

BIOLUMINISCENCIA PARA MEDIR NISINA, APLICACIÓN EN QUESOS Y OPTIMIZACIÓN

Z.S. Oros-Flores^{a*}, B.E. García-Almendárez^b y R. Salcedo-Hernández^c

^a Licenciatura en Ingeniería en Alimentos. División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. ^b Universidad Autónoma de Querétaro. Ciencias químicas. CAC Biotecnología. ^c Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, Departamento de Alimentos. CAC Biotecnología Agrícola. zuleoros@gmail.com

RESUMEN:

La nisina es un péptido antimicrobiano de 34 aminoácidos y es la única bacteriocina aceptada como aditivo. Tiene gran potencial para la producción de alimentos inocuos ya que ataca a las principales bacterias implicadas en las enfermedades transmitidas por alimentos. Un problema en la investigación de la nisina es su cuantificación, debido a que el método estándar tiene un error de hasta 50%. Se desarrolló una metodología para cuantificar nisina basada en la inhibición de la bacteria luminiscente (*Listeria monocytogenes* EGD-e::pPL2lux-PhlyA). El objetivo fue comparar la respuesta a la nisina, del método propuesto con el método estándar de difusión en agar. Se estudió la bioluminiscencia de *L. monocytogenes* en función de la concentración de nisina, se buscaron las mejores condiciones de tiempo de cultivo, concentración celular, concentración y tiempo de incubación con nisina. Se observó que la disminución de la bioluminiscencia correlacionó con el método estándar. El método por bioluminiscencia permitió cuantificar la nisina en dos días menos que el método estándar.

ABSTRACT:

Nisin is an antimicrobial peptide of 34 aminoacids and is the only bacteriocin accepted as an additive. It has great potential for the production of safe food because it attacks the main bacteria involved in food diseases. A problem with the nisin quantification is that, the standard method has an error of 50%. We develop a methodology to quantify nisin based on inhibition of a luminescent bacteria (*Listeria monocytogenes* EGD-e :: pPL2lux-PhlyA). The objective was to compare the response to nisin of standar method with the proposed bioluminescence protocol. The proposed method was made in liquid medium, bioluminescence of *L. monocytogenes lux* was measured as a function of nisin concentration. Culture conditions, cell concentration, nisin concentration and incubation time were studied. It was observed a bioluminescence decrement wich correlated with the standard method. The method for bioluminescence allowed quantifying nisin in two days less than the standard method.

Palabras clave: Bacteriocinas, *Listeria monocytogenes*, nisina.

Key Words: Bacteriocins, *Listeria monocytogenes*, nisin.

Área: Microbiología y Biotecnología

INTRODUCCIÓN

La leche y sus derivados son esenciales en la dieta de los humanos, si estos productos se consumen sin pasteurizar, sin cuidados en el almacenamiento o higiene en su elaboración, representan un riesgo para la salud, ya que pueden estar contaminados con microorganismos patógenos como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, entre las más importantes. Uno de los

principales objetivos de la elaboración de productos alimenticios es que sean inocuos, nutritivos y con calidad sensorial. Para atender estas necesidades, en el caso particular de los quesos, se pueden usar microorganismos probióticos (microorganismos vivos como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, entre otros géneros), los cuales con capaces de sobrevivir e instalarse en el tracto digestivo brindando un efecto fisiológico benéfico al consumidor.

Para aplicar tecnologías que aseguren la inocuidad, garanticen la calidad y que, además sean alimentos funcionales; se utiliza la adición de microorganismos probióticos que también podrían actuar como cepas protectoras. Una cepa protectora está formada por bacterias (frecuentemente lácticas) que ayudan a controlar la presencia de otros microorganismos mediante el efecto antagónico de producción de bacteriocinas, ácidos orgánicos, entre otros. La creciente demanda de alimentos mínimamente procesados, con la menor cantidad de aditivos y conservantes ajenos a los alimentos, ha empujado a la industria alimentaria y a la comunidad científica a reconsiderar el potencial antimicrobiano de las bacterias lácticas y sus posibilidades como una estrategia más de conservación, en particular cepas productoras de bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos de secreción de origen ribosomal que ataca a otras bacterias, éstos péptidos han recibido particular atención en los años recientes por su potencial aplicación en la industria de alimentos como agentes naturales de conservación. Dentro de las bacteriocinas más importantes en alimentos encontramos a los lantibióticos (contienen lantioninas, formadas por dos residuos de aminoácido unidos por un enlace tioeter). La lantionina nisina es un péptido bioactivo sintetizado por algunas cepas de *Lactococcus lactis* durante la fase exponencial de crecimiento, es usada como un agente natural de bioconservación de alimentos y considerada segura por la FDA. La introducción de *Lactococcus lactis* como cultivo protector en quesos, permite la producción de nisina *in situ*, lo que puede prevenir el crecimiento de microorganismos deterioradores y patógenos en el queso.

