

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN PRESENCIA DE POLIOLES

Rubén Espinosa Salgado^a, Angélica Román Guerrero^a, Isabelle Gaipe-Perraud^b, Gabriela M. Rodríguez Serrano^a, Gerardo Saucedo Castañeda^a

^a Depto. de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, v. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Secc, 09340, Ciudad de México, 09340, MÉXICO

saucedo@xanum.uam.mx

^bInstitut de Recherche pour le Développement (IRD), Francia.

Resumen

Este trabajo tuvo como finalidad evaluar la capacidad antifúngica de 4 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) en presencia de polioles (sorbitol, manitol, xilitol, glicerol) a una concentración de 10 g/l al medio, empleando el medio de cultivo Man, Rogosa y Sharpe (MRS). La capacidad antifúngica fue ensayada utilizando el extracto libre de células después de 48 y 96 horas de cultivo sobre el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* un hongo que se desarrolla en productos como el café de la variedad robusta y que es productor de micotoxinas, dentro de las cuales la ocratoxina tipo A (OTA) es la de mayor interés. En esta investigación la variable respuesta fue el porcentaje de inhibición. Para este propósito, se utilizaron las técnicas de medios envenenados y discos de difusión en agar. Se encontró que al realizar el cultivo en presencia de polioles el extracto libre de células aumentó su capacidad antifúngica. El mayor efecto se observó con la bacteria ácido láctica 031 en presencia de glicerol, manitol y xilitol y BAL J con xilitol.

Introducción

La presencia de micotoxinas ha sido reportada en diversos alimentos ocasionando pérdidas económicas de hasta el 25% [1]. Dentro de las principales micotoxinas reportadas se encuentran: aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, patulina y ocratoxinas [2]. Dentro de las ocratoxinas la tipo A (OTA) es de mayor toxicidad. La OTA se encuentra clasificada por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) como posible agente carcinógeno humano y está relacionada con problemas nefrotóxicos, teratogénicos e inmunotóxicos [3].

La presencia de OTA en el café causa pérdidas económicas importantes a los países productores, la legislación europea ha establecido un nivel máximo para OTA en café tostado (5.0 mg/kg) y café instantáneo (10 mg/kg) [4].

El control biológico de los hongos productores de OTA es una alternativa para evitar la contaminación de alimentos. Las bacterias ácido lácticas han sido ampliamente utilizadas en la industria alimenticia y se encuentran clasificadas como GRAS (generally recognized as safe) por la FDA (Food and Drug Administration Agency). Las bacterias ácido lácticas son un grupo de microorganismos Gram-positivos, anaerobios facultativos no esporulados que fermentan un amplio rango de compuestos carbonados a ácido láctico [5].

Dentro de las bacterias ácido lácticas mayormente estudiadas se encuentra *Lactobacillus* las cuales metabolizan carbohidratos en ácido acético y láctico, así como diversos metabolitos secundarios (dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrógeno, ácidos grasos, acetoina, diacetilo, dipeptidos cíclicos, algunos de estos compuestos presentan capacidad inhibitoria contra hongos y levaduras [6].

De igual manera, se han reportado diversos compuestos antifúngicos (péptidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, compuestos de bajo peso molecular, etc.) producidos por bacterias ácido lácticas,

cada uno de ellos con mecanismos de acción distinta de acuerdo a su naturaleza química. La presencia de polioles en el medio de cultivo de bacterias ácido lácticas favorece la producción de compuestos antifúngicos [7], en el caso del glicerol se ha encontrado que su fermentación produce reuterina un compuesto con propiedades antifúngicas [8]. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto de la adición de polioles (sorbitol, manitol, xilitol, glicerol) al medio de cultivo MRS sobre capacidad antifúngica de 4 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de café (J, 002, 031, y 034).

Metodología

Preparación de cultivos de bacterias ácido lácticas (BAL)

La activación de las bacterias ácido lácticas (J, 002, 031, y 034) se realizó a partir de criotubos con el microorganismo conservados en glicerol inoculando 50 µl del criotubo en 9 ml de medio MRS (BD DIFCO™) estéril incubando 24 h a 30 °C. Se realizó la primer resiembra en tubos Falcon de 50 ml inoculando 36 ml de medio MRS con 4 ml del cultivo de activación e incubando 24 h a 30 °C. Se realizó una segunda resiembra trabajando en condiciones anaerobias utilizando botellas serológicas de 60 ml, inoculando 36 ml con 4 ml del cultivo de la primer resiembra, posteriormente se hizo circular una corriente de nitrógeno y se incubaron a 48, 72 y 96 h a 30 °C. El extracto libre de células fue obtenido centrifugando los cultivos a 8500 rpm durante 15 min a 10 °C. Se tomó una alícuota de 1ml para medir el consumo de polioles mediante HPLC (Shimadzu) con detector de arreglo de diodos utilizando una columna Aminex HPX-87H, utilizando como fase móvil H₂SO₄ 5 mM a un flujo de 0.3 ml/min, temperatura del horno de 60 °C, volumen de inyección de 20 µl.

