

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIOCINAS SINTETIZADAS POR CEPAS AISLADAS DE BEBIDAS FERMENTADAS MEXICANAS

Pérez-Villanueva M.P.^a, Vázquez-García A.^{a*}, De la Fuente-Salcido N.M.^b, Barboza-Corona J.E.^c

a) Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Ingeniería Bioquímica. Carretera Irapuato-Silao km. 12.5, C.P. 36821, Gto, Irapuato, México. Teléfono: 01 (462) 60 67 900.

janhytha_18@hotmail.com

b) Universidad Autónoma de Coahuila, Escuela de Ciencias Biológicas, Posgrado Ing. Bioquímica. Boulevard Torreón-Matamoros Km. 7.5, Ciudad Universitaria Campus Torreón. C.P. 27104. Torreón, Coahuila, México.

c) Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, Departamento de Alimentos, Campus Irapuato-Salamanca, Irapuato, Guanajuato, 36500, México.

RESUMEN

En el presente proyecto se realizó con dos cepas *Enterococcus malodoratus* y *E. mundtii* aisladas de bebidas fermentadas típicas de México, tepache y pulque. Se variaron las concentraciones de la fuente principal de carbono, en este caso se tomaron niveles mayores, inferiores y el nivel normal utilizado comúnmente para Fructosa, Sacarosa y Glucosa. Se incubaron y se semi purificó por centrifugación y con un ajuste de pH a 6. Para comprobar la presencia de las bacteriocinas producidas se llevó a cabo la técnica de difusión en pozos (Aguado Bautista, *et al.*, 2010). La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas fue ensayada contra diversas cepas patógenas *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, para dos cepas diferentes de bacteriocinas: Enterocina y Nisina. Se obtuvo ocho pruebas positivas para la inhibición de las cepas patógenas, teniendo mejor resultados contra *Klebsiella pneumoniae* a la concentración mayor de las fuentes de carbono probadas.

ABSTRACT

In this Project, the study was performed with two isolates from fermented beverages, tepache and pulque, the concentrations of the main carbon source is varied, in this case tree levels, high, lower and normal commonly used for fructose, sucrose and glucose were taken. The essays was incubated and purified by centrifugation and pH adjustment to 6. To verify the presence of bacteriocins produced was done by well-difussion method as described by Aguado Bautista, *et al.*, 2010. The antibacterial activity of the bacteriocins was tested against pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*, for two different bacteriocins strains: Enterocina and Nisina. Eight positive tests for inhibition of pathogenic strains was obtained, having better results against *Klebsiella pneumonia* at the highest concentration of the carbon sources tested.

Palabras clave: Bacteriocinas, Enterocina y Nisina.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos que se sintetizan a nivel ribosómico y que, posteriormente, pueden sufrir modificaciones post-traduccionales (Barboza-Corona *et al.*, 2007). Se han definido a las bacteriocinas como sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica y activas frente a bacterias que guardan una estrecha relación taxonómica con la especie productora (Fernández Dumont, 2005). Las bacteriocinas tienen un amplio espectro de actividad, mecanismos de acción, pesos moleculares, y propiedades fisicoquímicas. Es bien conocido que muchos microorganismos son viables para sintetizar bacteriocinas, pero las bacteriocinas sintetizadas por BAL son las que tienen un gran potencial para ser utilizadas como bioconservadores (Stoyanova, *et al.*, 2011).

La producción máxima de bacteriocinas puede obtenerse suplementando un medio de cultivo con factores limitantes de crecimiento como azúcares, vitaminas y fuentes de nitrógeno, regulando el pH y eligiendo las mejores condiciones del medio para aumentar la eficiencia del proceso (Rojas and Vargas, 2008). Las bacteriocinas producidas por diferentes bacterias probióticas pueden servir como barreras antimicrobianas y ayudar a reducir los niveles de microorganismos patógenos. Para controlar las enfermedades en los cultivos se han usado compuestos químicos y antibióticos de manera indiscriminada. Esta práctica ha provocado el incremento en la presencia de plásmidos resistentes a dichos compuestos (Monroy Dost *et al.*, 2009). Se ha reportado que más del 20% de todos los alimentos producidos a nivel mundial se deterioran por la acción de los microorganismos al grado de perderse y considerarse una merma total, lo que se considera una problemática que se incrementa a pasos (De la Fuente- Salcido *et al.*, 2009).