Para verificar la cantidad de nisina producida *in situ* y su efectividad como agente conservante, debe cuantificarse. En el presente trabajo se estudió la aplicación de la técnica para medir nisina mediante la utilización de la cepa de *Listeria monocytogenes* EGD-e::pPL2lux-PhlyA, transformada con un operón *lux* incorporado al cromosoma (Bron *et al.*, 2006), con el objetivo de agilizar la detección de nisina en los productos lácteos. La técnica por bioluminiscencia se comparó con el método estándar para medir nisina (metodología por difusión en agar). En el método estándar se obtienen resultados de 24 a 48 horas después de su realización y tiene un 50% de error experimental, en la nueva metodología se disminuye el tiempo a 4 h. También se mejoró la técnica de extracción de nisina de productos lácteos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Curva estándar de nisina

Se preparó una solución de nisina comercial N5764-5G Nisin de *Streptococcus Lactis*, 2.5% de Sigma. Se disolvieron 25,000 UI (25 mg) de nisina por mL en ácido cítrico 10 mM (Manab *et al.*, 2012).

Método de difusión en agar

Las placas se prepararon con agar 1,5%, soya tripticaseína, 1%(v/v) de Tween 20 al 1%, e inoculando con la cepa indicadora *Micrococcus luteus* al 2% (v/v) de un cultivo de con turbidez de 0.3 en 650 nm y. En cada caja se hicieron 9 perforaciones con un horador estéril no. 4. En cada perforación se agregaron 50 µL de los extractos de las muestras de queso. Las placas se incubaron a 30 °C por 48 horas para poder observar los halos de inhibición en los pozos. Transcurrido el tiempo de incubación se midió el diámetro del halo de inhibición. Para la cuantificación de nisina, la actividad antimicrobiana de los extractos se expresa en Unidades Internacionales (UI, Estándar Británico BS 4020, 1974)

Método de medición por bioluminiscencia

Se usó la cepa bioluminiscente: *Listeria monocytogenes* EGD-e::pPL2lux-PhlyA (Bron *et al.* 2006), del cepario de CAC UAQ-CA-86-BIOTECNOLOGÍA. A partir de un cultivo de *L. monocytogenes lux* en medio LB en fase exponencial temprana (2 horas), en tubos cónicos de microcentrifuga (de 1.5 mL de capacidad), se añadió 300 µL del cultivo con agitación continua (1,500 rpm) y se agregaron 50 µL de muestra (estándar de nisina o extracto de queso) se incubaron por 8 minutos en las mismas condiciones, se midió la bioluminiscencia, se compararon las muestras con la bioluminiscencia con la curva estándar. El procedimiento descrito fue el punto de partida para optimizar condiciones y mejorar la sensibilidad del método (Vázquez García *et al.* 2014).

Extracción de nisina en queso

El procedimiento se basó en el método descrito (Estándar Británico BS 4020, 1974), con modificaciones. Se pesaron 2 ± 0.01 g de queso, la muestra se disgregó completamente en aproximadamente 8 mL de ácido cítrico 50 mM. Una vez que se ha suspendido completamente el queso, la muestra se calentó en baño maría hasta llegar a 94°C, se dejó por 5 minutos, inmediatamente se enfrió en baño de hielo por 5 minutos a fin de alcanzar una temperatura de 20 ± 5 °C, se aforó a 10 mL. El extracto se centrifugó a 11000 rpm por 30 minutos. Se extrajo la solución que se encuentra en el centro del tubo para evitar tomar grasa del levitado y sólidos precipitados, esta solución se esterilizó con membranas de 0.45 µm y guardado en refrigeración hasta su análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método por bioluminiscencia es efectivo cuando se utilizan cantidades de nisina mayores a 20UI (Oros, *et al.*, 2014) Debido a la baja sensibilidad fue importante mejorar la técnica para observar efecto en la zona de baja concentración desde 1 a 20 UI (Zona de baja concentración de UI importante en alimentos). Para ello se hicieron distintas modificaciones en la metodología cambiando las variables que se muestran a continuación:

Volumen

En el trabajo previo las mediciones se hicieron con 300 μL de cultivo y 50 μL de nisina. Debido a la geometría cónica de los tubos de microcentrífuga usados en el luminómetro, decidimos estudiar el efecto del volumen en la eficiencia de la respuesta del luminómetro. Como muestra la figura 1, 150 μL (barras azul claro) proporcionó un rendimiento mayor en la bioluminiscencia del cultivo. Se analizó la curva de crecimiento para cada uno de los volúmenes y el tiempo de duplicación fue similar, de 53.9 a 58.4 minutos. Por lo que es probable que la diferencia en la eficiencia sea un efecto de la geometría del tubo cónico en el que se midió o de la hemiesfera de integración del luminómetro.

