

# APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LA NISINA EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

1Nayeli Yolanda Martínez-Soto, 2Fidel Landeros-Jaime, 3Edgardo Ulises Esquivel-Naranjo, 4José Antonio Cervantes-Chávez

1Egresada Universidad Tecnológica de Corregidora. Ingeniería en Biotecnología. nayee0919@gmail.com. 2Unidad de Microbiología Básica y Aplicada. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro, landeros@uaq.mx. 3Unidad de Microbiología Básica y Aplicada. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro, ulises.esquivel@uaq.mx. 4Unidad de Microbiología Básica y Aplicada. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro, jose.antonio.cervantes@uaq.mx

## RESUMEN

Las bacterias, son microorganismos capaces de producir metabolitos primarios y secundarios considerados de interés biotecnológico debido a la utilidad de su aplicación en ciertas áreas como la farmacología, la industria de alimentos, agricultura, entre otras. *Lactococcus lactis*, es una bacteria ácido láctica productora de un metabolito denominado nisina; el cual al unirse con el lípido II de la membrana de las bacterias Gram+ ha demostrado tener propiedades inhibitorias del crecimiento bacteriano, característica por la cual ha sido ampliamente estudiada y utilizada como un conservador natural en la industria alimentaria, lo cual ha permitido considerar la implementación de los metabolitos de las bacterias lácticas como una alternativa viable en la bioconservación de los alimentos.

Palabras clave: metabolitos secundarios, bacterias ácido lácticas, nisina, conservador de alimentos.

## ABSTRACT

Bacterium, are microorganisms able to produce primary and secondary metabolites with biotechnological potential due to its application in several areas such as pharmacology, food industry and agriculture to mention some. *Lactococcus lactis*, is a lactic acid bacterium producing nisin; this metabolite shows affinity to lipid II of Gram+ membranes, which has been demonstrated to inhibit bacterial growth, due to this characteristic this bacterium has been deeply studied and used as a natural food preservative, then it is possible to consider the implementation of metabolites of lactic acid bacteria as a feasible alternative in the biopreservation of food.

Key words: metabolites, lactic acid bacteria, nisin, lipid II.

## 1. INTRODUCCIÓN

El mundo de las bacterias es muy extenso y cada día surgen nuevos descubrimientos. Aprendemos de ellas al estudiar sus complejos mecanismos intracelulares que pueden ser aplicados a diferentes procesos industriales que impactan en el desarrollo de productos utilizados en la alimentación, la farmacología, etc. Para la humanidad es importante garantizar la inocuidad de los alimentos, como sabemos, ésta se define como la seguridad de que un alimento no causará daño alguno al consumidor, la cual abarca desde la producción, recolección, transformación, empaquetado/ envasado, transporte, distribución o consumo. Para lograrlo se deben minimizar los riesgos de contaminación por agentes químicos, físicos o biológicos, estos últimos apoyándonos de opciones como los bioconservadores.

Actualmente con ayuda de la tecnología es posible continuar con la investigación de los metabolitos producidos durante las fases de crecimiento de los microorganismos y buscar su aprovechamiento para el beneficio de la humanidad en

las diversas áreas de estudio. Las bacterias y los diferentes microorganismos benéficos han contribuido desde tiempos antiguos en la elaboración de alimentos y estamos tan acostumbrados a su uso, que, sin ellas sería complicado producir algunos productos que consumimos de manera cotidiana como son: quesos, pan, cerveza, vino, entre otros. Lo anterior denota que para lograr muchos de ellos, es necesario el uso de cierto tipo de bacterias que nos permitan lograr procesos como la fermentación, maduración, acidificación, conservación, entre otros más. (Parra, 2010).

