

## **BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON POTENCIAL BACTERIOCINOGÉNICO OBTENIDAS DE QUESOS ARTESANALES DEL AUSTRO DEL ECUADOR**

María Fernanda Rosales-Medina<sup>1\*</sup>, Mariana Saa<sup>2</sup>, Jessica Calle<sup>2</sup>, Andrea Abri<sup>1</sup> y René Tejedor Arias<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Grupos Estratégicos de Investigación de la Carrera Ingeniería en Alimentos. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del Azuay. Av. 24 de Mayo 7-77 y Hernán Malo. Cuenca, Ecuador.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador.

<sup>3</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. La Habana, Cuba.

E-mail: mrosales@uazuay.edu.ec

Recibido: 16-10-2018 / Revisado: 20-11-2018 / Aceptado: 05-12-2018 / Publicado: 06-01-2019

### **RESUMEN**

El objetivo del trabajo fue identificar bioquímicamente varias cepas de bacterias lácticas aisladas de quesos artesanales del Austro del Ecuador y determinar su capacidad bacteriocinogénica. De las cepas identificadas se escogió *Lactococcus lactis*, el cual se cultivó en condiciones adecuadas y se obtuvo un extracto concentrado que se neutralizó con HCl 0,1N. Se evaluó su actividad inhibitoria frente a cepas de patógenos, que incluyeron estabilidad térmica, condiciones de pH y acción de enzimas. La actividad inhibitoria se evaluó por el método de difusión en pozo frente a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, no evidenciándose actividad frente a Gram negativas. El análisis de varianza ( $p \leq 0,05$ ) determinó que existe una ligera pérdida de actividad luego de los tratamientos en relación con la del extracto crudo neutralizado. No se descarta que el compuesto activo se trate de una bacteriocina con potencial uso en el control de microorganismos patógenos de interés en alimentos.

**Palabras clave:** bacteriocina, patógenos, extracto, *Lactococcus*, actividad, alimentos.

### **ABSTRACT**

**Lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential obtained from artisanal cheeses from south of Ecuador**

The aim of the present work was to identify biochemically several strains of lactic acid bacteria isolated from artisanal cheeses from the Austro of Ecuador and determine their bacteriocinogenic capacity. From the strains identified, *Lactococcus lactis* was chosen, which was cultivated under appropriate conditions. A concentrated extract was obtained, which was neutralized with 0,1N HCl. Their inhibitory activity was evaluated against strains of pathogens, which included thermal stability, pH conditions and the action of enzymes. The inhibitory activity was evaluated by the well diffusion method against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, with no evidence of activity against Gram negative bacteria. The analysis of variance ( $p \leq 0.05$ ) determined that there is a slight loss of activity after the treatments in relation to the neutralized crude extract. It is not excluded that the active compound, it is a bacteriocin with potential use in the control of pathogenic microorganisms of interest in foods.

**Keywords:** bacteriocin, pathogens, extract, *Lactococcus*, activity, foods.

### **INTRODUCCIÓN**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) comprenden un grupo de microorganismos heterogéneos que tienen una propiedad metabólica común, la producción de ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de los carbohidratos (1). Las BAL son Gram (+),

\***María Fernanda Rosales Medina:** Ingeniera en Alimentos (Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil-Ecuador), Magister en Gestión de la Calidad y Seguridad Alimentaria (Universidad del Azuay, Cuenca-Ecuador). Profesor titular e investigadora, coordinadora académica de la carrera de Ingeniería en Alimentos (Universidad del Azuay, Cuenca-Ecuador). Experiencia en la industria de procesamiento de alimentos como Jefe de calidad y docente de pregrado y posgrado.

no esporuladas, catalasa negativa, ácidos tolerante y anaerobias facultativas. Excepto por unas pocas especies, los miembros de las BAL son organismos no patogénicos con un reputado estatus «Reconocidas generalmente como seguras» (GRAS), las cuales, además del ácido láctico, producen una gran variedad de productos de fermentación tales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono y ácido fórmico (2).

