

## **Inhibición de listeria INNOCUA ast 062 por la bacteriocina de pediococcus ACIDILACTICI itv 26 encapsulada en alginato de calcio**

Magdalena Jiménez, Patricia Mendoza, José Tejero y Rosa Oliart

M. Jiménez, P. Mendoza, J. Tejero y R. Oliart.

Instituto Tecnológico Superior of Huatusco Av.25 Poniente 100 Col. Reserva Territorial cp. 94100 Huatusco, Ver. México

Instituto Tecnológico de Veracruz. Laboratorio de Microbiología. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Av. Miguel Ángel de Quevedo 2779 Col. Formando Hogar cp. 91897 Veracruz, Ver. México  
magdajh01@gmail.com

M. Ramos., V.Aguilera., (eds.) .Ciencias de la Ingeniería y Tecnología, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2014.

## Abstract

Bacteriocins produced by lactic acid bacteria are natural bioactive compounds that can be used as food preservatives, the addition of bioactive ingredients to foods affect its bioactivity. These works study the activity and stability of the bacteriocin produced by the *Pediococcus acidilactici* ITV 26 encapsulated in calcium alginate beads. The bioactivity was evaluated measuring the antilisterial activity of the encapsulated bacteriocin, on model food. *P. acidilactici* ITV 26 was cultivated on MRS broth and incubated at 37° C for 18 h for the production of bacteriocin. *Listeria innocua* was a sensitive strain. The stability was determined in glucose and albumin to 2.0, 5.0 and 10 % (p/v). The crude extract of bacteriocin (BCE) was encapsulated by extrusion in calcium alginate to 1%. The experimental release results were analysed by ANOVA. An activity significant difference ( $\alpha > 0.05$ ) between glucose to 5 % and 2 % compared against the glucose to 10 % was observed. The albumin to 2 % was significant different with regard to albumin to 5 and 10 %. It was observed a main stability of the bacteriocin when it was contacted with glucose at 10 % and albumin at 5 %, remaining 87.5 % of it is original activity in both treatments.

## 11 Introducción

Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas y utilizadas como conservadores en alimentos pueden sufrir una disminución importante en su actividad por efecto de los diferentes componentes de un alimento, pH, azúcares, proteínas, lípidos y sales. Una alternativa es utilizar alginato de calcio para encapsular a dichas bacteriocinas, protegiendo su actividad y asegurando su estabilidad como parte del desarrollo tecnológico considerado como microencapsulación, por medio de la cual es posible la adición de compuestos bioactivos a los alimentos, las cuales han demostrado efecto contra bacterias alterantes y patógenas como *Listeria monocytogenes* [1,6].

### 11.1 Metodología

#### Cepas y condiciones de cultivo

*P. acidilactici* ITV 26 conservada por liofilización, se cultivó en caldo MRS y se incubó a 37° C por 18 horas. La cepa se conservó en glicerol al 40 % (v/v) a -20° C

La cepa sensible fue *Listeria innocua* AST 062, se cultivó en caldo LB a 37° C por 18 horas. Fue conservada en glicerol al 40 % (v/v) a -20° C

#### Determinación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en agar [7], a partir de un cultivo fresco de *L. innocua* AST-062. Se prepararon placas de agar LB, por la técnica de vaciado en placa. Posteriormente se perforaron pozos sobre los cuales se depositaron 30 µL de las muestras de bacteriocina a evaluar, previamente diluida con regulador de fosfatos. Las placas se preincubaron a temperatura de refrigeración y posteriormente se incubaron a 37° C La actividad se expresó en UA/ml.

## **Preparación de los Modelos de Alimentos**

Se preparó una solución de albúmina de suero bovino al 2, 5 y 10 % (p/v), una solución de glucosa al 2, 5 y 10 % (p/v). Ambas soluciones se procesaron con regulador de fosfatos. Por otra parte, se preparó una emulsión de lecitina al 2 y 5 % con NaCl

## **Producción y purificación de la bacteriocina**

*P. acidilactici* ITV 26 se cultivó en caldo MRS y se incubó a 37° C por 18 horas. La purificación se realizó por el método de adsorción-desorción celular [8]. La bacteriocina purificada se congeló y liofilizó antes de evaluar la actividad. *P. acidilactici* ITV 26 se incubó a 37° C por 18 horas, posteriormente el cultivo se sometió a un tratamiento térmico a 70° C por 30 minutos y se ajustó el pH a 5.5 e incubó a 4° C, para favorecer la adsorción de la bacteriocina a las células productoras, se centrifugó a 12, 000 x g a 4° C por 20 minutos. Se obtuvo el sobrenadante libre de células (extracto crudo de bacteriocina) se ajustó a pH 6.8 con NaOH al 5 % (p/v) y se filtró a través de membrana Millipore (0.22 µm). Se almacenó en condiciones estériles, se conservó en congelación hasta la determinación de su actividad. Las células obtenidas se lavaron dos veces con regulador de fosfatos, se centrifugaron en las condiciones antes mencionadas, el sobrenadante así obtenido se conservó en congelación. El paquete de células se resuspendió en NaCl 100mM pH 2.0 para lograr la desorción de la bacteriocina y se centrifugó. La muestra de bacteriocina obtenida se ajustó a pH 6.8, se congeló y liofilizó.

## **Encapsulación de la bacteriocina**

La encapsulación de la bacteriocina, se realizó por la técnica de gelificación iónica y extrusión [4]. La bacteriocina purificada, se mezcló con alginato de sodio al 1% (p/v), la mezcla se extruyó por medio de una jeringa para insulina (30G x 13 mm) en una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.3 M.