Respecto a este último existen varios estudios donde se ha demostrado que los metabolitos secundarios producidos por las bacterias ácido lácticas poseen actividad antimicrobiana, lo cual la convierte en una solución natural y con amplia posibilidad para sustituir el uso de conservadores químicos como: nitritos, benzoatos; de los cuales en últimas fechas se ha reportado que afectan a la salud de los consumidores, debido a su acumulación. Como ejemplo comentamos el caso de los nitritos, los cuales se combinan con la hemoglobina presente en los glóbulos rojos, formando así la metahemoglobina, la cual es una forma alterna de la hemoglobina con muy baja capacidad de transportar oxígeno). Es por ello que, en la actualidad, los altos niveles de nitrato y nitrito en los productos alimentarios se han convertido en uno de los principales problemas de salud pública (Ziarati et al. 2018).

Bajo este tenor se han descubierto que algunos de los metabolitos secundarios producidos por las bacterias ácido lácticas pueden ser una opción segura y natural para sustituir a los conservadores químicos como el benzoato de sodio (E211) que se usan en la industria y que está asociado con la aparición de tumores a largo plazo en los consumidores, debido a su acumulación en el organismo. Por ello, se sugiere el uso de la nisina como alternativa natural ya que, este compuesto inhibe el crecimiento de bacterias patógenas en los alimentos tales como la *Listeria monocytogenes*. Además de tener la capacidad de actuar en diferente rango de pH, aumentando así la vida de anaquel en los productos alimenticios (Mondragón et al. 2013).

## 2. HISTORIA:

A principios del siglo XIX (1928) se descubrió una bacteria con la capacidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias en alimentos, principalmente lácteos. Esto ocurrió en una fábrica de elaboración de quesos, en donde un lote de leche se contaminó, sin embargo, éste no se desechó y se sometió a una serie de análisis, descubriendo que la contaminación se debió a la presencia de la bacteria *Lactococcus lactis*, la cual produjo una sustancia que inhibió el crecimiento/actividad de los cultivos iniciadores del proceso de fermentación.

A partir de este momento, se investigó el potencial de *L. lactis* en la rama de la medicina, se analizó su uso como antibiótico. Dichas investigaciones demostraron que no era viable para su desarrollo en esta área, debido a que se demostró que su capacidad de reducir el crecimiento bacteriano de otras bacterias era de espectro reducido, concluyendo con esto las investigaciones de la bacteria y su metabolito.

Fue hasta el año 1950 que se estudió la factibilidad de la bacteria y sus metabolitos para ser utilizados en la conservación de alimentos, a esta molécula la nombraron nisina, que deriva de la sustancia inhibidora del grupo N de los *Streptococcus*, la cual es responsable de las propiedades benéficas encontradas (Williams y Broughton 2003).

### 3. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y BACTERIOCINAS:

Las bacterias ácido lácticas (“BAL”) son microorganismos usados principalmente para los procesos de fermentación de productos lácteos, son consideradas el factor principal de proteólisis y formación de compuestos esenciales durante el proceso de maduración en la elaboración de quesos, los cuales confieren el sabor y la textura de los mismos. Actualmente las BAL son catalogadas por la Agencia de Medicamentos y Alimentación (FDA por sus siglas en inglés) como organismos GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros, por sus siglas en inglés) y además son reconocidas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés) como bacterias Presuntamente Calificadas de Calidad (QPS por sus siglas en inglés) (Ai-Lian et al. 2017).

Mientras que las bacteriocinas son moléculas formadas por péptidos o polipéptidos que poseen actividad antimicrobiana y que son producidas por el metabolismo primario y secundario de bacterias lácticas durante la fase exponencial de crecimiento o al final de ella, estas moléculas también son conocidas como bioconservantes, estas bacteriocinas son resistentes a altas temperaturas (100-121°C), al ser de naturaleza proteica son hidrolizadas por proteasas, motivo por el cual pueden ser añadidas en los productos alimenticios para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas. Es por ello que se consideran alternativas naturales para aumentar la calidad y la inocuidad de los alimentos. Actualmente la nisina es la única bacteriocina usada en la industria alimentaria como bioconservante (Camargo et al. 2009; Cano et al. 2015).