Las actividades enzimáticas de las BAL contribuyen a las propiedades finales organolépticas, reológicas y nutricionales de los productos fermentados (3). Las cepas de algunas especies han sido tradicionalmente usadas como probióticos y adicionadas como bacterias funcionales en varios sistemas alimentarios (4). La explotación comercial de las BAL como iniciadores y cultivos probióticos es económicamente muy significativa. Consecuentemente, la investigación en su genética, fisiología y aplicaciones ha despuntado en los últimos 25 años (5, 6).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente, producidas por bacterias que son activas contra otras bacterias. Se ha notado que la actividad de las bacteriocinas es frecuentemente dirigida contra bacterias que están relacionadas a las cepas productoras o contra bacterias encontradas en ambientes similares. También se ha observado que algunas bacteriocinas pueden jugar un rol en la señalización celular. Los microorganismos que producen bacteriocinas también poseen mecanismos que les confieren protección a ellas mismas (7, 8).

La producción de bacteriocinas parece depender del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora (9). Salvo escasas excepciones, son péptidos de bajo peso molecular, de naturaleza catiónica e hidrofóbicos, que forman poros en la membrana plasmática de las células sensibles siendo, por lo tanto, bactericidas (10). Otro mecanismo de acción propuesto sobre la permeabilidad de la membrana celular por parte de las bacteriocinas, es que estas desestabilizan la membrana a modo de un detergente biológico (11).

La actividad antibacteriana de las bacteriocinas producidas por BAL, se pronuncia en la fase logarítmica y en la fase estacionaria, por lo que a la hora de aplicarlas a un alimento a partir de un cultivo iniciador o para su purificación, es importante considerar la etapa en la cual se alcanza la velocidad máxima de producción,

aumentando con ello la efectividad del proceso de acción de estos compuestos ante microorganismos alterantes o patógenos de interés (12).

Como es habitual en las rutas metabólicas de los microorganismos, la síntesis de las bacteriocinas también depende del ecosistema, pH, potencial de óxido reducción, cantidad de nutrientes, fase de crecimiento, temperatura y oxígeno disponible. Así mismo, son inactivadas por enzimas como la tripsina y la pepsina, las cuales al encontrarse en el tracto digestivo no permiten que las bacteriocinas alteren la microbiota existente en él (13). El presente trabajo busca identificar bacterias lácticas con potencial bacteriocinogénico contra bacterias patógenas de interés en el procesamiento de alimentos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron 45 muestras de quesos elaborados artesanalmente en San Fernando, Bulán y Biblián del Austro del Ecuador. Las muestras se sembraron en agar MRS (Merck, Alemania) y en agar M17 (Oxoid, Francia), a diferentes temperaturas (30 y 37 °C), pH (5,5 y 6,5) en ambiente microaerófilo, obteniendo cultivos axénicos. Los microorganismos cultivados, fueron observados al microscopio para clasificarlos según su morfología celular.

A los cultivos puros se les realizaron pruebas bioquímicas, utilizando el set API 50 CHL (BiomMérieux, Francia), se tomaron en cuenta solo aquellas pruebas que se identificaron con un 90 % o más de probabilidad de identificación.

El inóculo de cada bacteria se ajustó a un STD 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  ufc/mL) en caldo MRS y se incubó por 72 h. Luego de la incubación los tubos que contenían los crecimientos bacterianos se llevaron a una centrifuga refrigerada (Eppendorf, USA) para la separación de las células y obtener el sobrenadante que contiene los compuestos de interés.

Los inóculos crecidos se centrifugaron a  $4\,000 \text{ min}^{-1}$  por 30 min a 4 °C, el sobrenadante obtenido se pasó por jeringas de filtración estériles de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro. Este caldo filtrado se colocó en frascos Erlenmeyer de 250 mL esterilizados previamente y se dejó por aproximadamente 100 h a 35°C en una estufa (ESCO,

Corea). A los extractos concentrados se les midió el pH y luego se adicionó una solución de NaOH 1N para neutralizar el medio.

Se realizó una siembra en césped de cada patógeno a estudiar, en agar Müller Hinton (Merck, Alemania) y se formaron orificios en el agar, estos se llenaron con 10 µL de cada extracto crudo y se secaron. Se incubaron las cajas por 24 h a 37 °C y se revisaron los halos de inhibición, se tomaron como positivos aquellos halos que eran mayor a 7 mm. Las pruebas fueron realizadas por triplicado.

Uno de los extractos de las bacterias lácticas aisladas que ha sido parcialmente caracterizado en este trabajo es el extracto del *Lactococcus lactis*.

