



HAL
open science

EFECTO DE LA ADICIÓN DE POLIOLES AL CULTIVO DE *Lactibacilus plantarum* SOBRE EL CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA *Aspergillus carbonarius*

Rubén Espinosa-Salgado, Isabelle Gaimé Perraud, Gabriela M
Rodríguez-Serrano, Gerardo Saucedo-Castañeda

► To cite this version:

Rubén Espinosa-Salgado, Isabelle Gaimé Perraud, Gabriela M Rodríguez-Serrano, Gerardo Saucedo-Castañeda. EFECTO DE LA ADICIÓN DE POLIOLES AL CULTIVO DE *Lactibacilus plantarum* SOBRE EL CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA *Aspergillus carbonarius*. La Ingeniería Química, el Desarrollo Nacional y la Responsabilidad Social, Memorias del XLI Encuentro Nacional de la AMIDIQ, Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química Publisher, BIO- p. 287-290, pp.287-290, 2020. hal-03218609

HAL Id: hal-03218609

<https://hal.science/hal-03218609v1>

Submitted on 6 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE POLIOLES AL CULTIVO DE *Lactibacillus plantarum* SOBRE EL CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA *Aspergillus carbonarius*

Rubén Espinosa-Salgado^a, Isabelle Perraud-Gaïme^b, Gabriela M. Rodríguez-Serrano^a, Gerardo Saucedo-Castañeda^a

^a Depto. de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, CDMX, 09340, México.

saucedo@xanum.uam.mx

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

Resumen

El uso de bacterias ácido lácticas como agente de biocontrol de patógenos presentes en productos de consumo humano tiene ventajas en comparación a métodos físicos y químicos. Estos microorganismos producen compuestos antifúngicos durante su metabolismo primario y secundario. La biosíntesis se favorece mediante la adición de factores nutricionales al medio de cultivo. En este trabajo se evalúa el efecto de la adición de polioles sobre el crecimiento y capacidad antifúngica del extracto libre de células de cultivos de *Lactobacillus plantarum*. Se utilizaron dos cepas de *L. plantarum* provenientes de procesos de ensilaje en Costa de Marfil y México, los polioles empleados fueron glicerol, xilitol, manitol y sorbitol; las curvas de crecimiento fueron ajustadas al modelo de Gompertz y la capacidad antifúngica fue determinada midiendo el crecimiento radial en cajas Petri de *Aspergillus carbonarius* utilizando la técnica de medios envenenados. En este trabajo, la mejor inhibición se obtuvo con la cepa 031 adicionando glicerol al medio de cultivo, las cepas en estudio fueron capaces de asimilar sorbitol y manitol, mientras que el xilitol y glicerol no fueron consumidos.

Introducción

La presencia de hongos productores 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].

En cuanto a las ocratoxinas, la A (OTA) es la de mayor toxicidad. La OTA se encuentra clasificada por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) como posible carcinógeno humano y está relacionada con problemas nefrotóxicos, teratogénicos e inmunotóxicos [3]. Los principales alimentos afectados son: nueces, café, cereales, uvas, entre otros [4].

El problema de contaminación debida a hongos se puede controlar utilizando métodos químicos y fisicoquímicos [5]. Sin embargo, el daño potencial al ambiente y salud humana ha promovido la aplicación de técnicas de control biológico como alternativa. Uno de estos métodos es el uso de microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS) y sus metabolitos [6], como las bacterias ácido lácticas (BAL).

Las BAL son microorganismos gram-positivos que producen ácido láctico como el principal producto del metabolismo y exhiben propiedades antimicrobianas, producen varios metabolitos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos durante el metabolismo primario (ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno) y secundario, incluidos diacetil, reuteriicina, ácido 3-fenilactico, ácido benzoico, metilhidantoína, ácido bencenoacético, éster 2-propenílico, mevalonolactona, 2,6 -difetil-piperidina, dicetopiperazinas y otros compuestos de bajo peso molecular [7].

La composición del medio de cultivo modula el metabolismo y la producción de compuestos antimicóticos en cultivos LAB [8] y se ha demostrado que la adición de polioles al caldo MRS promueve la producción de compuestos antimicrobianos [9].

El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento y actividad antifúngica de dos cepas de *Lactobacillus plantarum* modificando la fuente de carbono por distintos polioles.

