

Ensayo de la bacteriocina AS-48 en la bioconservación de zumos de frutas

María José Grande Burgos, Hikmate Abriouel, Pilar Martínez, Rosario Lucas López

Programa de Doctorado "Avances en Ciencias de la Salud". Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas s/n, 23071, Jaén, España.

rlucas@ujaen.es

Resumen

La enterocina AS-48 es una bacteriocina de amplio espectro producida por *E. faecalis*. *Alicyclobacillus acidoterrestris* es una bacteria formadora de endosporas que causa alteraciones en los zumos de fruta. Se ha estudiado el control de esta bacteria por la enterocina AS-48. Esta bacteriocina es activa frente a todas las cepas ensayadas de *Alicyclobacillus acidocaldarius* y *A. acidoterrestris*. En zumos naturales de naranja y manzana incubados a 37°C, las células de *A. acidoterrestris* DSMZ 2498 eran inactivadas con una concentración de bacteriocina de 2.5 µg/ml hasta los 14 días. En zumos comerciales con AS-48 (2.5 µg/ml) e inoculados con células vegetativas de estas bacterias, incubados a 37°C, los recuentos se mantuvieron por debajo del límite de detección hasta los 60 días (en zumos de manzana, melocotón y uva) y de los 90 días (en naranja y piña), mientras se observaba crecimiento en los controles. En los cinco tipos de zumos comerciales de frutas ensayados no se detectó presencia de células de *A. acidoterrestris* en los 90 días de incubación a las temperaturas de 15 y 5°C y con una concentración de bacteriocina de 2.5 µg/ml. Las células vegetativas y endosporas tratadas mostraban serias alteraciones en su ultraestructura al microscopio electrónico.

Introducción

La bacteriocina AS-48 es un péptido cíclico producido por *Enterococcus faecalis* S-48, cuya purificación a homogeneidad y caracterización químico-física han sido establecidas (Gálvez et al., 1986, *Canadian Journal of Microbiology* 32:765-771; Gálvez et al., 1989a, *Antimicrob Agents Chemother* 33:437-441). Es de naturaleza básica (pI 10.5) con un Pm de 7.4 Kda con acción bactericida sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Gálvez et al., 1989a, *Antimicrob Agents Chemother* 33:437-441; Gálvez et al., 1989b, *Research in Microbiol* 140:57-68; Gálvez et al., 1989c, *Antimicrob Agents Chemother* 33:641-645; Gálvez et al., 1989d, *Can J Microbiol* 35:318-321). El blanco celular de AS-48 es la membrana citoplasmática en la que AS-48 forma canales, causando la detención gradual de todas las rutas biosintéticas ensayadas (proteínas, ADN, ARN), así como de la captación de precursores marcados, consumo de oxígeno y crecimiento celular. Igualmente altera los niveles intracelulares de Na⁺ y K⁺ y produce el colapso del potencial de membrana (Gálvez et al., 1990, *J Appl Bacteriol* 69:406-414; Gálvez et al., 1991, *J of Bacteriol* 173:886-89). Estudios recientes sobre la

estabilidad de AS-48 en solución demuestran que este péptido, posiblemente por su naturaleza hidrófoba, adopta formas multiméricas que son disociables en función de las condiciones ambientales (pH, concentración, fuerza iónica etc...) y que conservan su actividad biológica (Abriouel et al., 2000, *Curr Microbiol* 42: 89-95). El conocimiento de la estructura secundaria y 3D de AS-48, establecida mediante RMN (Langdon et al., 1998, *J Biomolec NMR* 12:173-175; González et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11221-11226) nos ha permitido realizar hipótesis acerca de su probable mecanismo íntimo de acción sobre la membrana y también acerca de las posibles modificaciones que se podrían introducir en la molécula para hacerla mas eficaz en sistemas alimentarios.