### 4. NISINA Y LANTIBIÓTICOS:

Los antibióticos son péptidos ribosomales modificados postraduccionalmente que están constituidos por compuestos antimicrobianos como la lantionina y residuos

de β-metil-lantionina en forma de anillos. La nisina es uno de los antibióticos más estudiados. Su precursor, la prenisina contiene 57 aminoácidos, de los cuales 23 corresponden al péptido líder y 34 al péptido central (figura 1). El péptido líder es de gran importancia para que la prenisina no modificada sea reconocida por las enzimas intracelulares; para realizar su síntesis donde participan varias enzimas (diagrama 1).



Diagrama 1. Proceso de biosíntesis de la nisina (Modificado de Caulier et al 2019; Montalban y Kuipers 2018; Kruijff et al, 2008).

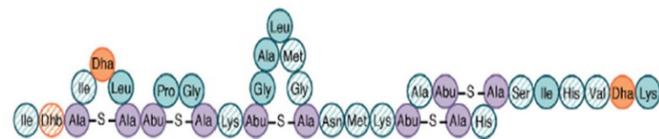


Figura 1. Estructura primaria de la nisina. Los residuos característicos de lantionina (Ala-S-Ala; Alanina-S-Alanina) y β metilantionina (Abu-S-Ala; Aminobutirato-S-Alanina) que forman los anillos de lantionina se muestran en color naranja; los aminoácidos deshidratados en color morado; el resto de los aminoácidos que componen la nisina se muestran en color azul (Modificado de Caulier et al., 2019).

### 4.1 Mecanismo de acción de la nisina:

Los anillos de lantionina tienen afinidad por el lípido II presente en la membrana celular de bacterias Gram+; el cual participa en la síntesis de peptidoglucano y modera la inserción de Mg<sup>++</sup> en la membrana celular. Con esta unión se logra la inhibición de la síntesis de peptidoglucano, al mismo tiempo que la molécula de nisina utiliza la unión con el lípido II para insertarse en la membrana citoplasmática, originando la permeabilización de la pared celular.

Esto se refleja en la formación de poros, liberando moléculas de gran importancia para la función celular, como son los iones de K<sup>+</sup> y moléculas de energía necesarias para la célula (ATP), al mismo tiempo que permite la entrada descontrolada de iones de magnesio, entre otros. De esta manera se altera la fuerza protón motriz y la despolarización del potencial de membrana, el cual es esencial para mantener la homeostasis celular, así como el equilibrio iónico intracelular y de forma importante el transporte de nutrientes y desechos celulares derivados del metabolismo, resultando así en la muerte celular (figura 2). Estos poros son temporales, se abren en presencia de potencial de membrana y se cierran al disiparse (Narvaus y Axelsson 2003; Montalban y Kuipers 2018).

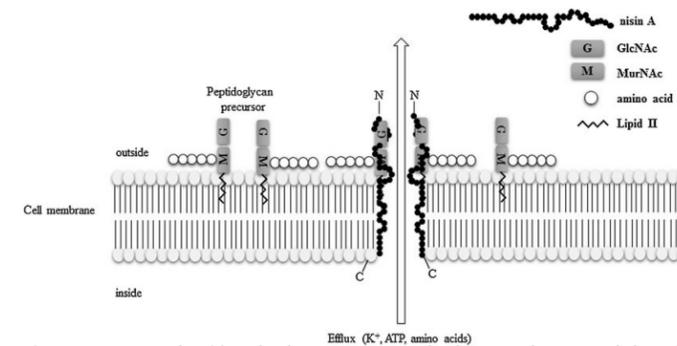


Figura 2. Perturbación de la estructura de la membrana celular de bacterias Gram- debido a la inserción de nisina que interactúa con el lípido II, origina la formación de poros y permite la salida descontrolada de iones de K<sup>+</sup> y ATP, ocasionando la muerte celular (Modificado de Kawada-Matsuo et al. 2017).

