización de la membrana celular puede ocurrir mediante dos mecanismos (Figura 2 a):

-Permeabilización mediante la formación de poros ("barrel-stave").

-Mecanismo de acción en "carpeta".

A través del primero, la membrana sufre un adelgazamiento y debilitamiento a nivel del sitio donde actúa el péptido (Abee y col., 1995) de tal manera que se generan poros que conectan el interior celular con el exterior, dichos poros están mantenidos por arreglos lípido-bacteriocina. La estructura secundaria de estos péptidos, α -hélice o

lámina beta de carácter anfipático permitiría según este mecanismo (Ojcius y Young y col., 1991; Ennahar y col., 2000) la formación de oligómeros que atravesarían la membrana formando poros, en los que el lado apolar de la molécula se situaría próximo a la cadena hidrocarbonada de los lípidos de la membrana y el lado polar miraría al centro del poro (Figura 2b). El mecanismo en carpeta (Oren y col., 1998; Shai y col., 2002; Giangaspero y col., 2001) está basado en que algunas bacteriocinas adoptan fundamentalmente una orientación paralela a la membrana permeabilizándola aún en ausencia de un potencial transmembrana.

Figura 2a: Representación esquemática del mecanismo de acción de las bacteriocinas de clase IIa (Shai y col., 1999).

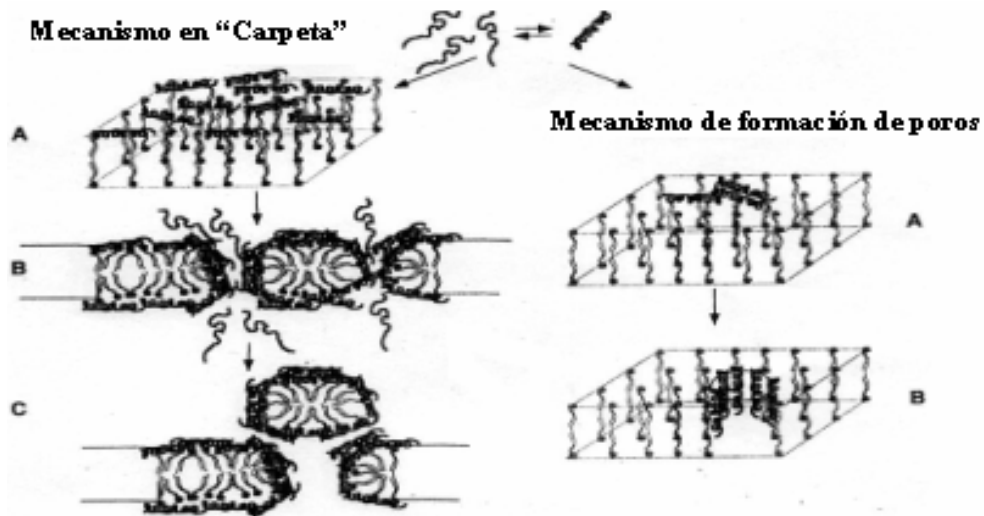
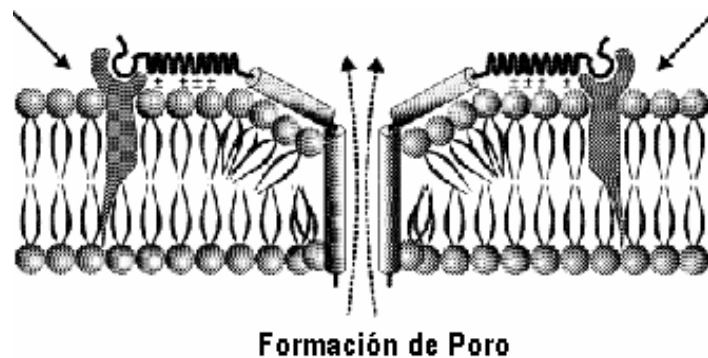


Figura 2b: Modelo predictivo sobre el mecanismo de acción en la formación de poros, de las bacteriocinas de clase IIa. (Ennahar y col., 2000)



2.5.3 Mecanismo de acción de las bacteriocinas Clase IIb

Presentan acción bactericida y/o bacteriostática mediante la permeabilización de la membrana celular a través de la formación de poros, que disipan el potencial de transmembrana. Raramente la actividad está centrada en un solo péptido de los dos que forman este tipo de bacteriocinas, sino que la actividad óptima se logra mediante una acción sinérgica de ambos participando en diferentes proporciones. Por ejemplo, en la Lactococina G, la proporción óptima de sus péptidos constitutivos alfa y beta es 1:1 (Moll y col., 1998).

