

Búsqueda, caracterización y purificación de compuestos con actividad antimicrobiana producidos por bacterias ácido lácticas

Introducción

Los consumidores exigen cada vez alimentos más seguros y con una mayor vida útil, pero también expresan su preferencia por productos poco procesados y que no contengan conservantes químicos. Una respuesta a estas exigencias puede ser la BIOCONSERVACIÓN.

La acción conservante de ciertas cepas usadas como inóculos en la fermentación - starters - en la industria de alimentos se atribuye a la acción combinada de una serie de metabolitos antimicrobianos producidos durante el proceso de fermentación. Entre estos metabolitos se incluyen a los ácidos orgánicos, el etanol, el peróxido de hidrógeno, el diacetilo y las BACTERIOCINAS. Éstas son un grupo heterogéneo de péptidos de síntesis ribosómica y que presentan actividad antimicrobiana.

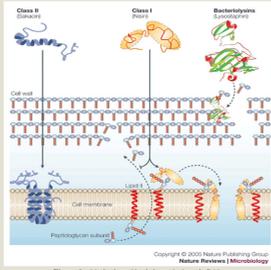
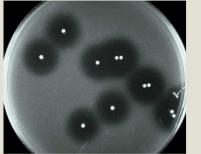


Figura 1 – Modo de acción de bacteriocinas de BAL. (Cintas et al. 1997)

- A diferencia de otros métodos de conservación como el calentamiento o el bajo pH, las bacteriocinas pueden ser más o menos específicas, permitiendo un buen desarrollo de las cepas deseadas y la eliminación de aquellas cepas patógenas o deteriorantes.
- Características de ciertas bacteriocinas producidas por BAL que las hace de amplio interés para su uso en la conservación de alimentos:
 - Son consideradas sustancias GRAS (“Generally recognised as safe”)
 - No son activas ni tóxicas frente a células eucariotas
 - Se vuelven inactivas por la acción de las proteasas del tracto digestivo
 - Son generalmente estables al pH y al calentamiento
 - Tienen un relativo amplio espectro de acción frente a la mayoría de las bacterias patógenas y deteriorantes de los alimentos
 - Usualmente se encuentran codificadas en plásmidos, lo que facilitaría la manipulación genética.

Atendiendo a las importantes consecuencias económicas y sanitarias, existe un gran interés por parte de diferentes sectores de la industria de alimentos en la aplicación de las bacteriocinas con actividad anti-*Listeria* en alimentos fermentados

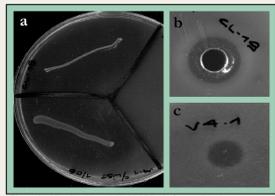


Cepa	V4-1	HV-4	CL-19
Lugar de aislamiento	Excremento vaca pirineo	Excremento vaca interurbana	Leche de cabra
Identificación 16S	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus alberti</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
Presencia gen bacteriocina CTC492	+	+	+
Efecto sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	Bactericida	Bacteriostático	Bactericida

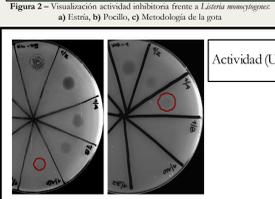
Tabla 1 – Cepas con actividad anti-*Listeria* aisladas precisamente en el Departamento de microbiología de la Universitat de Barcelona.