Metodología

Cultivo de bacterias ácido lácticas y obtención del extracto libre de células (CFE)

La activación de las cepas BAL 31 (Costa de Marfil) y BAL 7 (México) se realizó a partir de conservados en glicerol inoculando 50 µL en 9 mL de medio MRS incubando 24 h a 30 °C. Se realizó una resiembra en medio MRS estéril incubando durante 24 h a 30 °C. Para evaluar el crecimiento de las BAL en los distintos polioles se preparó una segunda resiembra con medio MRS sustituyendo la fuente de carbono con 20 g/l de polioles (glicerol, manitol, sorbitol y xilitol). Se prepararon curvas de crecimiento midiendo unidades formadoras de colonias (UFC) por cuenta en placa y los resultados se correlacionaron con la densidad óptica a 600 nm. Los datos de crecimiento fueron ajustados al modelo de Gompertz utilizando el software OriginPro 2018. Se obtuvieron extractos libres de células (ELC) centrifugando los caldos de fermentación en tubos para centrífuga de 50 mL estériles a 7 000 rpm durante 15 min a 10 °C y filtrando a 0.45 µm.

*Activación y resiembra de *Aspergillus carbonarius* DO162*

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 30 mL de agar papa dextrosa (PDA) y fueron inoculados con 50 µL de suspensión de esporas de *Aspergillus carbonarius* DO162 proveniente de medio crioprotector e incubados durante 7 días a 30 °C. Se agregaron 20 mL de solución Tween 80 al 0.1% (v/v) estéril al matraz con cultivo de hongos de 7 días y se desprendieron las esporas con un agitador magnético estéril.

Se realizó la primera resiembra colocando 500 µL de la suspensión de esporas del periodo de activación en un matraz con 30 mL de medio PDA estéril y se incubó durante 7 días a 30 °C. De igual manera al paso anterior las esporas fueron desprendidas con Tween 80 al 0.1% (v/v) estéril. Se hizo recuento de esporas con cámara de Neubauer y se ajustó la suspensión para obtener una concentración de 1×10^6 esporas/mL.

Efecto antifúngico del extracto libre de células mediante la técnica de medios de cultivo envenenado.

Las pruebas de inhibición fueron realizadas por triplicado en cajas Petri (90 x 15 mm) empleando una mezcla de 30 mL (50:50 v/v) de ELC y PDA. En el centro de las cajas se realizaron pozos de 8 mm de diámetro, en donde se inocularon 100 µL de suspensión (1×10^6 esporas/mL) de *A. carbonarius* DO162. El diámetro del halo de crecimiento fúngico se midió cada 24 h durante 4 días.

El efecto antifúngico se estimó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{D_c - D_s}{D_c} * 100$$

Donde D_c y D_s son los diámetros de crecimiento en el control y las muestras, respectivamente. Los controles se prepararon como sigue: se inocularon cajas Petri con 15 mL de PDA y 15 mL de caldo MRS con 100 µL de *Aspergillus carbonarius* DO162 (1×10^6 esporas / mL).

Resultados

Las Figuras 1 y 2 muestran el ajuste lineal entre densidad óptica vs UFC/mL con un coeficiente de correlación superior al 99 %, estas curvas fueron utilizadas para construir las cinéticas de crecimiento con cada condición (polioles como fuente de carbono).

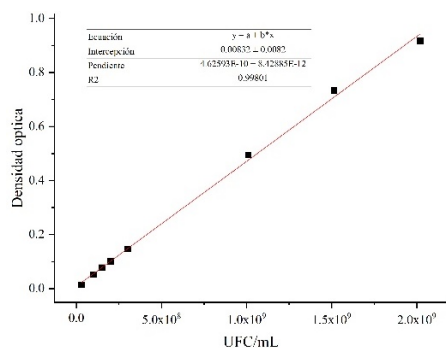


Figura 1.- Curva de calibración DO vs UFC/mL para la cepa BAL 7

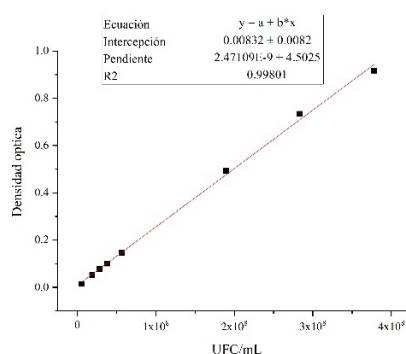


Figura 2 Curva de calibración DO vs UFC/mL para la cepa BAL 31)