Se han realizado diversos estudios sobre la actividad de AS-48 en condiciones de laboratorio frente a *Listeria monocytogenes*, *Samonella choleraesuis*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Más recientemente, se está estudiando la efectividad de esta bacteriocina en sistemas alimentarios modelo. La seguridad de los alimentos de origen vegetal depende, en gran parte, de los métodos empleados para su preparación y conservación, y de la categoría del producto. La demanda, por parte de los consumidores, de alimentos frescos con un contenido mínimo o nulo en conservantes químicos ha motivado el uso extensivo de las técnicas de envasado al vacío y la refrigeración para extender la vida media de los alimentos perecederos y semiperecederos. Tras el envasado al vacío, las células del vegetal y los microorganismos asociados consumen pronto el oxígeno, creando condiciones anaeróbicas. Por ello, el envasado al vacío es una forma eficaz de extender la vida media de los alimentos vegetales, ya que reduce o impide el desarrollo de microorganismos alterantes aerobios, reduce la tasa de oxidación y la degradación enzimática, y la pérdida de agua.

Los zumos de frutas frescos deben conservarse bajo condiciones de refrigeración para evitar el desarrollo de microorganismos alterantes. Los zumos de frutas (y las bebidas que los contienen) pasteurizados comercializados a temperatura ambiente son propensos a alteraciones provocadas por aquellos microorganismos esporulados capaces de desarrollarse en el ambiente ácido de estos alimentos. Una de las especies más frecuentes es *Alicyclobacillus acidoterrestris* que provoca agriado sin gas, y libera compuestos que desprenden mal olor (como el guayacol). El género *Alicyclobacillus* pertenece a un grupo de bacterias termófilas con forma de bacilo que pueden aislarse de una gran variedad de jugos de fruta ácidos. Las esporas son muy resistentes a la temperatura y pueden sobrevivir a los tratamientos de pasteurización más utilizados en la industria de zumos. El conocimiento de la biología de este microorganismo todavía es escaso, si bien plantea importantes problemas microbiológicos a escala industrial.

El posible uso de cepas bacteriocinogénicas o de bacteriocinas para impedir el crecimiento de microorganismos patógenos o alterantes en los alimentos vegetales y zumos es de gran interés, existiendo diversos estudios que demuestran su viabilidad. El objetivo de este trabajo es evaluar el potencial de la enterocina AS-48 en el control de *Alicyclobacillus* en zumos de frutas.

Material y métodos

Microorganismos

Las cepas de *Alicyclobacillus acidocaldarius* y *A. acidoterrestris* utilizadas en este trabajo provienen del Laboratory voor Microbiologie Universiteit Gent (LMG) y del Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Las cepas se cultivaron a 37°C en el medio de cultivo para *Alicyclobacillus acidocaldarius*

(AAM) descrito por Yamazaki (Yamazaki et al., 2000, *Food Microbiol* 17:315-210). Como microorganismo productor de la bacteriocina AS-48, se utilizó el mutante A-48-32 de *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. Para determinar la actividad de la bacteriocina se utilizó *E. faecalis* S-47 (Gálvez et al., 1985, *Microbios* 43:223-232). Los enterococos se cultivaron en medio BHI a 37°C. Los enterococos y alicyclobacilos se conservaron a 4°C en BHI-agar y YPDA y a -80°C en 40% de glicerol.

Obtención de enterocina AS-48 a escala semipreparativa

La bacteriocina AS-48 se obtuvo a partir de un cultivo líquido de la cepa de *E. faecalis* A-48-32 en medio CMG seguido de una cromatografía de intercambio catiónico (Abriouel et al., 2003, *J. Microbiol. Meth.* 55:599-605). Los concentrados de bacteriocina fueron filtrados con filtros de 0.22 micras (Millex GV, Millipore) bajo condiciones asépticas. Posteriormente se ensayó la actividad de la bacteriocina por el método de los pocillos (Gálvez et al., 1986, *Canadian Journal of Microbiology* 32:765-771) utilizando como medio de sólido YPDA. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 48h hasta que se observó claramente la zona de inhibición.