El mayor número de bacterias productoras de bacteriocinas se han aislado de productos lácteos fermentados y productos cárnicos y ensilaje, pero se aislaron una serie de cepas (*Enterococcus durans*, *Lactobacillus animalis*, *Leuconostoc sp.*) a partir de muestras de suelo. Hay evidencia de que la producción de nisina fue hecha de aislados de *L. lactis* subsp. *lactis* a partir de leche de mama. Las bacteriocinas difieren de los antibióticos clásicos por tres propiedades principales: la síntesis de bacteriocinas se produce en los ribosomas, las bacteriocinas tienen un espectro específico de actividad, y cada bacteriocina tiene su propia proteína inmune especializada (Stoyanova, *et al.*, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de crecimiento de las cepas. Las cepas productoras de bacteriocina *Enterococcus malodoratus* y *Enterococcus mundtii* fueron aisladas de bebidas fermentadas mexicanas, tepache y tuba respectivamente. Los microorganismos sensibles se obtuvieron de diferentes fuentes ver tabla 1. Las cepas para su crecimiento se colocaron en un tubo con 5 ml de medio Caldo Man Rogosa (MRS) se incubaron a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Aguado Bautista, *et al.*, 2010).

Producción y obtención de bacteriocinas (Enterocina y Nisina). De las cepas *E. malodoratus* y *E. mundtii* fueron sembradas en 100 mL de medio Caldo Caseína-Glucosa (CGB: extracto de levadura 0.5%, peptona biotriptasa 2%, dextrosa 1%,

sulfato de manganeso 0.005%, citrato de amonio 0.2%, fosfato disódico 0.2%, sulfato de magnesio 0.01%, Tween 80 0.10%) a 37°C por 16 horas; para lo anterior se colocaron tres diferentes concentraciones de dextrosa (0.5, 1.0, 1.5 %), y se adicionaron tres carbohidratos diferentes como fuente de carbono extra (glucosa, fructosa y sacarosa) y de igual manera se manejaron tres diferentes concentraciones (0.5, 1.0, 1.5 %).

Tabla 1. Cepas sensibles y clasificación

Cepa Sensible	Tipo de Bacteria
<i>Escherichia coli</i>	Gram (-)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram (+)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram (+)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram (-)
<i>Bacillus cereus</i> 183	Gram (-)

Para cada cepa se realizaron cultivos por duplicado de las diferentes fuentes de carbono a cada concentración. Posteriormente a cada cultivo se colocó en tratamiento térmico a 70°C durante 30 minutos para la inactivación de proteasas que pudieran estar presentes en el medio (Katla *et al.*, 2003), seguido de una centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Una vez centrifugado, el sobrenadante se colectó y se ajustó a pH 6.0 y se mantuvo en refrigeración a 4°C (Aguado Bautista *et al.*, 2010).

Ensayo de actividad antibacteriana de las bacteriocinas por difusión en pozos. A las bacteriocinas obtenidas (Enterocina y Nisina) se les realizaron diluciones a doble concentración con buffer de fosfatos 10 mM a pH 6.8 (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64). La actividad antibacteriana se midió por el método de difusión de pozos en placas de agar, utilizando *L. innocua* como cepa sensible.

La técnica consistió en depositar 100 µL de las bacteriocinas en pozos hechos con un horador de 6 mm de diámetro en placas con agar para pozos (AP) solidificado (agar bacteriológico 1.2%, Caldo soya 0.15%). El medio fué inoculado previamente con 105 µL de un cultivo de la cepa sensible por cada 15 mL de AP. La actividad antimicrobiana de la bacteriocina se evaluó determinando el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de la cepa sensible formado después de incubar a 4°C toda la noche y posteriormente a 37°C o 28°C durante 24 horas para el desarrollo de la cepa sensible (*B. cereus* 183 crece a 28°C).