La cepas de *L. plantarum* utilizadas en este trabajo mostraron una disminución en la tasa de crecimiento al reemplazar la glucosa como fuente de carbono por los polioles (Figura 3) en el caso de la cepa BAL 7 se obtuvieron valores de 0.22, 0.17, 0.15, 0.10, 0.07 h⁻¹ y para la cepa BAL 31 de 0.27, 0.13, 0.10, 0.07 y 0.09 h⁻¹ con glucosa, manitol, sorbitol, xilitol y glicerol respectivamente, dicha disminución en el crecimiento corresponde con los perfiles de consumo de la fuente de carbono (Figura 4) donde se observa un consumo cercano al 100 % con glucosa, seguido por el manitol y sorbitol, con xilitol del 20 % y con glicerol no hubo consumo.

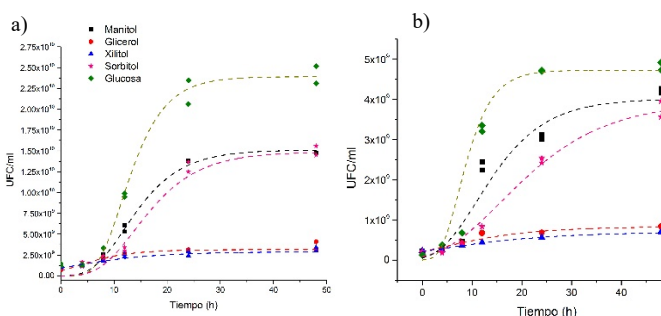


Figura 3. Cinéticas de crecimiento de *L. plantarum* utilizando como fuente de carbono diferentes polioles, a) cepa BAL 7 y b) cepa BAL 31

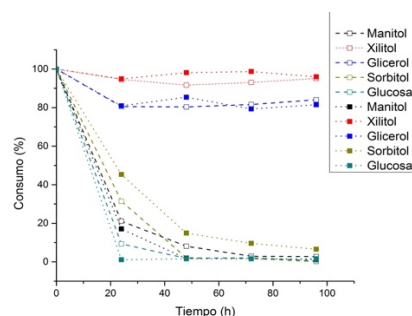


Figura 4. Consumo de la fuente de carbono por *L. plantarum*. Los cuadros llenos corresponden a la cepa BAL 31 y los vacíos a la cepa BAL 7

En cuanto a los resultados de inhibición cuando es utilizada glucosa como fuente de carbono los ELC en ambas cepas de BAL producen una inhibición del 40%. Cuando se adicionó xilitol y glicerol al medio de cultivo, para la cepa BAL 31 se obtuvo una inhibición del crecimiento radial cercana al 90%, y para la BAL 7 del 50%. Ambas bacterias son capaces de utilizar manitol y sorbitol como fuente de carbono, probablemente estos son asimilados a través de su conversión a fructosa-6P [10]. No obstante la actividad antifúngica de los ELC resulta disminuida obteniendo inhibiciones menores al 15 % (Figura 5).

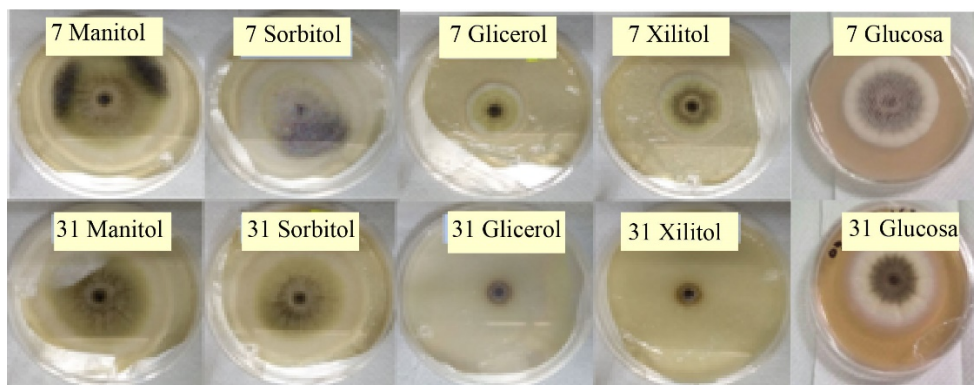


Figura 5. Inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius* después de 96 h de cultivo utilizando ELC de BAL 7 y BAL 31 con distintos polioles como fuente de carbono