Efecto de la bacteriocina frente a Alicyclobacillus

Se adicionaron diferentes concentraciones de bacteriocina a un cultivo en fase exponencial de *A. acidoterrestris* a 37°C en medio AAM, o bien en diferentes tipos de zumo. Los zumos naturales de naranja y manzana (pHs 3.86 y 3.55 respectivamente) se obtuvieron de naranjas californias y manzanas Golden licuadas en condiciones asépticas. Los zumos comerciales de naranja (Kasfruit, Vitoria, Spain; pH 4.12), manzana (Don Simón, Murcia, Spain; pH 3.92), piña (Kasfruit; pH 3.68), melocotón (Kasfruit; pH 4.02), y uva (Don Simón; pH 3.58) se compraron en locales comerciales. Se utilizaron 2 envases de tetrabrik de 200ml de zumo para cada experimento. Los zumos de frutas se inocularon con células vegetativas en fase exponencial crecidas en AAM, y se adicionaron de enterocina AS-48. Los zumos se repartieron en tubos Eppendorf estériles que se incubaron a temperaturas de 5°C, 15°C y 37°C. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación, se realizaron diluciones seriadas en solución salina y se sembraron por triplicado en medio YPDA. Las placas se incubaron a 37°C durante tres días contándose posteriormente el número de colonias para calcular la concentración inicial de células expresadas en unidades formadoras de colonias (UFC) por ml (UFC/ml).

Microscopía electrónica

Las células en fase exponencial así como las suspensiones de endosporas de la cepa *A. acidoterrestris* DSMZ 2498 (aprox. 10⁸ UFC/ml) en medio AAM fueron tratadas con AS-48 a 37°C. A los diferentes tiempos de incubación, las muestras (1.5 ml) fueron recogidas en tubos de Eppendorf por centrifugación (12.000 x g, 10 minutos) y después incubadas a 4°C durante 2 h en una solución de fijación [glutaraldehído 2.0 vol%/vol% (Merck, Madrid, España) y formaldehído 1.0 vol%/vol% (Merck) en tampón cacodilato sódico 0.1 M, pH 7.4; Merck] seguido de tres lavados (5 minutos cada uno) en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.4 (Merck). Las muestras fueron incluidas en resina 812®, seccionadas y montadas en las rejillas de cobre e impregnadas con acetato de uranilo al 2.0 vol%/vol% (Merck) y citrato de plomo al 2.0 vol%/vol% (Merck) antes de observarlas en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss EM10C (Carl Zeiss, Jena, Alemania) a 80 kilovoltios.

Resultados

Espectro de inhibición

Todas las cepas de *A. acidocaldarius* al igual que las de *A. acidoterrestris* ensayadas fueron sensibles a la enterocina AS-48, si bien se obtuvieron mayores niveles de actividad para la cepa DSMZ 3922.

Efecto de AS-48 frente a células vegetativas

Las cepas de *A. acidoterrestris* LMG 16906 y DSMZ 2498 se incubaron en AAM a 37°C con concentraciones de bacteriocina de 1.25 y 2.5 µg/ml. Para la concentración menor de bacteriocina ensayada, la concentración de células viables disminuyó rápidamente desde el inicio hasta el tercer día de incubación. Sin embargo fueron creciendo en los siguientes periodos de incubación. Para una concentración de bacteriocina de 2.5 µg/ml no se detectó crecimiento después de las 24 horas de incubación. Pasados los 14 días sólo se detectaron concentraciones muy bajas, de 20 UFC/ml.

Efecto de AS-48 frente a A. acidoterrestris DSMZ 2498 en zumos de frutas

Los zumos naturales de naranja y manzana se inocularon con un cultivo en fase exponencial de *A. acidoterrestris* DSMZ 2498 en AAM y se incubaron a 37°C, añadiéndole una concentración final de bacteriocina de 2.5 µg/ml. En el zumo de naranja la concentración de células viables aumentó 4.08 unidades logarítmicas durante los primeros siete días de incubación. En el zumo de naranja que contenía AS-48, no aparecieron células desde las 8 horas hasta los 15 días de incubación. En el zumo de manzana las células viables aumentaron 4.37 unidades logarítmicas después de 10 días de incubación. Al igual que en el zumo de naranja, no se observó crecimiento en la muestra tratada con bacteriocina durante el periodo de incubación.

Efecto de AS-48 sobre A. acidoterrestris DSMZ 2498 en zumos de frutas comerciales

Los zumos comerciales de naranja, manzana, piña, melocotón y uva, fueron inoculados con células vegetativas e incubados a temperaturas de 37°C, 15°C y 5°C con una concentración de bacteriocina de 2.5 µg/ml (**Fig. 1**).