Para determinar la actividad de los extractos de bacteriocinas, las cepas productoras se incubaron en condiciones de anaerobiosis, para descartar presencia de halos derivados de la producción de peróxido de hidrogeno. La actividad de las bacteriocinas se reportó en Unidades Arbitrarias (Aguado Bautista *et al.*, 2010).

RESULTADOS

Producción de bacteriocinas (Enterocina y Nisina). Se obtuvo de cada bacteriocina una cantidad de 40 mL por cada tratamiento y su respectivo duplicado. Es conveniente mencionar que estos péptidos antimicrobianos se obtuvieron como extractos crudos y mostraron una actividad de 441 y 126 UA para Nisina y Enterocina respectivamente.

Ensayo de actividad antibacteriana de las bacteriocinas por difusión en pozos. Los ensayos de actividad antibacteriana de las bacteriocinas solo se presentaron en tres de las cinco bacterias indicadoras utilizadas, las cuales fueron *K. pneumoniae*, *E. faecalis* y *L. monocytogenes*, además de que se observó la actividad en las diferentes concentraciones de las diluciones empleadas.

Los halos de inhibición del crecimiento de las cepas sensibles por acción de la Nisina y la Enterocina obtenidas por los diferentes tratamientos se determinaron en unidades arbitrarias (UA) y en la tabla 2 se muestran los resultados con respecto a la cepa de la que proviene cada bacteriocina y la concentración y fuente de carbono utilizadas para la producción y la dilución que proporciona la actividad antimicrobiana reportada.

Es conveniente mencionar que en ocho tratamientos de los dieciocho incluidos en el experimento, presentaron inhibición contra alguna de las bacterias indicadoras.

DISCUSIÓN

Los resultados que se obtuvieron muestran claramente que solamente ocho de los tratamientos empleados proporcionan bacteriocinas con actividad antibacteriana suficiente para inhibir el crecimiento microbiano de las cepas sensibles. Los tratamientos para la producción de Nisina con actividad antibacteriana fueron sacarosa 0.5 y 1.5 %, glucosa 1.5 % y fructosa 1.5 % Para la producción de Enterocina fueron la sacarosa 1.0 %, glucosa 1.5 % y fructosa 1.0 y 1.5 %.

Las actividades de las bacteriocinas producidas se evaluaron determinando la dilución más alta en la que se observó un halo de inhibición cuando se depositan 100 µL de bacteriocina en los pocillos de 8 mm de diámetro. La bacteriocina Nisina producida por *E. mundtii* presentó halos de inhibición hasta la dilución 16, dando una actividad de 441 UA, y la Enterocina producida por *E. malodoratus* causo halos de inhibición hasta la dilución 1/32. 126 UA. Ambas actividades se obtuvieron con el extracto crudo de las bacteriocinas.

Las inhibiciones mostradas por las concentraciones mencionadas de fuente de carbono para producir Nisina inhibieron a las cepas sensibles *K. pneumoniae*, *E. faecalis* y *L. Monocytogenes*, mostrando que cuando se produce en sacarosa produce mayor inhibición del crecimiento sobre *E. faecalis* con 441 UA. Con respecto a la Enterocina producida en fructosa, fue capaz de inhibir el crecimiento de *E. faecalis* y *K. pneumoniae*, siendo mayor la actividad ejercida contra *K. pneumoniae* de 126 UA.

Es conveniente mencionar que la cepa *E. malodoratus* no presenta crecimiento en concentraciones menores de 1.0, mostrando ser una cepa exigente en cuanto al tipo y la cantidad de fuente de carbono que utilizamos en estos experimentos.