Caracterización de la actividad antimicrobiana

Visualización y cuantificación de la actividad



- A) Metodología de la estría
B) Metodología del pocillo
C) Metodología de la gota
- Detectan actividad en el Sobrenadante Libre de Células – “SLC”



Actividad (UA/μl) = $\frac{\text{Mayor dilución en la que se detecta actividad}}{\text{Volumen utilizado en la determinación (μl)}}$

Cepa CL-19 = 5,33 UA/μl
Cepa V4-1 = 1,33 UA/μl
Cepa HV-4 = 0,33 UA/μl

Figura 2 – Determinación somocuantitativa de la actividad frente a *Listeria monocytogenes*

Producción de actividad antimicrobiana

Curvas de crecimiento y producción de compuesto con actividad anti-*Listeria* en los SLCs

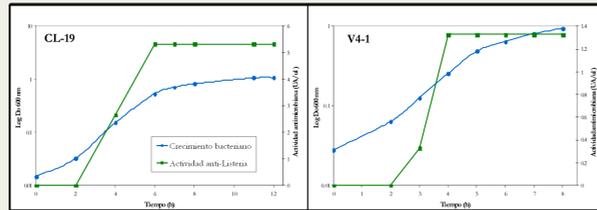


Figura 4 – Curvas de crecimiento y producción de compuesto con actividad anti-*Listeria* de las cepas V4-1 y CL-19.

Estudio del efecto del medio de cultivo en la producción de actividad anti-*Listeria*

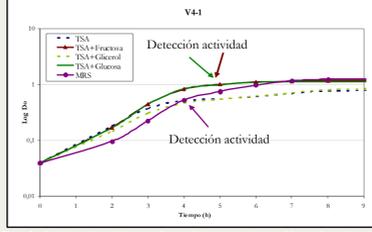


Figura 5 – Crecimiento de cepa V4-1 en medios con distintas composiciones y diferentes fuentes de carbono.

Estimación del peso molecular del principio activo

Fractionamiento proteico de los SLC mediante precipitación con sulfato de amonio previo a la determinación del peso molecular del principio activo.

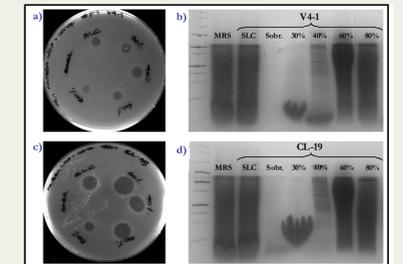


Figura 8 – Fraccionamiento proteico de los SLC mediante precipitación con sulfato de amonio. A y C) Actividad de las distintas fracciones obtenidas tras la precipitación, dilución y liofilización de los SLC de las cepas CL-19 y V4-1, respectivamente. B y D) Gels de electroforesis en Tris-Tricina-SDS teñidos con Comase de las distintas fracciones obtenidas luego de la precipitación, dilución y liofilización de los SLC de las cepas CL-19 y V4-1, respectivamente. También se observan los perfiles del medio de cultivo sin precipitar (MRS) y el SLC sin tratamiento. “Sobr.” Corresponde al sobrenadante obtenido tras la precipitación con un 80% de sulfato de amonio.

Incubación del gel en agar inoculado con *Listeria*

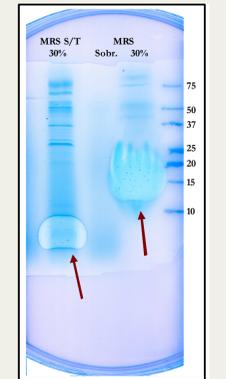


Figura 9 – Halos de inhibición (flechas) producidos al colocar el gel que contiene el SLC purificado y concentrado (precipitación y liofilización) de la cepa V4-1 en una placa con un recuento de *L. monocytogenes*. Se observan los perfiles de las fracciones obtenidas a partir del SLC de la cepa V4-1 creada en el medio MRS y en MRS sin recuento (MRS S/T).