2.5.4 Mecanismo de acción de las bacteriocinas Clase III

Muy pocas bacteriocinas de esta clase han sido estudiadas lo suficiente como para establecer el modo en que actúan, pero se supone que el modo de acción y sus propiedades físicas son claramente diferentes de los de clase I o II, en función de sus características estructurales. (Dzung y col., 2002).

2.6 Purificación

Aunque las bacteriocinas producidas por las bacterias del ácido láctico se han estudiado ampliamente en los últimos años, los estudios relativos a su estructura conformacional son relativamente pocos. Esto se debe en parte a que los procesos de purificación de estos antimicrobianos a partir de su fuente natural suelen ser poco exitosos (Parente y col., 1999).

El mejoramiento de la eficiencia de los procesos de purificación podría entonces contribuir significativamente al conocimiento de la naturaleza bioquímica de las bacteriocinas.

Luego de detectar la actividad antimicrobiana y de haber establecido las condiciones óptimas de cultivo que permitan una buena producción del antimicrobiano, se trata de encontrar un protocolo de purificación lo más sencillo posible para obtener el grado de pureza deseado (total o parcial) con máximos rendimientos. Se han utilizado una gran variedad de procedimientos, todos con éxito diferente; esta variabilidad en los resultados, se debe a la naturaleza extremadamente heterogénea de las bacteriocinas (Tagg y col., 1976; Klaenhammer, 1993).

El grado de pureza requerido dependerá de la posterior utilización. Para aplicaciones industriales en sistemas de biopreservación, el rendimiento de las fracciones y/o compuestos activos es el factor más importante a tener en cuenta. En cambio, si el objetivo es determinar la estructura primaria de la bacteriocina, se requerirá una pureza elevada (mayor al 90%) del compuesto activo.

Para que cualquier esquema de purificación tenga resultados generales satisfactorios es importante usar técnicas adecuadas de detección del contenido de proteína y de determinación del título de la actividad biológica, en cada paso del proceso de purificación, ya sea en unidades arbitrarias (UA totales o por mL) y/o actividad específica (UA/mg).

La observación empírica de las fluctuaciones en los parámetros mencionados, se usa frecuentemente para diseñar metodologías que mejoren el grado de purificación obtenido.

La sensibilidad de los métodos usados para determinar la actividad o la concentración de proteína es muy importante a la hora de establecer el grado de pureza y la actividad específica.

Debido a que las bacteriocinas son secretadas dentro del medio de cultivo, la mayoría de los protocolos de purificación comienzan con algún método para concentrar la bacteriocina a partir del sobrenadante de cultivo y así reducir el volumen de trabajo, entre ellos se pueden mencionar: concentración a presión reducida, precipitación con sulfato de amonio, precipitación ácida o con solventes orgánicos. Otros métodos pueden ser diálisis y ultrafiltración.

Se han desarrollado métodos de extracción con solventes tales como cloroformo, que resultan ser 10 a 100 veces más eficaces que la precipitación con sulfato de amonio. Son rápidos, fáciles de realizar, quedando la bacteriocina en la interfase entre el solvente y el medio acuoso del cultivo de la cepa productora (Burianek y col., 2000; Yang y col., 1992).

La posterior separación de la bacteriocina de los contaminantes proteicos provenientes del medio de cultivo y/o del metabolismo celular se realiza mediante combinación de algunas de las siguientes metodologías: cromatografía de exclusión molecular (filtración en geles), intercambio iónico, cromatografía de interacción

hidrofóbica y cromatografía líquida de alta performance en fase reversa (HPLC) (Tagg y col., 1976).

Algunos trabajos reportan la utilización de medios de cultivo más simples para el desarrollo de la cepa productora, a fin de minimizar la presencia de contaminantes proteicos y facilitar las etapas de purificación; por ejemplo Vadaraj y col. utilizaron caldo adicionado sólo de sales y glucosa para desarrollar una cepa de *L. plantarum* NCIM 2084, productora de una bacteriocina (Vadaraj y col., 1998).