Existen reportes de metodologías muy sofisticadas que utilizan algoritmos para determinar la formulación óptima del medio de cultivo para producir Nisina por *Lactococcus lactis* (Guo *et al.*, 2010) que se podrían aplicar a las cepas aisladas de bebidas fermentadas y utilizadas en este estudio para obtener mejores resultados, es decir, actividad de las bacteriocinas en todas las concentraciones.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana (UA)* de las bacteriocinas sintetizadas por *E. Mundtii* y *E. malodoratus* producidas por fermentación en diferentes fuentes de carbono

Bebida/Cepa	Tratamiento (%)	Bacteria indicadora	Dilución	UA
Tepache <i>E. mundtii</i>	NS 0.5	<i>K. pneumonia</i>	1/32	45
		<i>E. faecalis</i>	¼	441
			1/8	264
	NS 1.5	<i>K. pneumoniae</i>	1/32	28
	NG 1.5	<i>L. monocytogenes</i>	1/32	126
	NF 1.5	<i>K. pneumoniae</i>	½	126
Tuba <i>E. malodoratus</i>	ES 1	<i>K. pneumoniae</i>	1/32	13
	EG 1.5	<i>E. faecalis</i>	1/8	28
	EF 1	<i>K. pneumoniae</i>	1/16	63
			1/32	126
	EF 1.5	<i>K. pneumoniae</i>	¼	63
		1/8	63	

UA: Unidades arbitrarias

Los dos antimicrobianos obtenidos presentaron inhibición contra *K. pneumoniae*, un patógeno de importancia en salud pública causante de infecciones como neumonía e infecciones de vías urinarias (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2008).

Además la Nisina producida mostró una actividad moderadamente alta contra uno de los patógenos que representan mayor riesgo de transmitirse por los alimentos, *L. monocytogenes* causante de listeriosis, reconocida como un serio problema de salud pública en el mundo que afecta principalmente a grupos de riesgo (personas de edad avanzada, embarazadas, recién nacidos y adultos con sistema inmunitario debilitado (<http://www.cdc.gov/spanish/listeria/>)).

Finalmente se puede concluir que la producción de las bacteriocinas Nisina y Enterocina por las cepas aisladas de bebidas fermentadas confirma que estos productos típicos mexicanos como una fuente de obtención de péptidos antimicrobianos.

La estrategia empleada para incrementar la actividad de estos péptidos antimicrobianos puede utilizarse para obtener en condiciones óptimas de fermentación, bacteriocinas con mayor actividad.

Es importante continuar desarrollando otras metodologías similares empleadas en el área de alimentos como son el diseño de mezclas binarias de la Enterocina y Nisina, que han mostrado tener un gran potencial para aplicarlas en la bioconservación de alimentos contra *L. monocytogenes* y otros microorganismos patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguado Bautista, L., Álvarez Cisneros, Y., & Ponce Alquicira, E. 2010. Evaluación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto crudo de bacteriocina en combinación con conservadores químicos utilizados en la industria cárnica. *NACAMEH*, 69-84.
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. 2014. Disponible en: <http://www.cdc.gov/spanish/listeria/>
- De La Fuente-Salcido NM, Alanís-Guzmán G, Bideshi DK, Salcedo-Hernaández R, Bautista-Justo M, Barboza-Corona JE. 2008. Enhanced synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of Microbiology*, 190 (6): 633–640.
- Fernández Dumont, A. 2005. Producción inducible de la lactococina A, pediocina P-1, colicina V e interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productores de nisina. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Guo WL, Zhang Y, Lu J, Jiang L, Teng L, Wang Y, Liang Y. 2010. Optimization of fermentation medium for nisin production from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* using response surface methodology (RSM) combined with artificial neural network-genetic algorithm (ANN-GA) *African Journal of Biotechnology* 9(38): 6264-6272.
- Katla T, Netersatd K, Vancanneyt M., Swings J, Axelsson L. 2003. Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to Sakacin P, Sakacin A, Pediocin PA-1, and Nisin. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4431–4473.
- Monroy Dosta M, Castro Barrera T, Fernández Perrino F J, Mayorga Reyes L. 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS* 73: 63-72.
- Rojas C, Vargas P. 2008. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha*, 9-16.
- Stoyanova L G, Ustyugova E A, Netrusov A I. 2011. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology* 48:229-243.