Se hicieron ensayos modificando el medio de cultivo MRS para intentar determinar el componente que estaba causando la “mancha” en el gel de poliacrilamida

Estudios de estabilidad de la actividad

Tratamientos Proteínasa K y Pepsina

Perdida de actividad

Tratamientos térmicos

Tratamientos pH

Tratamiento	Actividad relativa (%)	
	CL-19	V4-1
37°C, 90 min	100%	100%
60°C, 30 min	100%	100%
60°C, 60 min	100%	100%
100°C, 15 min	100%	100%
100°C, 30 min	100%	100%
100°C, 60 min	100%	75%
Esterilización (121°C, 20 min)	100%	25%

Tabla 2 – Sensibilidad del principio con actividad anti-*Listeria* a tratamientos con temperatura.

pH	Actividad relativa (%)	
	CL-19	V4-1
2,0	100%	100%
3,0	100%	100%
4,0	100%	100%
5,0	100%	100%
6,0	100%	100%
7,0	100%	100%
8,0	100%	100%
9,0	100%	100%

Tabla 3 – Sensibilidad del principio con actividad anti-*Listeria* a diferentes pHs.

Modo de acción frente a *Listeria monocytogenes*

¿Modo de acción bactericida o bacteriostático?

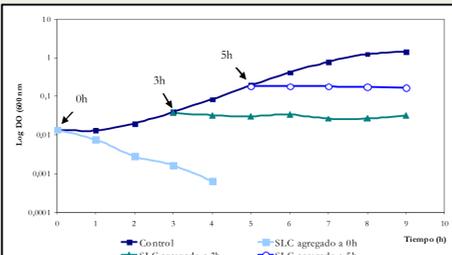


Figura 6 – Efecto del agregado de SLC en el desarrollo de *Listeria monocytogenes*.

Confirmación de resultados mediante recuento de viables

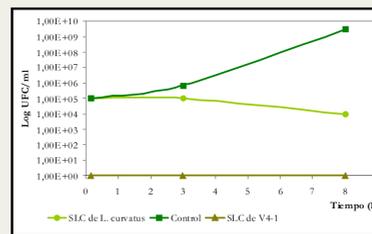


Figura 7 – Evolución de células viables de *Listeria monocytogenes* en el SLC de *L. curvatus* y de la cepa V4-1.

Espectro de inhibición

Diferencia de espectro de inhibición en crecimiento colonial:

- Mayor acidificación
- Señalizaciones Quórum Sensing – competencia nutricional, densidad celular

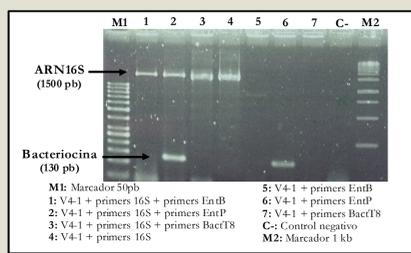
Inhibición de los SLC de la frente a los patógenos Gram-positivos: *S. aureus*, *B. cereus* y *L. monocytogenes*.

Promotor como método de bioconservación

Cepa indicadora	Cepa V4-1	
	Metodología estría	Metodología de la gota
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+
<i>Salmonella</i> spp.	+	+
<i>Es. coli</i> O157:H7	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+
<i>Poliovirus poliovirus</i>	+	+
<i>Lactobacillus curvatus</i>	+	+
<i>Lactobacillus sakei</i>	+	+

Tabla 4 – Estudio del espectro de actividad antimicrobiana de la cepa V4-1, utilizando la metodología de la gota y de la estría.

Detección de genes de bacteriocinas



Búsqueda de genes que codifican para Enterocina B, Enterocina P y Bacteriocina T8.

La cepa V4-1 contiene un gen similar al gen que codifica para la Enterocina P.

Figura 10 – Productos de PCR obtenidos utilizando los primers de los genes de las Enterocina B (119 pb), Enterocina P (131 pb), Bacteriocina T8 (177 pb) y ARN16S (1,5 kb) con la cepa V4-1.