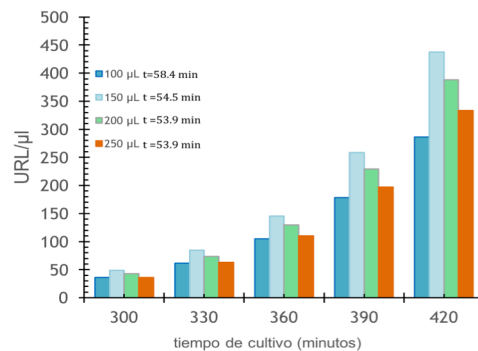


Figura 1. Eficiencia de bioluminiscencia por volumen de muestra ($\text{URL } \mu\text{L}^{-1}$)

Concentración de células

Se inició el estudio del efecto de la concentración de células con un cultivo de 4h de *Listeria monocytogenes* EGD-e::pPL2lux-PhlyA haciendo diluciones del mismo para determinar la mejor cantidad de células para el ensayo, se observó que una $\text{D.O.}_{600\text{ nm}}$ de 0.010 favoreció la mejor detección del efecto de la nisina sobre la bioluminiscencia, se observó que medir la turbidez de suspensiones celulares tan diluidas fue impráctico. Por lo que se decidió ajustar la cantidad de células con la bioluminiscencia misma: se determinó que 2,000 URL iniciales y una pre-incubación hasta 3,000 URL (se siguió la bioluminiscencia en lugar de un tiempo de preincubación fija) para zonas de baja concentración de nisina ya que con pocas células la nisina ejerce buena respuesta en zonas de 4-20 UI.

Incubación en el tiempo

En tiempos cortos el efecto de la nisina sobre la bioluminiscencia, se observa un aumento y posteriormente disminución de la bioluminiscencia, comportamiento muy inestable y poco útil para un método cuantitativo (Vázquez, et al., 2014). Por ello, se hicieron mediciones después de la adición de la nisina en tiempos largos (30,60,90,120,150,180 min). El comportamiento fue estable desde los 30 minutos. El efecto relativo de la nisina después de media hora no se modificó.

Condiciones del ensayo

Con las nuevas condiciones del método, se obtuvo la curva de calibración de la nisina mostrada en la Figura 2. En el caso particular de la nisina se observó un comportamiento sigmoideal, es decir la respuesta en la zona cercana a cero la

respuesta es mínima. Como se muestra en la figura 3 el intervalo útil para cuantificar nisina se encontró entre 6 y 16 UI.

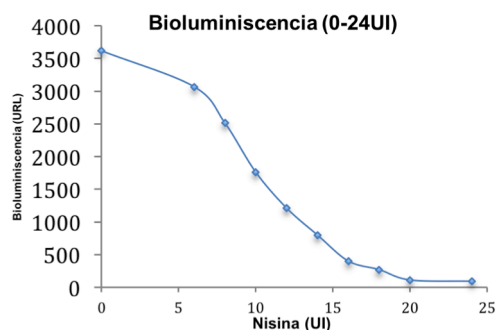


Figura 2. Curva de calibración de nisina por el método de bioluminiscencia.

Correlación entre el método propuesto y el estándar

Para comparar ambos métodos, se hicieron una serie de diluciones de nisina las cuales fueron probadas con el método estándar y el método por bioluminiscencia propuesto. La curva con el método estándar (difusión en agar) mostró una relación logarítmica (Fig. 3), entre el área de inhibición y la cantidad de nisina el índice de correlación mostró ser mayor a 0.98. Los datos obtenidos con bioluminiscencia, fueron similares a los mostrados en la Fig.2, con las dos curvas se trazó el gráfico mostrado en la Fig.4: se observó una buena correlación entre el área de inhibición y la bioluminiscencia, la función observada fue lineal entre los dos métodos en la zona de 6 a 16 UI, al aumentar la concentración de nisina la señal de bioluminiscencia se apaga casi por completo y la correlación se pierde (puntos rojos Fig. 4) el coeficiente de correlación lineal fue de 0.992.

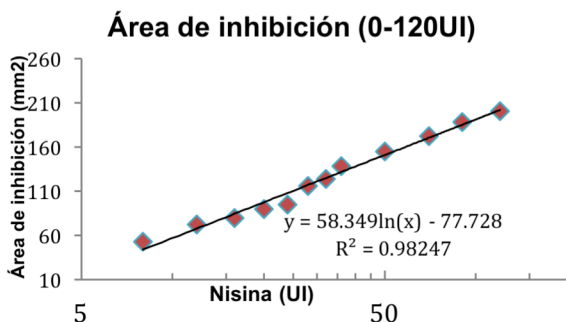


Figura 3. Curva estándar por el método de difusión en agar.