Preparación de Aspergillus carbonarius DO16

La activación de *Aspergillus carbonarius* se realizó a partir de un conservado de esporas en medio CYA: glicerol (50:50 v/v) inoculando 50 µl en un matraz con 30 ml de agar PDA (BD BIOXON™) e incubando durante 7 días a 30 °C. Se realizó una resiembra colocando 500 µl en un matraz con 30 ml e incubando a 30 °C durante 7 días. Fue realizada una segunda resiembra inoculando 1 ml de una suspensión de esporas con una concentración de 1x10⁶ esporas/ml en cajas petri con 20 ml de agar Czapeck Extracto de Levadura (CYA) cuya composición fue: 0.1 g de K₂HPO₄, 0.5 g de extracto de levadura, 3 g de sacarosa, 100 de agua destilada y 1 ml de Czapek concentrado (KCl 5 g, NaNO₃ 30g, FeSO₄ 0.1g, MgSO₄ 0.5 g, agua destilada 100 ml).

Los medios de cultivo envenenados se prepararon en cajas Petri (90 x 15 mm) con agar CYA y el extracto libre de células de la segunda resiembra de las bacterias ácido lácticas (50% v/v). En el centro de las cajas fueron colocados discos de 8 mm de diámetro del cultivo de *A. carbonarius* en cajas Petri. Durante 4 días se evaluó el crecimiento radial del hongo con un vernier midiendo el diámetro del halo de crecimiento (mm), después fue calculado el porcentaje de inhibición con respecto al crecimiento de *Aspergillus carbonarius* en cajas Petri con medio control CYA:MRS (50% v/v).

Resultados

El consumo de polioles se muestra en la Tabla 1. Se puede observar una disminución de la concentración después de las 96 h de cultivo. El glicerol resultó ser el compuesto que fue consumido en menor cantidad, no obstante a las 96 h se observa un aumento en la capacidad antifúngica (Figura 2) bajo este tratamiento, indicando que su presencia es importante para la producción de metabolitos con capacidad antifúngica [5]. Los resultados indican que la adición de polioles al medio de cultivo MRS modifica el metabolismo de las bacterias ácido lácticas hacia la producción de metabolitos con

capacidad antifúngica, posiblemente el manitol, sorbitol y xilitol fueron utilizados como fuente de carbono debido a que después de las 96 h, las cantidades presentes en los extractos resultaron ser bajas.

**Tabla 7. Consumo de polioles por bacterias ácido lácticas cultivadas en medio MRS.
La concentración inicial de polioles fue de 10 g/L.**

Cepa	Poliol	Concentración a 48 h (g/l)	Concentración a 96 h (g/l)
BAL 031	Sorbitol	4.84	3.71
	Xilitol	3.67	1.15
	Glicerol	7.45	6.35
	Manitol	3.10	0.38
BAL J	Sorbitol	4.72	0.66
	Xilitol	3.75	0.87
	Glicerol	8.35	6.86
	Manitol	3.48	0.28
BAJ 002	Sorbitol	4.72	2.21
	Xilitol	3.82	1.34
	Glicerol	8.22	6.74
	Manitol	3.10	0.23
BAL 034	Sorbitol	4.88	3.47
	Xilitol	3.78	1.88
	Glicerol	7.77	7.07
	Manitol	3.48	0.14

Los resultados muestran que la inhibición aumenta cuando el extracto libre de células se obtiene después de 96 h de cultivo como se observa en las Figuras 1 y 2, donde al menos en tres tratamientos la inhibición es cercana al 100% (BAL 031 con xilitol, BAL 031 con manitol y BAL J con xilitol). Los demás tratamientos de igual manera presentan un aumento en la inhibición, probablemente debido a que después de las 48 h comienza a predominar el metabolismo secundario y como consecuencia hay un aumento de la producción de compuestos antifúngicos [5]. En el caso del glicerol es probable que como en otros trabajos se produzca reuterina [8].

En cuanto a la BAL 002 se observa un aumento en la capacidad antifúngica en presencia de sorbitol y en la BAL 034 con manitol, no obstante ambas cepas resultaron ser las menos efectivas.

Conclusiones

En este trabajo se encontró que la adición de polioles aumenta la capacidad antifúngica de los extractos libres de células, dichos resultados reflejan que los tratamientos BAL 031 con la adición de xilitol y manitol en el medio MRS y BAL J con xilitol son los mas propicios para inhibir el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* DO162.

Es necesario profundizar en más estudios para identificar los principales metabolitos producidos en estos tratamientos, así como las rutas metabólicas por las que se producen.

