

Efecto de la nisina (PBCs) a una temperatura de subpasteurización/pH ácido sobre *Listeria monocytogenes*

Angeles-Vega, L.S.¹, Dublán-García, O.² y Minor-Pérez, H.¹

¹División de ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Av. Tecnológico s/n Esq. Av. Carlos Hank González (Av. Central), Col. Valle de Anáhuac, C. P. 55210, Ecatepec de Morelos, Estado de México, México. Correo: hminor@tese.edu.mx ²Laboratorio de Biotecnología Alimentaria, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n, Col. Residencial Colón, 50120, Toluca, Estado de México, México

Palabras Clave: Nisina, tratamientos térmicos, *Listeria monocytogenes*, temperatura de subpasteurización (TSP)

Introducción

El empleo de las altas temperaturas para el procesado o conservación de alimentos ha tenido una gran importancia en la evolución de la alimentación en los seres humanos. Los tratamientos térmicos actualmente utilizan la combinación de variables como temperatura y el tiempo para mejorar procesos de conservación como la pasteurización y la esterilización. La pasteurización de alimentos como la leche se realiza con la combinación de baja temperatura/tiempo largo (LTLT, 63°C/30 min) o alta temperatura/tiempo corto (HTST, 72°C/15s) [1]. Sin embargo, puede emplearse temperaturas de subpasteurización (TSP) en combinación con conservadores naturales, como la nisina que tienen termorresistencia. Estas temperaturas (TSP, 55°C) pueden contribuir a reducir algunos efectos indeseables en las propiedades nutricionales o sensoriales de los alimentos. Las bacteriocinas, como la nisina tienen una estructura molecular peptídica y muchas tienen capacidad/actividad antimicrobiana. Las clasificadas en el grupo IIa presentan la característica de tolerancia al calor [2]. La mayoría de las bacteriocinas termorresistentes toleran tratamientos superiores a los 60°C a diferentes tiempos de calentamiento [3]. Además, muchas bacteriocinas tienen resistencia a condiciones de elevada acidez [3]. En este estudio se evaluó *in vitro* el control significativo de *Listeria monocytogenes* Scott A con nisina (NIs) a PBCs (Concentración Parcial Bactericida), en condiciones de temperatura de subpasteurización (55°C) y condiciones de pH extremo (3.0).

Metodología

***Preparación de la nisina (Nis).** La muestra de nisina (Sigma. Aldrich), con una concentración inicial de 106 UI/g se diluyó en agua destilada estéril y se ajustó el pH a 2.0, para mejorar su solubilidad. Se utilizó una solución diluida de HCl con una concentración de 0.02 N y 0.75% de NaCl [4].

****Listeria monocytogenes* NCTC 11994 y condiciones de crecimiento.** *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 pertenece a la colección microbiana de la Universidad de Murcia, España. Se preparó un cultivo de estudio a una temperatura de incubación de 37°C. El cultivo tuvo se estandarizó a una concentración inicial entre 9 ciclos logarítmicos en caldo TSB. Este cultivo se diluyó en agua estéril obtener inicialmente entre 7-8 ciclos logarítmicos en las muestras de estudios.

***Análisis microbiológico.** Los cultivos de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 y *Listeria monocytogenes* Scott A se diluyeron en agua peptonada y se vaciaron en volúmenes de 100 µL en tubos Eppendorf con 900 µL de una solución amortiguadora de citrato-fosfato a los diferentes valores de pH 3.0. Previamente se adicionó en cada tratamiento la nisina para obtener las CPB's de estudio (0 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, 600 mg/L y 1000 mg/L). Todos los tratamientos se mantuvieron en agitación a 350 rpm en un Vórtex (Labnet, EUA) durante 1 min. Los tratamientos se almacenaron en condiciones de calentamiento de 55°C en un baño de temperatura controlada (Polystat Temperature Controller, Cole-Parmer, USA). Las cuentas microbianas se realizaron a los tiempos de 0 min, 7.5

min, 15 min, 22.5 min y 30 min con la técnica de la gota [6]), Los tratamientos se realizaron por duplicado en medio TSAYE (Tryptic Soy Broth, Milán, Italia). Las cuentas microbianas se realizaron después de una incubación a 37°C por 24 h.

