



Purificación de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus curvatus* CRL705 para su uso en envases de productos cárnicos

Blanco Massani, M.⁽ⁱ⁾; Epifane, M.E.⁽ⁱ⁾

⁽ⁱ⁾INTI-Plásticos - CERELA-CONICET

⁽ⁱⁱ⁾INTI-Carnes

Introducción

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas producidas por numerosas especies de bacterias lácticas con capacidad inhibitoria frente a microorganismos contaminantes y patógenos de alimentos incluyendo *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Brochothrix thermosphacta*. y *Listeria monocytogenes*. Estos metabolitos naturales usados como una barrera adicional en la biopreservación de productos cárnicos podrían reemplazar la adición de antimicrobianos como los ácidos orgánicos y sus sales.

Las bacteriocinas son péptidos catiónicos, hidrofóbicos y difieren ampliamente en características tales como peso molecular, presencia de ciertos amino ácidos (aa), punto isoelectrico (pI) y modificaciones post-traslacionales de algunos aa.

Esta heterogeneidad dentro de las bacteriocinas justifica los diferentes procesos desarrollados para su purificación, los que incluyen la precipitación de proteínas mediante sales seguido de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y HPLC entre otros.

En este trabajo se diseñaron estrategias con el fin de purificar dos bacteriocinas catiónicas producidas por *Lactobacillus curvatus* CRL705, lactocina 705 y lactocina AL705, activas frente a *Lactobacillus plantarum* CRL691 y *Listeria innocua* 7, respectivamente.

La precipitación con sulfato de amonio fue la etapa inicial y luego se realizó:

- 1) extracción orgánica con isopropanol,
- 2) cromatografía en fase sólida usando columnas C18 y elución con soluciones de isopropanol y acetato de amonio 200mM.

Por otro lado las bacteriocinas parcialmente purificadas se incorporaron mediante inmersión (soaking) en filmes destinados al envasado de salchichas a fin de obtener filmes activos antimicrobianos.

Metodología / Descripción Experimental

Microorganismos y condiciones de cultivo.

L. curvatus CRL705, productor de lactocina 705 y lactocina AL705 y *L. plantarum* CRL691 usado como indicador de lactocina 705, fueron aislados de embutidos artesanales Argentinos ^[4] *L. curvatus* CRL1579, obtenido a partir de *L. curvatus* CRL705 es productor de lactocina AL705 (compuesto antilisteria). Las cepas de BI fueron cultivadas en MRS a 30°C. *Listeria innocua* 7, indicador de lactocina AL705 (cedida por La Unité de Recherches Laitières et Génétique Appliquée, Francia) fue cultivada en caldo TSB + extracto de levadura al 0.5% a 30°C.

Obtención de bacteriocinas.

El cultivo libre de células de *L. curvatus* CRL705 se precipitó con sulfato de amonio (44%) como etapa inicial en todas las estrategias ensayadas. (1) *Extracción con isopropanol*: luego de la saturación con NaCl; se realizaron tres extracciones con isopropanol (1/4 del volumen inicial de la solución) ^[2]. (2) *Cromatografía en fase sólida*: se usó una columna C18^[1] y como eluyentes 4 volúmenes de acetato de amonio (200mM) + isopropanol al 10, 30, 40, 50 y 100%.

Los residuos de isopropanol fueron descartados en frascos de vidrio y almacenados en sala de residuos peligrosos hasta su posterior recolección.

Cuantificación de la actividad antimicrobiana y dosaje de proteínas.

La actividad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en agar^[3] usando como organismos sensibles *L. plantarum* CRL 691 y *L. innocua*.7 La concentración proteica se estableció mediante el método de Bradford.

Obtención de filmes activos antimicrobianos.

Filmes multicapa de cara interna de polietileno se sumergieron durante 1 hora en las soluciones de bacteriocinas parcialmente purificadas. Luego de la incorporación, se lavaron con agua destilada estéril, se secaron a 50°C durante 10 minutos y se ensayaron frente a los microorganismos sensibles. Se realizaron controles negativos sumergiendo los filmes en isopropanol durante 1 hora.

Resultados

Purificación de las bacteriocinas

Si comparamos el porcentaje de proteínas eliminado respecto a la solución inicial para las distintas estrategias de purificación, se observa que por el método (2) se alcanza mayor pureza. (ver Fig 1)

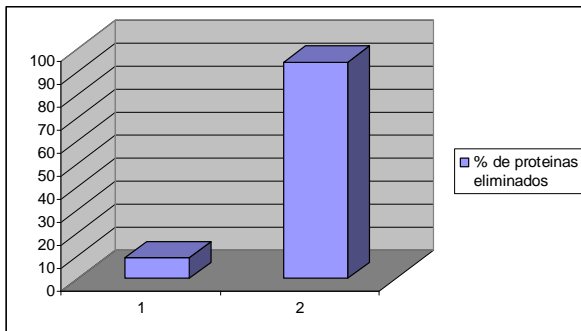


Fig. 1: Porcentaje de proteínas eliminadas respecto a la solución inicial. (1) Extracción con isopropanol. (2) Extracción en fase sólida

AL comparar las actividades relativas de las bacteriocinas parcialmente purificadas, se observa que en la extracción con isopropanol se obtiene una mayor actividad inhibitoria respecto a la extracción en fase sólida (ver Fig 2).

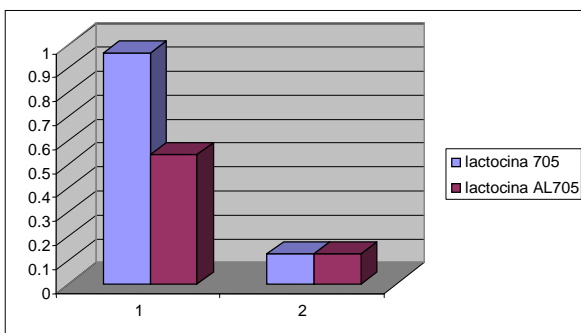


Fig. 2: Actividad relativa (fracción purificada/fracción inicial) de las fracciones obtenidas mediante las distintas

estrategias de purificación. (1) Extracción con isopropanol, (2) Extracción en fase sólida.