3. Métodos de Screening para detectar la actividad antimicrobiana

Existen tres métodos principales para detectar la actividad antimicrobiana:

1. Spot test: consiste en aplicar sobre una zona definida de un césped bacteriano sensible, fracciones de muestra con actividad antimicrobiana. (Tagg y col., 1976).
2. Test de difusión en pozos de agar: la inoculación de las muestras activas se efectúa dentro de pozos realizados sobre un césped de bacteria sensible (Tagg y col., 1971).
3. Método de la dilución crítica: se cubre con una serie de diluciones de muestra activa el césped de la bacteria sensible (Mayr-Harting y col., 1972).

Uno de los más utilizados es el método 2, el cual consiste en medir la zona de inhibición en placas de agar sembradas con la cepa indicadora sensible. El tamaño de la zona de inhibición es el resultado de la difusión del compuesto antimicrobiano a través del agar y de la velocidad con la cual crece el organismo sensible. Esta difusión se produce a una velocidad constante dependiendo de su peso molecular, carga iónica y del medio de cultivo (composición, temperatura y viscosidad).

Cuanto mayor es la concentración del antimicrobiano inoculado, mayor es el diámetro de la zona de inhibición bajo condiciones estandarizadas, aunque no existe una relación estricta de proporcionalidad directa. El tiempo mínimo de incubación requerido para medir la inhibición es 12-16 h, pero puede variar (ser mayor o menor) dependiendo del tipo de microorganismo sensible usado, las condiciones nutricionales del medio de cultivo, temperatura de incubación, volumen y concentración del inóculo, etc. Se ha demostrado que los ensayos para detectar la actividad dependen de las condiciones de trabajo y que la densidad del césped del organismo indicador es un factor crucial a considerar (Tagg y col., 1976). Por ejemplo, Nisina muestra escasa

difusión en el agar, que se mejora mediante la adición de Tween 80 o Tween 20. Por todo lo expuesto, es muy importante estandarizar las condiciones bajo las cuales se realizan los ensayos, de manera de poder realizar estudios comparativos confiables.

4. Síntesis química en fase sólida de péptidos antimicrobianos

Las bacteriocinas pueden ser estudiadas a partir de su fuente natural previa purificación, pero muchos estudios, sobre todo los del tipo estructura-función se realizan sobre bacteriocinas sintetizadas ya sea químicamente o mediante técnicas de Biología Molecular.

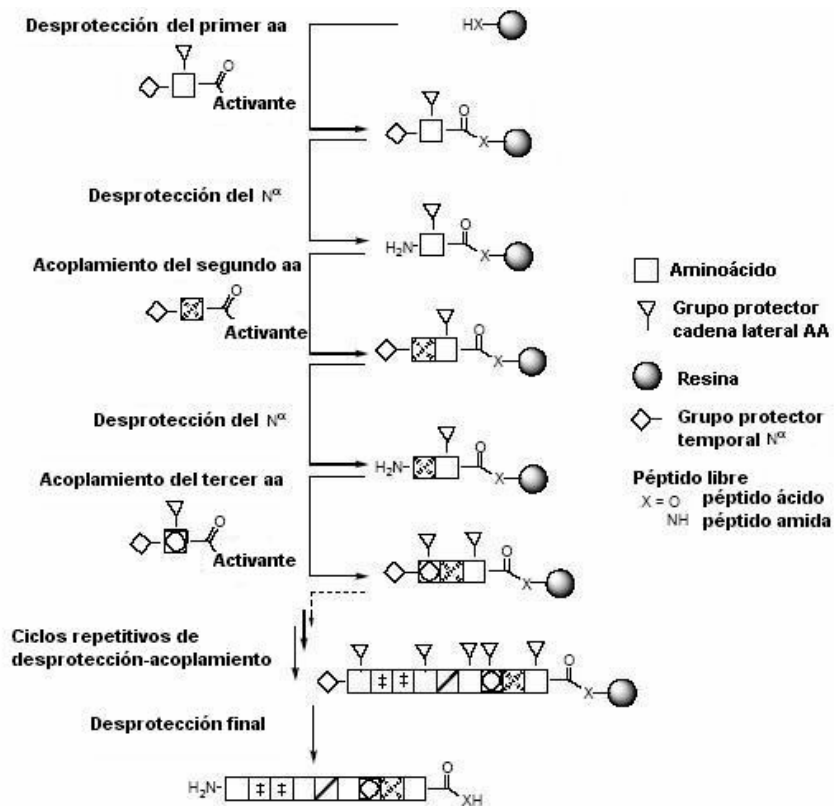
La síntesis química en fase sólida puede ser definida como un proceso mediante el cual un péptido es sintetizado por medio de la adición sucesiva de aminoácidos protegidos en sus cadenas laterales siguiendo una secuencia específica, mientras se mantiene unido por su extremo C-terminal, mediante un espaciador adecuado, a un polímero insoluble (resina) que está derivatizado y funcionalizado.