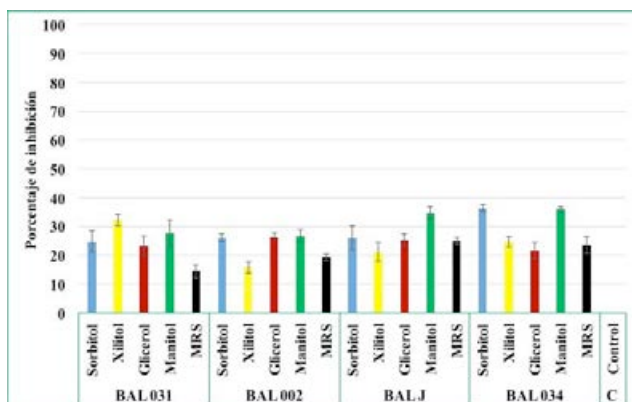


Figura 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Aspergillus carbonarius* DO0162 en medio CYA con 50% v/v del extracto libre de bacterias ácido lácticas de un cultivo bacteriano de 48 h.

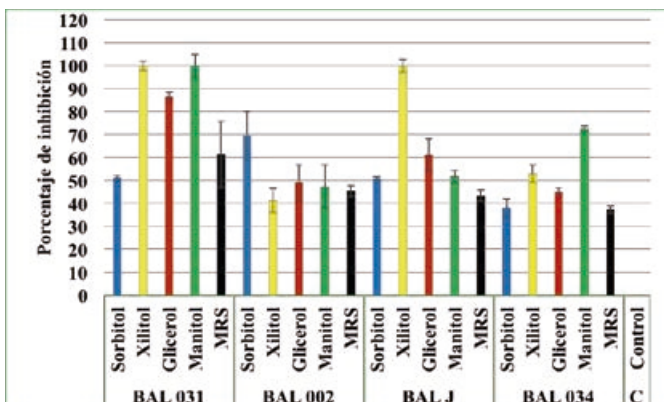


Figura 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Aspergillus carbonarius* DO0162 en medio CYA con 50% v/v del extracto libre de bacterias ácido lácticas de un cultivo bacteriano de 96 h.

Referencias

- Spadaro, D.; Gullino, M.L. "State of the art and future prospects of biological control of postharvest fruit diseases". International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.91, No. 2, p.185-194, 2004.
- Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Lakhal, F., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S., Roussos, S., "Anaerobe Robusta coffee beans post-harvest micro flora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*", Anaerobe, Vol 17 No 6, p. 267-272, 2011.
- Codex Alimentarius. Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de ocratoxina A en el café CAC/RCP 69-2009, 2009.
- STODY 1 THY - ' NYDY 2 HR / " QK - ' TXNS " 3BNQ ' @MCN 3 ' TIC * 0 Study of NECSNM! QCTBMF SQMRMBNEDQNBRLM International journal of food science & technology, 39(5), 501-507.
- Lipińska, L., Klewicki, R., Sójka, M., Bonikowski, R., Żyżelewicz, D., Kołodziejczyk, K., & Klewicka, E. (2017). Antifungal Activity of *Lactobacillus pentosus* LOCK 0979 in the Presence of Polyols and Galactosyl-Polyols. Probiotics and antimicrobial proteins, 1-15.
- Gaspar, P., Carvalho, A. L., Vinga, S., Santos, H., & Neves, A. R. (2013). From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. Biotechnology advances, 31(6), 764-788.
- Lipińska, L., Klewicki, R., Klewicka, E., Kołodziejczyk, K., Sójka, M., & Nowak, A., "Antifungal Activity of *Lactobacillus* sp. Bacteria in the Presence of Xylitol and Galactosyl-Xylitol". BioMed research international, Vol. 2016, 1-8, 2016.
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., & Richard-Forget, F., "Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review". Food control, Vol. 21 No. 4, p. 370-380, 2010.

AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



XXXIX ENCUENTRO NACIONAL **DE LA AMIDIQ**

"La Ingeniería Química como motor de la innovación"

SAN JOSÉ DEL CABO, BCS

del 1 al 4 de mayo de 2018

AMIDIQ
Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



Memorias del XXXIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ

**San José del Cabo, BJS, México
1 al 4 de Mayo de 2018**

AMIDIQ
Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



*“La ingeniería química como motor
de la innovación”*

AMIDIQ
Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



**La presentación y disposición en conjunto de:
“LA INGENIERÍA QUÍMICA COMO MOTOR DE LA INNOVACIÓN”
son propiedad de sus autores.**

**Coordinador: Guadalupe de la Rosa
Compilador: Ricardo Morales Rodriguez
Compilador: Eduardo Ramírez Sánchez
Compilador: Susana Figueroa-Gerstenmaier
Compilador: Ma. De los Angeles Mendoza
Compilador: Kevin Raúl Arriola González
Compilador: Daniela Hernández González
Compilador: Ramón González Pérez**

**D.R. ©2018, Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
(AMIDIQ) Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química
ISBN 978-607-95593-6-6
Impreso y hecho en México
Printed in Mexico
Memorias del XXXVIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ 1 al 4 de Mayo de 2018,
San José del Cabo, B.C.S., México**