**Análisis estadístico.* Los resultados se sometieron a un ANOVA y a una prueba de Duncan, utilizando el paquete estadístico SAS System, Windows™ Versión 6.12, USA. Además de una prueba de Bonferroni obtenida del paquete GraphPad PRISM, Versión 5.00, 2017 San Diego, California. USA.

Resultados y discusión

La Figura 1 muestra el efecto de la Nis a diferentes concentraciones sobre *Listeria monocytogenes*, A la TSP de estudio (55°C) se observó una reducción significativa a un tiempo de 7.5 min con 1000 mg/L de nisina con respecto a la población bacteriana inicial (6 ciclos logarítmicos), Un comportamiento similar se observa con las concentraciones de 200 mg/L, 400 mg/L y 600 mg/L en un intervalo de tiempo de 22.5 - 30 min. En las Tablas 1, 2 y 3 se muestra que el modelo lineal propuesto tuvo un efecto significativo ($P < 0.0001$) sobre la variable respuesta (Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* Scott A). Los modelos describen la influencia de los factores investigados en forma independiente: tiempo (T) y la concentración de nisina (PBCs), así como el efecto de las interacciones (T*Nis). Se observó un efecto significativo del tiempo (T), concentración de nisina (N) y la interacción T*N en los tratamientos evaluados (Tabla 2). El coeficiente de determinación para el modelo lineal de estudio en las condiciones experimentales evaluadas indica que el 5.1379% de la variación total en la respuesta no puede ser explicado por el modelo desarrollado. Los valores F_0 para los parámetros de cada modelo fueron útiles para explicar el grado de significancia de los efectos de las variables independientes y sus interacciones (Tabla 2). A la temperatura de 55°C el parámetro que tuvo un mayor efecto significativo fue el tiempo. El segundo parámetro más significativo fue la nisina. Esto significa que los cambios de concentración de nisina a la temperatura de 55°C tienen un efecto significativo de inhibición sobre *Listeria monocytogenes* Scott A. Este comportamiento puede ser explicado debido a que conforme la cepa control es expuesta durante mayor tiempo a la temperatura de 55°C posiblemente tenga daño de estructuras celulares como su membrana, lo cual provoca inactivación. Además, posiblemente las células de estudio en estas condiciones de pH ácido extremo sean más sensibles a la nisina [3]. Las pruebas de Duncan y Bonferroni (Tablas 3 y 4) que la menor población de *Listeria monocytogenes* Scott A se obtuvo a 1000 mg/L hasta un valor de 1.11 ciclos logarítmicos. La variable tiempo tuvo el mayor efecto de reducción de la población a un tiempo de 30 min hasta 0.45 ciclos logarítmicos. La prueba de Bonferroni mostró la mayor diferencia significativa al comparar los tratamientos de 0 mg/L vs 1000 mg/L a los tiempos de 7.5 min, 15 min y 30 min. En las condiciones experimentales evaluadas se encontró un efecto significativo de los parámetros de estudio sobre la inhibición significativa de *Listeria monocytogenes*.

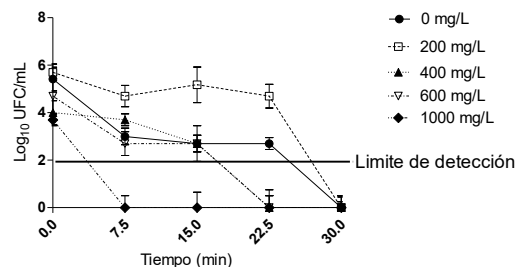


Figura 1. Efecto de la combinación de pH (e) 3.0, (f) 5.0, (g) 7.0, (h) 9.0 y la concentración de nisina sobre *Listeria monocytogenes* Scott A.