El proceso completo consiste en la repetición de una serie de etapas: desprotección, lavados y acoplamiento que conforman un ciclo de síntesis, en cada uno de los cuales se incorpora un nuevo aminoácido. De este modo se va formando la cadena peptídica que permanece covalentemente unida al soporte insoluble (resina), el cual está perfectamente solvatado por solventes orgánicos. El primer aminoácido que se une al soporte es el C-terminal y el último que se acopla es el N-terminal de la secuencia a sintetizar.

Una vez acoplado el último residuo, las etapas siguientes se refieren a la separación del péptido de la resina y desprotección de las cadenas laterales (Fields y col., 1990; Merrifield, 1995) (Figura 3). La cadena peptídica en crecimiento al estar unida al soporte sólido, hace posible eliminar el exceso de reactivos y productos secundarios que se forman en cada etapa de la síntesis mediante simples filtraciones y lavados con solventes apropiados. La SQFS puede ser realizada manualmente, técnica que, aunque resulta más lenta y engorrosa, tiene entre otras la ventaja de permitir cambiar en cualquier momento las condiciones de trabajo o los reactivos, y monitorear en forma más completa el proceso mediante estudios de HPLC y espectrometría de masas, tomando muestras del reactor a distintos tiempos.

Los péptidos antimicrobianos obtenidos mediante síntesis manual en fase sólida presentan en general una pureza adecuada para los ensayos de actividad antimicrobiana a los que son sometidos posteriormente. En estos ensayos es necesario realizar controles mediante blancos, para descartar la presencia de acciones inhibitorias inespecíficas debidas a sub-productos y/o reactivos contaminantes que podrían estar presentes en los productos sintetizados.

Figura 3: Representación esquemática de un ciclo de SQFS.



5. Estudios estructura-función

El conocimiento acerca de la relación existente entre la estructura y la función de las bacteriocinas es uno de los principales temas de investigación en la actualidad, dentro del área de los antimicrobianos bacterianos. Estos estudios tienen como objetivo identificar regiones de la secuencia peptídica que puedan tener un rol crítico en los pasos de reconocimiento a nivel de la membrana de las células sensibles y en los pasos implicados en su acción bactericida y/o bacteriostática.

Este tipo de estudios permite diseñar análogos de igual o menor peso molecular, y mejorados en su actividad.

Por ejemplo, dentro de la clase I de bacteriocinas, se han realizado estudios estructura-función sobre Nisina y algunos antibióticos del tipo B, los que han demostrado que el anillo tioéter, cercano al extremo N-terminal (formado entre los aminoácidos lantionina y metil-lantionina), forma parte de una región conservada que es esencial para la actividad antimicrobiana, sobre todo en lo que se refiere a la interacción inicial con los lípidos de la membrana bacteriana.

Se ha establecido que los residuos de D-alanina en la bacteriocina Lactosina S son fundamentales para la actividad antimicrobiana, probablemente porque están implicados en estabilizar la estructura secundaria de la misma o porque le brindan resistencia a la degradación proteolítica.