Conclusión

Las dos cepas de *Lactobacillus plantarum* consumen manitol y sorbitol como fuente de carbono, mostrando un crecimiento menor al que se obtiene utilizando glucosa como fuente de carbono y un porcentaje de inhibición bajo (<15%). El xilitol fue consumido en un 20% mientras que el glicerol no fue asimilado, no obstante, se obtiene una mayor inhibición del ELC al utilizar xilitol y glicerol (90% para la BAL 31 y 50% para la BAL 7), posiblemente se deba a que los compuestos antifúngicos producidos se formen durante el metabolismo secundario de las bacterias.

Referencias

- [1] S. Marin, A. J. Ramos, G. Cano-Sancho, and V. Sanchis, "Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment," *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 60, pp. 218–237, 2013.
- [2] Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Lakhal Mirleau, F., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S., Ouzari, I., Boudabous, A., & Roussos, S., "Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*," *Anaerobe*, Vol. 17, No. 6, pp. 267–272, 2011.
- [3] J. H. Hope and B. E. Hope, "A review of the diagnosis and treatment of ochratoxin a inhalational exposure associated with human illness and kidney disease including focal segmental glomerulosclerosis," *Journal of Environmental and Public Health*, Vol. 2012, 2012.
- [4] M. Eskola, G. Kos, C. T. Elliott, J. Hajšlová, S. Mayar, and R. Krska, "Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%," *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, Vol. 0, No. 0, pp. 1–17, 2019.
- [5] H. Lee, J. J. Churey, and R. W. Worobo, "Purification and structural characterization of bacillomycin F produced by a bacterial honey isolate active against *Byssoschlamys fulva* H25," *Journal Applied Microbiology*, Vol. 105, No. 3, pp. 663–673, 2008.
- [6] Kumar, N., Singh, N., Jaryal, R., Bhandari, C., Singh, J., Thakur, P., & Duhan, A., "Purification, characterization and antibacterial spectrum of a compound produced by *Bacillus cereus* MTCC 10072," *Archives of Microbiology*, Vol. 201, No. 9, pp. 1195–1205, 2019.
- [7] M. K. Kwak, R. Liu, J. O. Kwon, M. K. Kim, A. H. J. Kim, and S. O. Kang, "Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit proliferation of the influenza a virus," *Journal of Microbiology*, Vol. 51, No. 6, pp. 836–843, 2013.
- [8] D. K. D. Dalié, A. M. Deschamps, and F. Richard-Forget, "Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review," *Food Control*, Vol. 21, No. 4, pp. 370–380, 2010.
- [9] L. Lipińska *et al.*, "Antifungal Activity of *Lactobacillus pentosus* LOCK 0979 in the Presence of Polyols and Galactosyl-Polyols," *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, Vol. 10, No. 2, pp. 186–200, 2018.
- [10] L. Nissen, G. Pérez-Martínez, and M. J. Yebra, "Sorbitol synthesis by an engineered *Lactobacillus casei* strain expressing a sorbitol-6-phosphate dehydrogenase gene within the lactose operon," *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 249, No. 1, pp. 177–183, 2005.

AMIDIO

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

AVANCES EN INGENIERÍA QUÍMICA

Vol. 1, No. 2



XLI
Encuentro
Nacional

La Ingeniería Química, el Desarrollo Nacional
y la Responsabilidad Social

Memorias del XLI Encuentro Nacional del AMIDIO

Evento virtual del 22 al 24 de octubre 2020

AVANCES EN INGENIERÍA QUÍMICA

Vol. 1, No. 2

Memorias del XLI Encuentro Nacional de la AMIDIQ

“La Ingeniería Química, el Desarrollo Nacional
y la Responsabilidad Social”

La presentación y disposición en conjunto de:

“La Ingeniería Química, el Desarrollo Nacional y la Responsabilidad Social”

Son propiedad de sus autores.

Coordinador: María del Rosario Enríquez Rosado

Compilador: Jorge Ramón Robledo Ortiz

Compilador: Nelly Ramírez Corona

Compilador: Adrián Bonilla Petriciolet

Compilador: Fernando Israel Gómez Castro

Compilador: Sara Núñez Correa

D.R. © 2020. Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ)

ISSN: en trámite

Impreso y hecho en México

Printed and made in Mexico