Tabla 1. ANOVA para el efecto de las variables fijas: concentración de nisina (0 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L y 600 mg/L) y el tiempo (0 min, 7.5 min, 15 min, 22.5 min y 30 min) sobre la variable respuesta: Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* Scott A a un pH 3.0 y la temperatura de 55°C.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Pr > f
Modelo	24	191.91979152	7.99665798	185.10	0.0001
Error	25	10.39475800	0.41579032		
Total	49	202.31454952			

R-Square= 0.948621

*Los valores de "Prob > F" menores que 0.050 indican que los parámetros evaluados son significativos

Tabla 2. ANOVA para el efecto del tiempo (0 min, 7.5 min, 15 min, 22.5 min y 30 min) y la concentración de nisina (0 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L y 600 mg/L) sobre el Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* Scott A a un pH 3.0 y la temperatura de 55°C.

Fuente de variación	Valor de F	Pr > F
A-Tiempo	64.14	0.0001
B-Nisina	34.53	0.0001
A*B	4.18	0.0007

*Los valores de "Prob > F" menores que 0.050 indican que los parámetros evaluados son significativos

Tabla 3. Prueba de Duncan para la comparación del efecto de la concentración de nisina (0 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L y 600 mg/L) y el tiempo (0 min, 7.5 min, 15 min, 22.5 min y 30 min) sobre el Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* Scott A a un pH 3.0 y la temperatura de 55°C.

Tiempo (min)	Tiempo	Prueba de Duncan*	Nisina (mg/L)	Nisina	Prueba de Duncan*
	Promedio (Log UFC/mL)			Promedio (Log UFC/mL)	
0	4.9808	A	200	4.4070	A
7.5	3.0694	B	0	3.1360	B
15	2.8470	B	400	2.5196	C
22.5	2.2046	C	600	2.3694	C
30	0.4500	D	1000	1.1198	D

*Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes con una $\alpha=0.0$

Tabla 4. Prueba de Bonferroni para la comparación del efecto de la concentración de nisina sobre, *Listeria monocytogenes* Scott A. Variables fijas: (0 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L, 600 mg/L y 1000 mg/L de Nis) y variable respuesta: Log UFC/mL a una temperatura de subpasteurización (TSP) de 55°C y pH ácido.