Se realizaron tres pruebas de caracterización, los extractos fueron sometidos a 65 °C por 30 min y 80 °C por 10 min, además de cambios de pH (4,5 y 5,5) adicionando HCl 0,1N para simular una condición ácida en el medio y se adicionó al extracto las enzimas alfa amilasa y quimosina. Se procedió en cada prueba como se menciona anteriormente, utilizando el método de halos de inhibición.

Sobre los datos obtenidos como resultado de las pruebas de inhibición para la caracterización del extracto de *L. lactis*, se realizó la evaluación estadística por medio del análisis de varianza con un diseño factorial de tres factores. El modelo factorial final pretendía verificar diferencias en el diámetro del halo de inhibición influenciado por el efecto de tres variables inde-

pendientes (Tratamiento = Tt, microorganismo = Mo y día), sobre el diámetro del halo de inhibición en milímetros. El factor tratamiento incluye nueve niveles (EC = extracto crudo neutralizado, CN = control negativo, CP = control positivo, AA = alfa-amilasa, QS = quimosina, pH1 = 4,5, pH2 = 5,5, T1 = 65 °C por 30 min, T2 = 80 °C por 10 min), para microorganismos existen dos niveles (Sa = *S. aureus* y Lm = *L. monocytogenes*) y Día incluye dos niveles correspondientes a los días de ensayo (día a y día b).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 12 cepas sin identificar bioquímicamente. Por sus características microscópicas y la reacción negativa a la prueba de la catalasa y oxidasa, estas cepas pueden ser clasificadas de manera preliminar como bacterias ácido lácticas.

La Tabla 1 muestra las siete cepas que lograron ser identificadas con una confirmación superior al 90 %, según la prueba bioquímica API 50 CHL.

Las BAL producen diferentes sustancias con características antimicrobianas, dentro de las cuales se destacan el ácido acético y el ácido láctico, que resultan luego de la fermentación de los carbohidratos presentes en los medios de cultivo, provocando una caída del pH (14), y, por ende, el efecto protector (15). Debido a que en este trabajo se busca la presencia de bacteriocinas, se neutralizó el extracto para evitar la interferencia de los ácidos presentes.

**Tabla 1. Cepas de BAL identificadas con API 50 CHL**

Código	Bacteria	Lugar de muestreo	Porcentaje de identificación
Lb11	<i>Lactobacillus brevis</i>	Bulán-Paute-Azuay	90,0
La11	<i>Lactococcus lactis</i>	Bulán-Paute-Azuay	96,5
Le11	<i>Leuconostoc lactis</i>	San Fernando - Azuay	95,0
La21	<i>Lactococcus lactis</i>	San Fernando - Azuay	99,1
Lb32	<i>Lactobacillus brevis</i>	San Fernando - Azuay	96,0
Lp12	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Biblián - Cañar	95,3
Lc32	<i>Lactobacillus paracasei spp. paracasei</i>	Biblián - Cañar	99,8

La Tabla 2 muestra la actividad antimicrobiana de los extractos de las siete cepas de BAL identificadas. Se consideraron halos mayores a 7 mm para determinar si los extractos estaban produciendo efecto o no sobre las bacterias patógenas (16).

Estos resultados, aunque algunos extractos no se pudieron probar contra todas las bacterias patógenas, brindan una referencia de cómo se estarían comportando los extractos frente a las bacterias. Se puede observar una actividad eficaz de los extractos frente a las Gram (-), lo cual indica que se pueden tener potenciales sustancias inhibitorias, sin descartar realizar nuevos estudios de caracterización.

En la Tabla 3 se observa como los resultados de la actividad inhibitoria del extracto crudo de *L. lactis* (La11) no se ven afectados por los cambios de pH, temperatura y enzimas frente a las bacterias Gram (+). Las bacterias Gram (-) no fueron inhibidas en su crecimiento.

En el modelo factorial final del análisis de varianza, todos los efectos probados fueron estadísticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ). El efecto principal de microorganismo con valor  $F(1, 53) = 36,35$ ,  $p < 0,001$ , expresa la diferencia de respuesta inhibitoria entre Lm y Sa. El efecto principal correspondiente a los tratamientos produjo  $F(8, 53) = 238,68$ ,  $p < 0,001$ , implicando al menos una diferencia significativa con respecto al tipo de tratamiento aplicado. Para el efecto principal Día se obtuvo  $F(1, 53) = 26,71$ ,  $p < 0,001$ , por lo que considerarlo como factor de bloqueo fue conveniente para el modelo; además, su varianza estimada alcanza a 0,86, siendo un valor relativamente bajo comparado con los promedios de halo de inhibición de los tratamientos. Finalmente, la interacción entre tratamiento y microorganismo dio un valor  $F(8, 53) = 5,91$ ,  $p < 0,001$ , lo cual indica una diferente respuesta por microorganismo al cambiar el tratamiento.