Las cápsulas obtenidas se filtraron a través de papel Whatman, se almacenaron en condiciones estériles y se sembraron en los pozos de las placas de agar LB inoculado con la cepa sensible. Las placas se preincubaron a temperatura de refrigeración y se incubaron a 37° C por 12 horas. Posteriormente se observaron para determinar la presencia de halos de inhibición.

## **Determinación de Proteína**

La determinación del contenido de proteína en las muestras de bacteriocina se realizó por el método de Bradford [3], utilizando albumina de suero bovino como proteína estándar.

## **11.2 Resultados y discusión**

### **Actividad antimicrobiana de la bacteriocina**

La actividad de la bacteriocina expresada en unidades de actividad por ml, así como en unidades de actividad por miligramo de proteína, en las muestras purificadas y en extracto crudo, se observa en la tabla 1

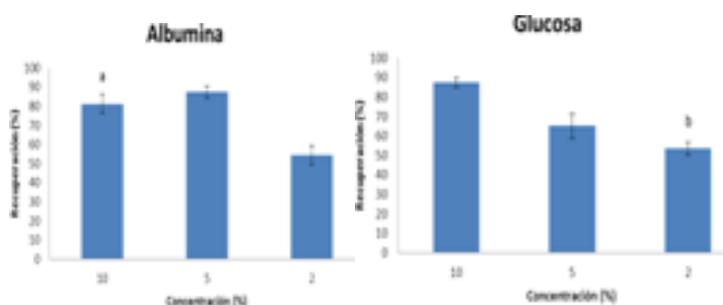
**Tabla 11** Actividad de la bacteriocina purificada y en extracto crudo

Muestra	Actividad (UA/ml)	Actividad (UA/mg)
Bacteriocina Purificada	6,600	22,405
Bacteriocina ECB	2,333	11,017

### Actividad de la bacteriocina encapsulada en modelos alimenticios

Se observó que la recuperación de la actividad de la bacteriocina encapsulada en alginato de calcio, fue del 87.5 % en los tratamientos formulados con albumina al 10 % y 5 %, así como en los tratamientos con glucosa al 10 y 5 %, en comparación a la recuperación de la actividad observada en los tratamientos con albumina y glucosa a una concentración del 2 %, en los cuales se recuperó el 54.0 % de la actividad original, como se observa en la figura.

**Figura 11** Recuperación de la actividad de la bacteriocina encapsulada en los sistemas alimenticios modelo



### 11.3 Discusión

Las muestras de bacteriocina purificada por el método adsorción-desorción celular, presentaron una actividad mayor en comparación a la actividad observada en las muestras de bacteriocina en extracto crudo, lo cual se ha reportado en el caso de Pediocina PA-1/AcH purificada por este método, que se basa en la afinidad que existe entre las moléculas de bacteriocina y la membrana de las células productoras en función del pH. Reportándose para esta bacteriocina una actividad de 800 UA/ml y 3,276,800 UA/ml en muestras en extracto crudo y muestras obtenidas posteriormente al proceso de diálisis y precipitación, respectivamente [2].

La bacteriocina encapsulada en alginato de calcio inhibió el crecimiento de la cepa sensible, observándose halos de inhibición. Lo cual sugiere que la actividad de la bacteriocina fue estable después del proceso de encapsulación, aun después de estar en contacto con los modelos de alimentos, a diferentes concentraciones. Estos resultados son congruentes con lo reportado para otras bacteriocinas como lo señalan estudios realizados sobre la actividad de la bacteriocina sintetizada por *Enterococcus faecium* CRL 1385 encapsulada por gelificación iónica, sobre las células de *L. monocytogenes* 99/287. Demostrando que la enterocina inhibió el crecimiento del patógeno en dos ciclos logarítmicos, en medio sólido y líquido [4,5].

## 11.4 Conclusiones

De los modelos alimenticios utilizados, la albumina a menor concentración fue el factor que causó la mayor disminución de la actividad de la bacteriocina en extracto crudo.

La encapsulación de la bacteriocina de *P. acidilactici* ITV 26 por extrusión utilizando alginato de calcio como material encapsulante, es un método viable para ayudar a estabilizar la actividad antimicrobiana, protegiéndola del efecto de los ingredientes de un alimento.

El método de purificación por adsorción celular permitió obtener bacteriocina purificada, la cual se utilizará en posteriores estudios.

## Referencias

- [1] Benech, R.O., E. Kheadr, C. Lacroix and I. Fliss 2002 Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during cheddar cheese ripening.68: 5607-5619
- [2] Bhunia, A. and M.G. Johnson1992. A modified method to directly detect in SDS-PAGE the bacteriocina of *Pediococcus acidilactici*. Letters in Appl.Microbiol.15: 5-7
- [3] Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- [4] Ibareuren, C., C. Grosso , M.C. Apella and M.C. Audisio 2008 Microencapsulación de bacteriocinas sintetizadas por *Enterococcus faecium* CRL1385 por gelificación iónica Jornada.XIII Jornadas Argentinas de Microbiología. Rosario. Santa Fe, Argentina.
- [5] Ibareuren, C., C. Grosso M.C. Apella and M.C Audisio 2012. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of enterocins microencapsulated by ionic gelation. Food Hydrocolloids. 29: 21-26
- [6] Malheiros, P., V. Sant'Anna M. Utpott and A. Brandelli 2012. Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide p34 in milk.Food Control 23:42-47
- [7] Schillinger, U. and F.K. Lücke 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1901-1906
- [8] Yang, R., C. Johnson and B. Ray 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol.58: 3355-3359