En los zumos incubados a 37°C sin bacteriocina, la concentración de células aumentó variablemente entre los 15 y 30 días de incubación. Los mayores recuentos se obtuvieron para el zumo de melocotón seguido de naranja, manzana y uva, mientras que los recuentos más bajos se obtuvieron para el zumo de piña. En los zumos adicionados de bacteriocina no se observó crecimiento a partir de los 15 minutos de incubación a 37°C. Tan solo se observó crecimiento a partir de los 90 días de incubación en los zumos de naranja, y piña y de los 60 días en los de manzana, melocotón y uva, aunque el crecimiento era menor comparado con los controles no tratados con bacteriocina. Los zumos inoculados con células vegetativas e incubados a 15°C mostraron un incremento de 4.30 log₁₀ UFC/ml durante los 90 días de incubación. Por el contrario, en las muestras tratadas con bacteriocina no se observó crecimiento alguno. El recuento de células viables en zumos incubados a 5°C durante 90 días disminuyó durante el periodo de incubación, quedando 3.69 log₁₀ UFC/ml en el control. En las muestras que contenían bacteriocina la concentración de células viables disminuyó a partir de los 15 minutos, manteniéndose por debajo de los niveles detectables durante todo el periodo de incubación.

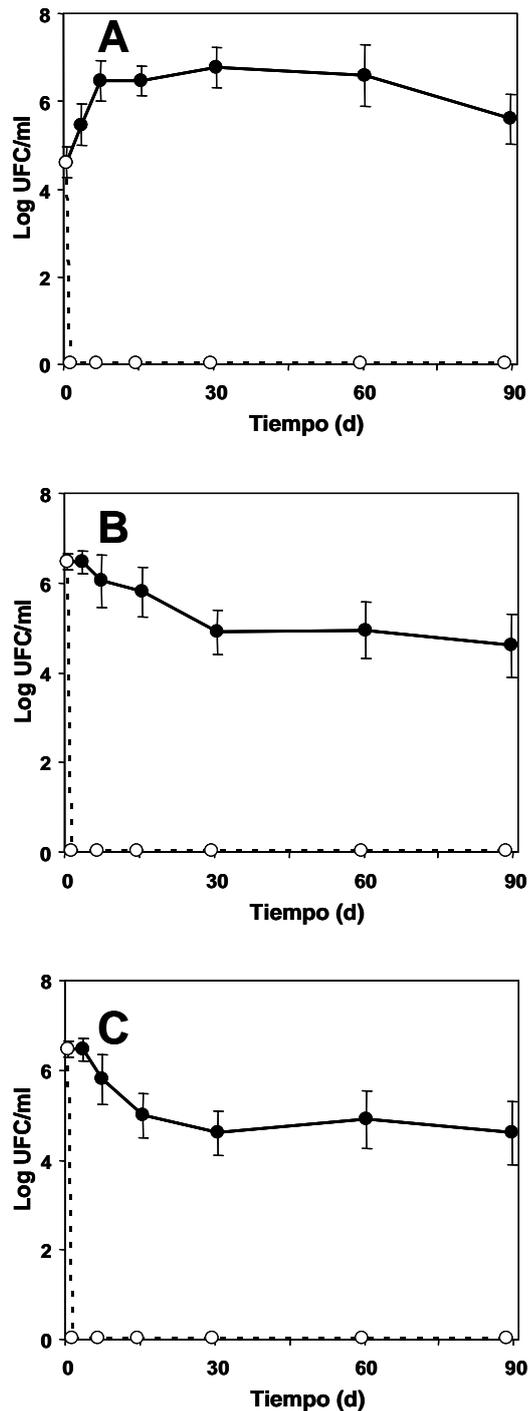


Figura 1. Curvas de crecimiento de *A. acidoterrestris* DSMZ 2498 en zumo comercial de naranja (símbolos rellenos), y efecto de la bacteriocina AS-48 (símbolos huecos). Las muestras fueron incubadas a 37°C (A), 15°C (B) y a 5°C (C).