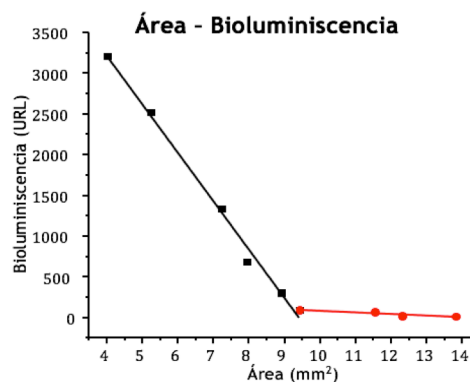


Figura 4. Correlación entre área y bioluminiscencia

Actividad antimicrobiana en queso tipo Provolone

Se obtuvieron extractos de queso Provolone ahumado “Los portales” que mostraron halos de inhibición de 136 mm² con una cantidad equivalente de 19 UI de bacteriocina presente, mientras que por el método por bioluminiscencia se calcularon 22 UI, es una relación bastante cercana entre ambos métodos. Para tener una mejor

estimación de la actividad antimicrobiana extraída del queso se hicieron diluciones (ver Fig. 5).

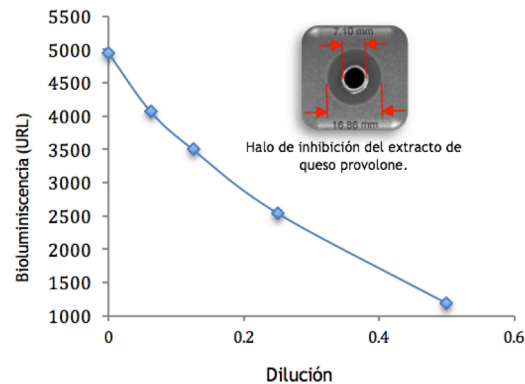


Figura 5. Comportamiento del extracto de queso Provolone por el método de bioluminiscencia.

El comportamiento mostrado en la zona de baja concentración fue distinto del mostrado por la nisina, para explicar la diferencia se planteó la posibilidad de que no medimos nisina sino otro péptido antimicrobiano o un conservador químico.

Para mostrar que la actividad antimicrobiana del extracto es de naturaleza protéica, se trató con enzimas proteolíticas (Tripsina, α -quimiotripsina, Proteasa de *Streptomyces griseus* y Proteinasa K) la actividad antimicrobiana del extracto de queso desapareció con la Proteasa de *Streptomyces griseus* y Proteinasa K, lo cual mostró su naturaleza protéica. Una explicación que investigaremos es la posibilidad de utilizar el método de bioluminiscencia para diferenciar rápidamente la nisina de otras bacteriocinas.

CONCLUSIÓN

El método por bioluminiscencia es útil ya que fue reproducible y tuvo un nivel de sensibilidad similar al método estándar, para ello es necesario tomar en cuenta rigurosamente los parámetros, ya que cualquier alteración en su realización afecta el resultado. La mayor ventaja de este método alternativo es su rapidez, pues proporciona los resultados el mismo día del ensayo, mientras que el método estándar tarda 48 horas. De manera muy importante, el método de bioluminiscencia podría usarse para diferenciar la nisina (y otras bacteriocinas que tengan el mismo mecanismo de acción) de otras bacteriocinas o péptidos antimicrobianos.

BIBLIOGRAFÍA

- British Standard 4020. 1974. Methods for the estimation and differentiation of nisin in processed cheese. BS 4020.
- Peter A. Bron, Ian R. Monk, Sinead C. Corr, Colin Hill, and Cormac G. M. Gahan. 2006. Novel Luciferase Reporter System for In Vitro and Organ-Specific

- Monitoring of Differential Gene Expression in *Listeria monocytogenes*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. 72. 2876–2888
- Vázquez-García, A., De la Fuente-Salcido, N. M., Patiño Galván H. y Salcedo-Hernández, R. Efecto de la nisina sobre la luminiscencia de *Listeria monocytogenes* EGD-e::pPL2lux-P_{hlyA}. 1^{er} Congreso Internacional sobre Innovación y Tendencias en Procesamiento de Alimentos y XVI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Guanajuato, Gto. 29 y30 de mayo 2014
- Manab D. A., Gopal D., Aiyagari R., 2012. Retention of nisin activity at elevated pH in an organic acid complex and gold nanoparticle composite. Chem. Commun., 2012, 48, 8928–893.
- Oros Flores, Z. S., Vázquez-García, A., García Almendárez, B. E., Salcedo-Hernández, R. Comparación del método estándar para cuantificar nisina con un método alterno por bioluminiscencia. 7° Congreso Internacional “CUCCAL” Sobre Inocuidad, Calidad y Funcionalidad de los Alimentos en la Industria y Servicios de Alimentación, Puerto de Veracruz, Ver., 13 al 17 de Octubre, 2014