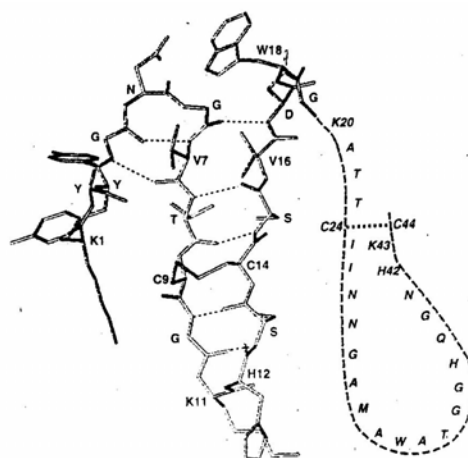
Las bacteriocinas de la clase IIa (del tipo pediocinas) se han estudiado más ampliamente en lo que respecta a la relación estructura-función. Todas tienen en común ser activas hacia *Listeria monocytogenes*, no sólo a nivel de cultivos de laboratorio sino también en sistemas alimentarios modelo, especialmente productos cárnicos, donde Nisina no es efectiva. El uso de Pediocina PA-1 (Chen y col., 1997b) en la preservación de alimentos tales como carnes, ensaladas y quesos está avalado por patentes europeas (González, 1988; Vandenberg y col., 1989).

Los puentes disulfuro, residuos de triptofano y aminoácidos cargados positivamente son, en general, esenciales para la acción antimicrobiana de este tipo de bacteriocinas.

Estudios de interacción con liposomas indican que el inicio del mecanismo de acción de las bacteriocinas del tipo pediocinas, es gobernado a través de una interacción electrostática inespecífica (Chen y col., 1997b). Por otra parte, la región N-terminal ("YGNGV", secuencia consenso), sería la responsable de interactuar con algún receptor específico de la membrana citoplasmática de las células de *Listeria* (Chikindas y col., 1993). Por último, se ha determinado que el extremo C-terminal podría ser responsable de la especificidad de acción, interactuando de una manera específica con algún tipo de receptor de la célula blanco, especialmente a través del fragmento de secuencia 20 a 34. Los puentes disulfuro, en particular el situado entre

los residuos 24 y 44 del extremo C-terminal (Pediocina PA-1), serían esenciales para la actividad frente a cepas de *Pediococcus* y *Listeria* (Chen y col., 1997b; Chikindas y col., 1993) (Figura 4).

Figura 4: Modelo predictivo tridimensional de la estructura terciaria del extremo N-terminal de Pediocina PA-1.



La secuencia de los residuos 20 a 44 se indica sin estructura; el puente disulfuro entre Cys₂₄ y Cys₄₄ es necesario para su actividad (Chen y col., 1997b).

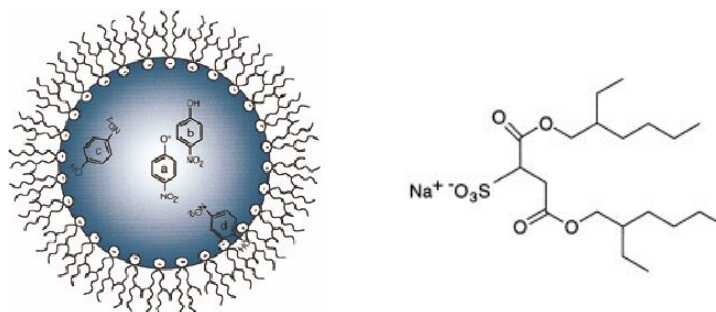
6. Estudios conformacionales por Dicroísmo circular y Fluorescencia

Entre las tecnologías que se disponen para dilucidar la estructura de las biomoléculas y/o su interacción con otros sistemas se pueden mencionar: difracción de rayos X, espectroscopía de resonancia magnética nuclear y microscopía electrónica, entre otras, con resoluciones en el orden de los nanómetros. En general, estas técnicas requieren grandes cantidades de componentes puros y se llevan a cabo bajo condiciones no fisiológicas.

Los estudios por Fluorescencia y Dicroísmo circular son herramientas altamente específicas, selectivas y sensibles para el estudio de la estructura y de cambios conformacionales de proteínas y péptidos, particularmente si se realizan en ambientes biomiméticos que simulan membranas biológicas, empleando agentes surfactantes tales como el bis-(2-etilhexil)-sulfosuccinato de sodio (AOT) (Souto y col., 2000; Chang y col., 2000) o liposomas, constituidos por fosfolípidos aniónicos o neutros (Hovius y col., 2000). Las micelas inversas de AOT en ciclohexano constituyen un buen modelo, que es capaz de simular la interfase entre el medio acuoso extracelular y la membrana

lipídica de la célula blanco bacteriana (Chang y col., 2000) (Figura 5). Las mismas permiten estudiar el grado de interacción de los péptidos con la zona apolar de la micela, extrapolándose esto a lo que ocurre a nivel celular. Básicamente están formadas por agregados estables de la molécula anfifílica de AOT en un solvente orgánico (por ej: ciclohexano o isooctano); la cantidad controlada de agua o solución del péptido antimicrobiano que se ubica en el interior polar de la micela puede expresarse a través del $W_o = [H_2O]/[AOT]$ (Lenz y col., 1995).