**Tabla 2. Actividad antibacteriana de los extractos de BAL contra bacterias patógenas**

Bacteria patógena	Extractos crudos neutralizados						
	Lb11	La11	Le11	La21	Lb32	Lp12	Lc32
<i>S. aureus</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	NP	(+)
<i>L. monocytogenes</i>	(+)	(+)	NP	NP	NP	(+)	NP
<i>E. coli</i>	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	NP	NP
<i>S. Enteritidis</i>	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(+): halos de inhibición > 7 mm

(-): halos de inhibición ≤ 7 mm

NP: no probado

**Tabla 3. Evaluación de la actividad inhibitoria del extracto crudo de *L. lactis* (La11) sometido a diferentes tratamientos**

Bacteria patógena	Prueba a diferentes pH		Prueba a diferentes temperaturas (°C)		Prueba a diferentes enzimas	
	4,5	5,5	65	80	Alfa-amilasa	Quimosina
<i>S. aureus</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>L. monocytogenes</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>S. Enteritidis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>E. coli</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(+): halos de inhibición > 7mm

(-): halos de inhibición ≤ 7mm

En los resultados del ensayo de actividad inhibitoria del extracto crudo neutralizado, se encontró que efectivamente existe una actividad positiva para inhibición de los microorganismos patógenos empleados; sin embargo, este patrón se presentó únicamente frente a las cepas indicadoras de *S. aureus* y *L. monocytogenes*, mientras que para *S. Enteritidis* y *E. coli* no se evidenció ningún efecto inhibitorio. Este hallazgo indica que en el extracto crudo neutralizado probablemente se encuentre alguna sustancia con efecto inhibitorio diferente al producido por los ácidos orgánicos; además que el extracto proviene de una cepa de *Lactococcus lactis* cuya incidencia de producción de sustancias con actividad inhibitoria tipo bacteriocina es alta y reconocida ampliamente. Varios autores han determinado que la actividad antagonica de las bacteriocinas se presenta por lo general sobre microorganismos relacionados taxonómicamente a las bacterias que las producen y, por otro lado, afirman que la susceptibilidad de las bacterias Gram (-) a las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas es mucho más limitada y que el efecto no se percibe, a menos que se altere el componente lipopolisacárido de la membrana externa de estos microorganismos (17).

Se observa que la actividad inhibitoria del extracto crudo neutralizado, sometido a diferentes tratamientos de caracterización bioquímica, permanece frente a las cepas indicadoras *L. monocytogenes* y *S. aureus* con una ligera disminución, luego de someterle a condiciones de temperatura, pH y tratamiento con enzimas.

Los resultados de estos ensayos de caracterización bioquímica muestran que la sustancia con actividad inhibitoria que se encuentra en el extracto crudo neutralizado presenta una estabilidad térmica, puesto que se presentaron los halos de inhibición luego de los tratamientos térmicos aplicados (T1 = 65 °C por 30 min y T2 = 80 °C por 10 min), dichos tratamientos se utilizaron por su frecuencia de aplicación en el procesamiento de alimentos (18). Se estableció además los ensayos a distintas condiciones de pH, manejándose valores en

la escala ácida, pues las bacteriocinas de BAL son generalmente estables a pH ácido o neutro (16). Como resultado del tratamiento a distintas condiciones de pH (pH1 = 4,5 y pH2 = 5,5), se pudo determinar que la sustancia con efecto inhibitorio sigue activa luego de someterla a las condiciones de pH del ensayo. Finalmente, con respecto a los ensayos de sensibilidad frente a enzimas, se pudo determinar que el compuesto responsable de la actividad inhibitoria no fue sensible a la acción de la alfa-amilasa (AA) y quimosina (QS); sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que se trate de un compuesto de naturaleza proteica, sino que más bien, las enzimas empleadas no inactivaron el compuesto, por esa razón se observaron halos de inhibición luego de los tratamientos; en el caso de la alfa-amilasa por tratarse de una enzima con actividad sobre carbohidratos, la presencia de inhibición puede indicar que el compuesto responsable de la actividad no está asociado a éstos. No se encontraron reportes en los que se haya utilizado quimosina, sin embargo, al tratarse de una aspartil-proteasa, se puede presumir que el compuesto responsable de la actividad inhibitoria no fue hidrolizado por acción de la enzima. Las enzimas que se utilizan comúnmente para determinar la naturaleza proteica de los extractos obtenidos de BAL son pepsina, papaína, quimotripsina, tripsina y Proteínasa K (19, 20), sin embargo, no se pudieron disponer para el ensayo.