Cambios estructurales de las células vegetativas y endosporas de A. acidoterrestris DSMZ 2498 tratadas con enterocina AS-48.

El análisis de microscopía electrónica de las células vegetativas así como de las endosporas de *A. acidoterrestris* DSMZ 2498 tratadas con enterocina AS-48 reveló cambios estructurales comparados con las células control (**Fig. 2**). Después de la adición de bacteriocina, se observó la aparición de daños en la pared celular

(Fig. 2B) y la pérdida de contenido citoplásmico. La desorganización de las células era más pronunciada a medida que aumentaba el tiempo de incubación. Las endosporas tratadas mostraban también cambios estructurales relevantes respecto al control (Fig. 2D).

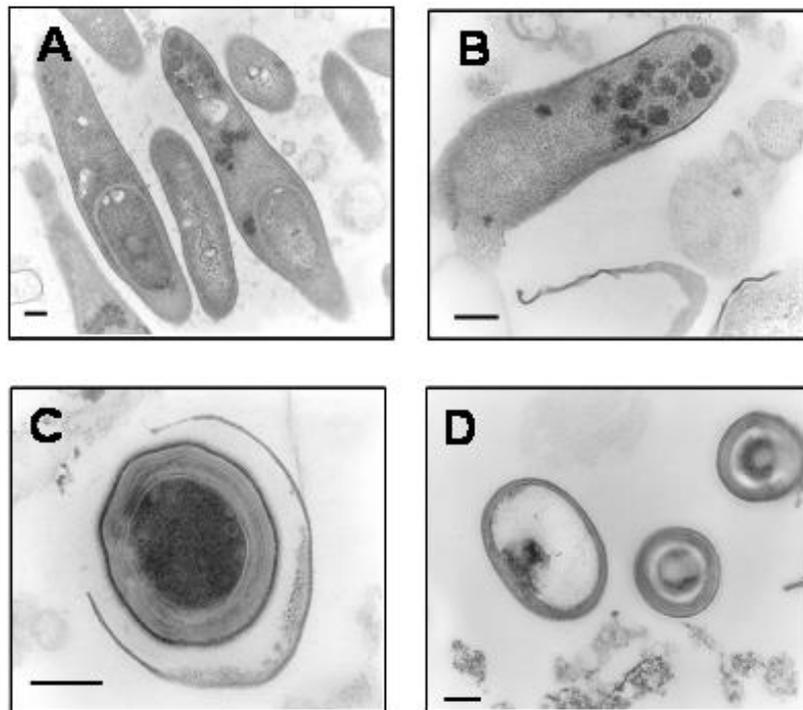


Figura 2. Observación a microscopía electrónica de transmisión *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSMZ 2498. Células vegetativas control (A) y tratadas con AS-48 durante 60 min (B). Endosporas control (C) y endosporas tratadas durante 8 h (D). Barra: 0.2 μm .

Discusión

Los resultados mostrados en este trabajo indican que las cepas de *Alicyclobacillus* pueden ser inhibidas por la enterocina AS-48 en un medio de cultivo de laboratorio, así como en zumos naturales y en los zumos comerciales de diferentes frutas. Además, una concentración de bacteriocina de sólo 2.5 $\mu\text{g/ml}$ parece ser suficiente para mantener los zumos de fruta ensayados libres de células viables de *A. acidoterrestris* por períodos de tiempo prolongados bajo condiciones de temperatura que permiten el crecimiento y la contaminación de los zumos por esta bacteria. Estas bajas concentraciones se encuentran en el rango de las concentraciones de nisina descritas frente *A. acidoterrestris* en zumos de naranja, piña y manzana (Komitopoulou et al., 1999, *Intl J Food Sci Technol* 34:81-85) así como en naranja y bebidas de diferentes frutas (Yamazaki et al., 2000, *Food Microbiol* 17:315-210). La incorporación de enterocina AS-48 en los zumos de fruta comerciales podía ser útil para aplicar tratamientos de calor menos intensos y disminuir a la vez el riesgo de alteración por *A. acidoterrestris*.

Agradecimientos

Financiado por el MCYT (proyecto AGL2001-3315-CO2-02) y la Junta de Andalucía (beca de investigación).