Figura 5: Modelo esquemático de la micela inversa de AOT y estructura química del AOT (Chang y col., 2000).



Modelo esquemático del sistema de micela inversa agua/isooctano/AOT. Se muestra al 4-nitrofenol atrapado en la micela inversa de AOT. El gradiente de color azul indica la influencia diferencial de las cabezas polares de las moléculas de surfactante sobre las moléculas de agua.

6.1 Dicroísmo circular

El fenómeno de Dicroísmo circular es muy sensible a la estructura secundaria de polipéptidos y proteínas. El Dicroísmo circular es una forma de espectroscopía de absorción que detecta la absorción diferencial de radiación circularmente polarizada a través de los cromóforos presentes en las proteínas, los cuales pueden tener quiralidad intrínseca o encontrarse en entornos quirales. La teoría de DC (Kelly y col., 2000) considera que un rayo de luz polarizado en un plano está formado por dos componentes polarizados circularmente, uno hacia la derecha y el otro hacia la izquierda, los cuales se encuentran en fase y son de la misma amplitud. Al entrar en contacto con un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas o cromóforos, y esta interacción provoca una rotación en el plano de polarización, generando una elipse. Estos

fenómenos, que dependen de la longitud de onda, pueden visualizarse mediante la obtención de espectros en los cuales se grafica la rotación o elipticidad (expresada en mdegree) en función de la longitud de onda.

Los espectros de DC pueden ser analizados en la región UV lejana (180-240 nm), la cual corresponde a la absorción de la unión peptídica, a fin de obtener información sobre estructura secundaria (alfa hélice, lámina beta etc). El espectro de DC en la región UV cercana (260-320 nm) refleja el medio ambiente de las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos y proporciona información sobre la estructura terciaria de la proteína.

El método más simple para obtener el contenido de estructura secundaria a partir de los datos de DC es considerar que el espectro total es una combinación lineal de los espectros de DC de cada tipo de estructura secundaria contribuyente (por ejemplo: alfa hélice pura, lámina beta pura) de acuerdo a su abundancia en la conformación peptídica en particular. La comparación entre espectros de referencia, correspondientes a estructuras secundarias puras, y el espectro obtenido para una determinada muestra (se compara la forma y los mínimos de las señales) permite estimar la conformación adoptada por dicha muestra en un medio solvente determinado (agua, buffers, metanol, TFE, etc.) (Figura 6).

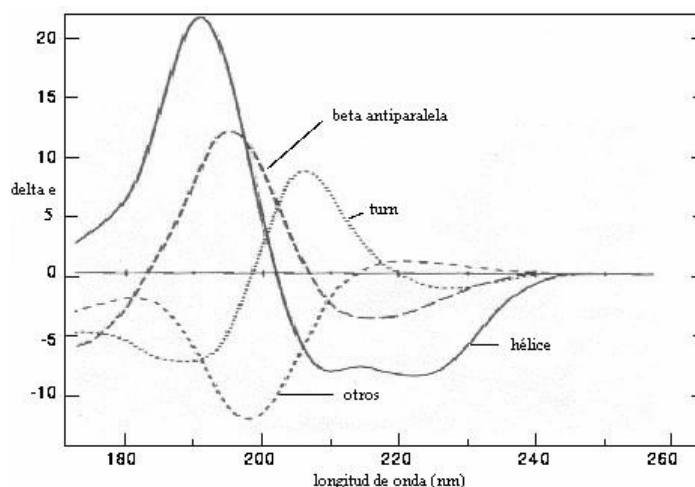
Sin embargo, el mayor inconveniente de esta técnica es que no existen espectros de DC estándar de referencia de estructuras secundarias "puras". Se han usado homopolipéptidos sintéticos a fin de obtener espectros de referencia, pero han resultado inadecuados para ser usados en proteínas. Por ello se han desarrollado métodos que analizan los datos experimentales de DC usando bases de datos de espectros de DC realizados sobre proteínas de referencia que contienen cantidades conocidas de estructura secundaria (Seeramma y col., 1993; Seeramma y col., 2000).