Obtención de filmes activos antimicrobianos

Luego de sumergir un filme de cara interna de polietileno en la solución obtenida por (1) y lavarlo con agua, este presenta actividad antimicrobiana frente a *L.innocua*7 (ver Fig 3) y *L.plantarum* CRL691(ver Fig 4). No ocurre lo mismo para la solución activa obtenida por el método (2). Los controles negativos no presentaron actividad.

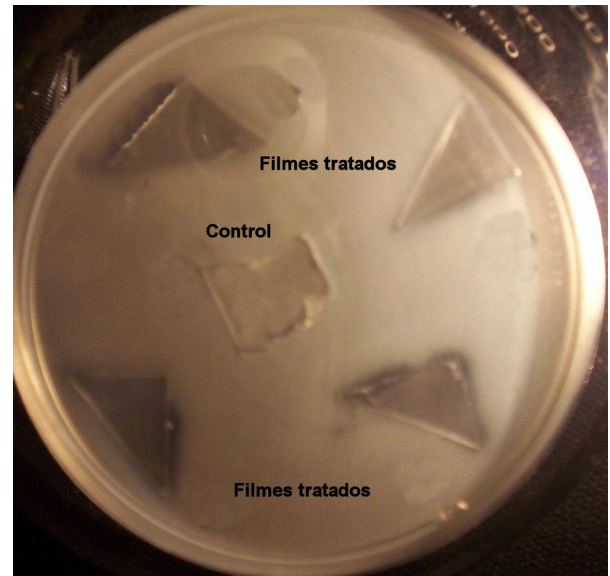


Fig. 3: Filmes tratados con la solución de bacteriocinas parcialmente purificada obtenida por extracción con isopropanol ensayados frente a *L.innocua*7.

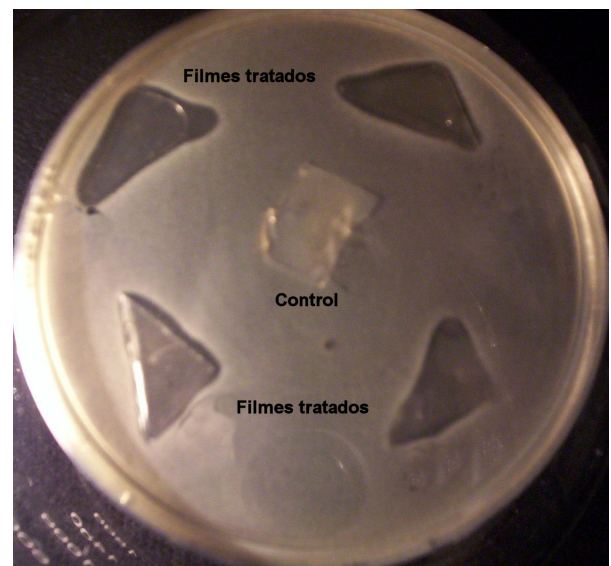


Fig. 4: Filmes tratados con la solución de bacteriocinas parcialmente purificada obtenida por extracción con isopropanol ensayados frente a *L.plantarum* CRL691.

Conclusiones

Las sucesivas diluciones que se producen cuando se realiza extracción en fase sólida como método de purificación son las responsables de la disminución de la actividad antimicrobiana en el mismo, debido a la cual no se puede obtener un filme antimicrobiano por inmersión. En el caso de la extracción con isopropanol, además de la mayor actividad antimicrobiana obtenida, este método es simple y fácil de llevar a cabo, por ello fue elegido para la purificación parcial de las bacteriocinas. Si bien el isopropanol resulta nocivo en caso de ingestión o inhalación; en el proceso de desarrollo del filme antimicrobiano existe una etapa de lavado con agua y un posterior secado, con lo que se aseguraría la eliminación casi total del mismo. No obstante, este compuesto se encuentra en la lista positiva de aditivos para materiales plásticos destinados a la elaboración de envases en contacto con alimentos sin límite de restricción. ^[5]

La posibilidad de obtener envases con actividad antimicrobiana a partir de filmes para productos cárnicos permitiría evitar el deterioro del alimento debido a contaminaciones post-proceso.

Referencias

1. Berjeaud Jean-Marc and Cenatiempo Yves. *Purification of Antilisterial Bacteriocins. Methods in Molecular Biology*, vol. 268: *Public Health Microbiology: Methods and Protocols*.
2. Burianek, L.L.and, Yousef, A.E. (2000) *Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. Letters in Applied Microbiology*. **31**, 193-197
3. Nielsen, J.W., Dickson, J.S., and Crouse, J.D. *Use of a Bacteriocin Produced by Pediococcus acidilactici To Inhibit Listeria monocytogenes Associated with Fresh Meat. Applied and Environmental Microbiology*. **56**,7. 2142-2145
4. Vignolo, G., Suriani F., R. Holgado, A y Oliver, G. (1993) *Antibacterial activity of Lactobacillus strains isolated from dry fermented sausages. J. Appl. Bacteriol.* . **75**, 344-349.
5. Resolución MERCOSUR Nº 50/01. LISTA POSITIVA DE ADITIVOS PARA MATERIALES PLÁSTICOS DESTINADOS A LA ELABORACIÓN DE ENVASES Y EQUIPAMIENTOS EN CONTACTO CON ALIMENTOS (MODIFICACIÓN DE LA RES. GMC Nº 95/94).