Búsqueda de nuevas cepas con actividad anti-*Listeria*

Cepas aisladas a 16°C

Interés tecnológico

No se detectó actividad en los SLCs

A) CEPAS AISLADAS A 16°C CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA		
Nombre	Lugar de aislamiento	Identificación 16S
PI5	Vegetación de jardín exterior	<i>Lactococcus piscium</i>
CI1	Compost	<i>Weissella korrensii</i>

Figura 11 – Características de las cepas con actividad anti-*Listeria* aisladas a 16°C. A) Identificación y lugar de aislamiento de las dos cepas con mayor actividad. B) Halos de actividad frente a *L. monocytogenes* de las cepas aisladas: I. PI5, II. Clon PI5, III. Clon CI1 y IV. CI1

Discusión y Conclusiones:

A lo largo de esta investigación se ha trabajado en varias de las etapas que involucran la búsqueda, caracterización y purificación de bacteriocinas con actividad anti-*Listeria*.

En una primera instancia se trabajó con cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de leche de cabra (CL-19) y de heces de vacas (V4-1) que presentaban una fuerte actividad anti-*Listeria*. Se pudo comprobar que estas cepas producían un compuesto extracelular de naturaleza peptídica, de bajo peso molecular y muy estable a tratamientos de temperatura y pH. Al mismo tiempo, se caracterizó su actividad y su producción, las cuales se mostraron muy dependientes de la composición del medio de cultivo. Se comprobó que la cepa V4-1 presentaba un espectro de inhibición muy interesante al mostrar actividad antimicrobiana frente a otras cepas de bacterias patógenas gram +. Este espectro de acción así como sus propiedades (pH de acción y estabilidad térmica) sugieren que estas cepas podrían ser de gran interés para potenciales aplicaciones tecnológicas como bioconservantes, con el propósito de prevenir el desarrollo de patógenos así como de microorganismos alterantes en determinados productos alimenticios.

Mediante estudios con cebadores específicos se logró identificar que la cepa V4-1 contenía el gen que codifica para la Enterocina P, una bacteriocina de clase IIa descrita anteriormente (Cintas et al. 1997). Este resultado abre una posible nueva etapa de investigación, y al mismo tiempo, el conocer la secuencia de la bacteriocina producida podría facilitar de manera importante las etapas de purificación de la misma.

En el segundo bloque del trabajo se buscaron nuevas cepas con propiedades anti-*Listeria*. Para la búsqueda se estableció una temperatura de crecimiento y producción de actividad de 16 °C. Esta restricción permitiría encontrar cepas que habían sido pasadas por alto por otros investigadores ya que la mayor parte de los estudios se han realizado a 30°C, y a su vez, poder trabajar con bacterias que crecieran mejor a las temperaturas de conservación de los alimentos, pensando en una futura aplicación. En esta búsqueda se aislaron dos cepas: *Lactococcus piscium* y *Weissella korrensii*. Estas dos cepas, principalmente *L. piscium*, presentaban una actividad anti-*Listeria* muy importante al crecer en medio sólido. Los resultados obtenidos en esta etapa plantean la posibilidad de realizar futuros experimentos con el propósito de indagar más a fondo cuales son exactamente los factores que regulan la producción de esta principio antibacteriano, pudiendo finalmente definir las condiciones óptimas para su aplicación biotecnológica.

Resulta de gran interés para la industria alimentaria continuar con este tipo de estudios, dadas las exigentes demandas de alimentos seguros y naturales impuestas por los consumidores. Esto permitirá finalmente, aplicar y hacer uso del enorme arsenal de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas para desarrollar alimentos con una “inmunidad innata”, que permitirían influir y controlar las poblaciones microbianas de una forma previsible y beneficiosa.

BIBLIOGRAFÍA:

- Cintas, L.M., Casaus, P., Havarstein, L.S., Hernández, P.E., Nes, I.F. 1997. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin P, a Novel ser-Dependent Bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a Broad Antimicrobial Spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4321-4330.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews* 3:777-788.
- Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen, S., Von Wright, A., Ouweland, A. 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, Inc. New York USA.
- Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M., Nakanishi, K. 2000. Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *Journal of Applied Microbiology* 88:81-89.