La espectroscopía mediante Dicroísmo circular ha sido ampliamente aplicada a la caracterización estructural de péptidos. Así es que las aplicaciones del DC al estudio conformacional de péptidos se pueden agrupar en:

- 1) Monitoreo de los cambios conformacionales (por ejemplo: monómero-oligómero, unión a sustrato, desnaturalización, etc).
- 2) Estimación del contenido de estructura secundaria.

Los espectros de DC de péptidos se pueden realizar en una gran variedad de sistemas solventes. Así es bien conocida la capacidad del trifluoretanol (TFE) y el hexafluoroisopropanol (HFIP) en promover la formación de estructura tipo alfa-hélice en los péptidos (Sönnichsen., y col 1992).

Figura 6: Espectros modelos de DC para estructuras secundarias puras (Kelly y col., 2000).



6.2 Espectroscopía de Fluorescencia

En los últimos diez años, la Espectroscopía de fluorescencia ha adquirido notable relevancia, debido a los importantes avances técnicos logrados en lo referente a análisis de datos e instrumentación, así como por sus aplicaciones en estudios de macromoléculas biológicas.

La disponibilidad y simplicidad en la adquisición de los datos y en el análisis mismo de la fluorescencia la han tornado muy popular en comparación con otras técnicas espectroscópicas. La Espectroscopía de fluorescencia es esencialmente una técnica que detecta los cambios en el medio ambiente local alrededor del fluoróforo, lo que la distingue de otras técnicas más generalizadas como calorimetría, Dicroísmo circular y espectroscopia infrarroja. Entre las aplicaciones más importantes de la Espectroscopía de fluorescencia, se pueden mencionar: estudios de plegamiento de proteínas e interacciones proteína-ligando. En el primer caso, se puede estudiar la desnaturalización o renaturalización de una proteína inducida por cambios en el pH, temperatura, solventes o agregado de solutos, observando los cambios en la

fluorescencia. En el segundo caso, se pueden analizar cambios en la fluorescencia tanto en la proteína como en el ligando luego de la interacción. (Ladokhin., 2000).

El fenómeno de fluorescencia consiste en la emisión de luz en la región UV -visible a partir de una molécula que ha sido excitada electrónicamente. Las proteínas y péptidos que poseen propiedades fluorescentes contienen uno o varios de los siguientes fluoróforos intrínsecos (naturales): triptofano, fenilalanina y tirosina (Lakowicz, 1999). La fluorescencia de estas moléculas puede medirse directamente en solución (concentraciones bajas, de 10^{-6} M) a través de ciertos parámetros, como: la intensidad y posición espectral de la longitud máxima de emisión ó excitación, anisotropía o apagamiento.

6.2.1 Intensidad y posición espectral de la longitud máxima de emisión o excitación

Estos parámetros no permiten determinar qué tipo de conformación presenta un péptido en diferentes medios solventes, sino que determinan si la molécula sufre cambios conformacionales al pasar de uno a otro, ya que en función de la conformación que adopte, los aminoácidos fluorescentes estarán menos o más expuestos a medios locales de mayor o menor polaridad. Esto afecta la intensidad de la emisión y/o la longitud de onda a la cual ésta ocurre. Las diferencias conformacionales observadas, cuando son muy claras, pueden relacionarse a diferentes actividades fisiológicas de la proteína o péptido.

6.2.2 Anisotropía

Es una técnica que emplea luz polarizada en el plano para excitar los fluoróforos; permite obtener información sobre forma, tamaño y flexibilidad de proteínas, además de detectar cambios conformacionales y permitir el estudio de la asociación entre ellas y su unión con pequeñas moléculas.

6.2.3 Apagamiento o quenching

Los fluoróforos en solución pueden interactuar con el entorno y con moléculas presentes en el medio. Si esta interacción ocasiona la disminución o pérdida de la

emisión de fluorescencia se está en presencia de un fenómeno de desactivación sin emisión de energía. Las moléculas capaces de desactivar a los fluoróforos se conocen como desactivadores o quenchers, por ejemplo, IK o acrilamida. Dependiendo del grado de estructuración de la proteína o péptido, los fluoróforos intrínsecos estarán más o menos expuestos a la interacción con el apagador, lo cual se traduce en una disminución de la intensidad de la fluorescencia.