Variables fijas	Tratamientos a comparar con la prueba de Bonferroni	Tiempo (min)	Variable de respuesta (Log UFC/mL)		Diferencia	Intervalos de Confianza 95%	t	P	Resumen	
pH 3.0	0 mg/L vs 200 mg/L		0 mg/L	200 mg/L						
		0	5.832	5.974	0.1420	-1.907 a 2.191	0.2582	P > 0.05	ns	
		7.5	2.750	4.974	2.224	0.1753 a 4.273	4.044	P < 0.01	**	
		15	2.849	5.413	2.564	0.5153 a 4.613	4.662	P < 0.001	***	
		22.5	2.924	5.099	2.175	0.1263 a 4.224	3.955	P < 0.01	**	
		30	0.2500	0.2500	0.0000	-2.049 a 2.049	0.0000	P > 0.05	ns	
	0 mg/L vs 400 mg/L		0 mg/L	400 mg/L						
		0	5.832	4.325	-1.507	-3.556 a 0.5417	2.740	P > 0.05	ns	
		7.5	2.750	3.974	1.224	-0.8247 a 3.273	2.226	P > 0.05	ns	
		15	2.849	2.974	0.1250	-1.924 a 2.174	0.2273	P > 0.05	ns	
		22.5	2.924	0.2500	-2.674	-4.723 a -0.6253	4.862	P < 0.001	***	
		30	0.2500	0.1750	-0.0750	-2.124 a 1.974	0.1364	P > 0.05	ns	
	0 mg/L vs 600 mg/L		0 mg/L	600 mg/L						
		0	5.832	6.099	0.2670	-1.782 a 2.316	0.4855	P > 0.05	ns	
		7.5	2.750	3.174	0.4240	-1.625 a 2.473	0.7710	P > 0.05	ns	
		15	2.849	2.974	0.1250	-1.924 a 2.174	0.2273	P > 0.05	ns	
		22.5	2.924	0.2500	-2.674	-4.723 a -0.6253	4.862	P < 0.001	***	
		30	0.2500	0.1750	-0.0750	-2.124 a 1.974	0.1364	P > 0.05	ns	
	0 mg/L vs 1000 mg/L		0 mg/L	1000 mg/L						
		0	5.832	3.924	-1.908	-3.957 a 0.1407	3.469	P < 0.01	**	
		7.5	2.750	0.2500	-2.500	-4.549 a -0.4513	4.546	P < 0.001	***	
		15	2.849	0.3250	-2.524	-4.573 a -0.4753	4.589	P < 0.001	***	
		22.5	2.924	0.1750	-2.749	-4.798 a -0.7003	4.999	P < 0.001	***	
		30	0.2500	0.1250	-0.1250	-2.174 a 1.924	0.2273	P > 0.05	ns	
200 mg/L vs 400 mg/L		200 mg/L	400 mg/L							
	0	5.974	4.325	-1.649	-3.698 a 0.3997	2.998	P < 0.05	*		
	7.5	4.974	3.974	-1.000	-3.049 a 1.049	1.818	P > 0.05	ns		
	15	5.413	2.974	-2.439	-4.488 a -0.3903	4.435	P < 0.001	***		
	22.5	5.099	0.2500	-4.849	-6.898 a -2.800	8.817	P < 0.001	***		
	30	0.2500	0.1750	-0.0750	-2.124 a 1.974	0.1364	P > 0.05	ns		
200 mg/L vs 600 mg/L		200 mg/L	600 mg/L							
	0	5.974	6.099	0.1250	-1.924 a 2.174	0.2273	P > 0.05	ns		
	7.5	4.974	3.174	-1.800	-3.849 a 0.2487	3.273	P < 0.05	*		
	15	5.413	2.974	-2.439	-4.488 a -0.3903	4.435	P < 0.001	***		
	22.5	5.099	0.2500	-4.849	-6.898 a -2.800	8.817	P < 0.001	***		
	30	0.2500	0.1750	-0.0750	-2.124 a 1.974	0.1364	P > 0.05	ns		

ns: no significativo; *Significativo; ***Altamente significativo

Conclusiones

En las condiciones experimentales evaluadas se encontró un efecto significativo sobre el control de *Listeria monocytogenes* Scott A. Se observó en las condiciones de pH 3.0 y temperatura de subpasteurización de 55°C actividad antimicrobiana significativa de la nisina sobre *Listeria monocytogenes* Scott A. La mayor reducción significativa de las poblaciones de la bacteria control fue a una concentración de 1000 mg/L a los tiempos de 7.5 min, 15 min y 30 min de acuerdo con el análisis de ANOVA y las pruebas de Duncan y Bonferroni.

Bibliografía

- [6] ICMSF. 1996. Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos. Editorial Acribia, Zaragoza (España), pp 165-174
- [2] Klaenahmmer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review* 12:39-85
- [1] Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2008). Modern food microbiology. Springer Science & Business Media.
- [3] Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. & Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71:1-2
- [4] Gallo, L. I., Pílosos, A. M. R., & Jagus, R. J. (2007). Effective control of *Listeria innocua* by combination of nisin, pH and low temperature in liquid cheese whey. *Food control*, 18(9), 1086-1092. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.07.009>
- [6] Miles, AA; Misra, SS, Irwin, JO (1938 Nov). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of hygiene*, 38 (6): 732–49.