## CONCLUSIONES

Se lograron aislar e identificar mediante el sistema API 50 CHL, siete cepas autóctonas de bacterias ácido lácticas obtenidas a partir de muestras de quesos de las provincias de Cañar y Azuay, del Austro ecuatoriano. Los extractos crudos neutralizados y filtrados mostraron de manera preliminar un efecto inhibitorio tanto frente a bacterias Gram (+) como Gram (-). El extracto crudo neutralizado de *L. lactis* (La11) probado a diferentes valores de temperatura, pH y enzimas tuvo efecto inhibitorio sobre *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

## REFERENCIAS

1. Carr F, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: A literature survey. Crit Rev Microbiol 2002; 28(1): 281-370.
2. Hugenholtz, J. The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. Int Dairy J 2008; 18(1): 466-75.
3. Leroy F., de Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci Technol 2004; 15(1): 67-78.
4. Ljungh A, Wadström T. Lactic acid bacteria as probiotics. Curr Issues Intest Microbiol 2006; 7(1): 73-89.

5. Wood B, Warner P. Genetics of Lactic Acid Bacteria. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003.
6. Gasson M, de Vos W. Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Berlin, Germany: Springer; 2004.
7. Cotter P, Hill C, Ross R. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3(1): 777-88.
8. Draper L, Ross R, Hill C, Cotter, P. Lantibiotic immunity. *Curr Protein Pept Sci* 2008; 9(1): 39-49.
9. Martínez B, Rodríguez A. Antimicrobial susceptibility of nisin resistant *Listeria monocytogenes* of dairy origin. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 252(1): 67 - 72.
10. Mota-Meira M, Lacroix C, LaPointe G, Lavoie M. Purification and structure of mutacin B-N y 266: A new lantibiotic produced by *Streptococcus mutans*. *FEBS Lett* 1997; 410(1): 275-9.
11. Cintas L, Casaus M, Herranz C, Nes I, Hernandez P. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci Technol Int* 2001; 7 (4): 281-305.
12. O'Sullivan L, O'Connor E, Ross R, Hill C. Evaluation of live - culture – producing lacticin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear – ripened cheese. *J Appl Microbiol* 2006; 100(1):135-43.
13. Marcos E, Castillo F, Dimitrov S, Gombossy de Melo B, De Souza R. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 2013; 32(1): 134-42.
14. Martínez-Barragán I, González-Martínez B, Campos-Góngora E, Barba de la Rosa A, Jiménez-Salas Z. Identificación molecular de probióticos aislados de alimentos y suplementos: comparación con métodos bioquímicos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 2008; 9(1): 4-6.
15. Agudelo N, Torres-Taborda M, Álvarez-López C, Vélez-Acosta L. Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Rev. Alimentos Hoy* 2015; 23(36): 186-205.
16. Estrada A, Gutiérrez L, Montoya O. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* spp. contra *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*. *Rev. Fac. Nal. Agr.* 2005; 58(1):2601-9.
17. Vásquez S, Suárez H, Zapata B. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*. 2009; 36(1): 64-71.
18. Martínez B, Bottiger T, Schneider T, Rodríguez A, Sahl H, Wiedemann I. The unmodified bacteriocin lactococcin 972 specifically interacts with the cell wall precursor lipid II. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(1): 4666-700.
19. Roldán M, Otero J, Villarreal F, Baroni M, Carrasco M, Alvarez C, Russell-White K, Méndez E, Simonetta A. Efecto inhibidor de *Lactobacillus casei* 206/1 contra *Escherichia coli* O157:H7. *Rev. Soc Ven Microbiol* 2011; 31(1):37-41.
20. Jami G, Kneifel W, Domig K. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocinas produced by *Lactobacilli* isolated from Sturgeon fish. *Food Control*. 2013; 32(1): 375-89.