La actividad antimicrobiana es altamente efectiva y selectiva contra bacterias Gram+ debido a que su estructura permite el ingreso y acoplamiento de la nisina con el lípido II ubicado en la membrana celular. En el caso de bacterias Gram-, la nisina no puede unirse al lípido II, ni penetrar la membrana con facilidad debido a la estructura de la pared celular de este tipo de bacterias, dado que poseen una capa externa que actúa como barrera impermeable. Sin embargo, la pared celular puede volverse permeable a la nisina si hay una interrupción total o parcial en ella, para ello generalmente se usa en conjunto con otros métodos de conservación de alimentos (pasteurización, enlatados, entre otros), para así hacerla sensible a la acción de la nisina y provocar la lisis celular (Williams y Broughton 2003; Narvaus y Axelsson 2003; Montalban y Kuipers 2018).

Adicional a lo anterior; gran cantidad de estudios han demostrado que la nisina no es un compuesto tóxico o cancerígeno para el consumidor, debido a su sensibilidad ante una acción proteolítica; permitiéndole ser un aditivo con uso para varios alimentos de acuerdo a diferentes regulaciones como: Codex, FDA, entre otras.

Un punto de suma importancia a destacar de la nisina y su uso en el área de alimentos, es que se ha demostrado que la nisina no es tóxica o carcinógena para los consumidores, esto debido a que se degrada en la parte superior del tracto digestivo puesto que, como se indicó previamente es sensible a la acción de proteasas, por lo tanto es inactivada por la actividad de enzimas digestivas, por lo tanto, no existe exposición sistémica a la nisina, es por ello que actualmente está catalogada como aditivo permitido por el código alimentario con el código (E234), disponible de manera comercial.

La nisina es aplicada sola o en combinación con otros métodos de conservación de alimentos en el desarrollo de productos procesados lácteos como queso y yogurt, en productos enlatados: sopas, vegetales, guarniciones, salsas, condimentos; productos cárnicos, embutidos (Tabla 1). Un ejemplo de combinación de métodos para alcanzar la inocuidad de alimentos es la adición de la nisina en productos que son previamente pasteurizados a fin de controlar el crecimiento de bacterias Gram+ que hayan sobrevivido a estos procesos térmicos, como ejemplo: *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp.*, *Bacillus stearothermophilus*, *Staphylococcus aureus*, entre otros (Badui 2013 ; Cano et al. 2015).

Tabla 1. Aplicación de nisina en la conservación de alimentos (Adaptada de Williams y Delves-Broughton 2003).

Tipo de alimento / aplicación	Dosis de nisina mg/kg <sup>-1</sup> o mg/L <sup>-1</sup>	Microorganismos blanco
Queso procesado	5-15	<i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp.</i>
Postres (base leche)	0.25-10	<i>Bacillus spp.</i>
Leche pasteurizada / productos lácteos	0.25-10	<i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp.</i>
Alimentos enlatados (baja acidez)	2.5-5	<i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>C. thermosaccharolyticum</i>
Alimentos enlatados (alta acidez)	1.25-2.5	<i>C. pasteurianum</i> <i>B. macerans</i> <i>B. coagulans</i>
Queso ricotta	5	<i>Listeria monocytogenes</i>
Bollos (pan)	3.75-6.25	<i>Bacillus cereus</i>
Aderezos para ensaladas	1.25-5	Bacterias ácido lácticas
Sopas refrigeradas pasteurizadas	2.5-5	<i>Bacillus spp.</i>
Langosta en conserva	25	<i>Listeria monocytogenes</i>
Productos pasteurizados de huevo líquido	1.25-5	<i>Bacillus spp.</i> , <i>B. cereus</i>
Cerveza: Lavado de levadura (inicio)	25-37.5	<i>Lactobacillus spp.</i>
Durante la fermentación	0.63-2.5	<i>Pediococcus spp.</i>

## 5. CONCLUSIONES:

El área de los alimentos es una rama en donde aún hay muchos descubrimientos por realizar y muchas alternativas que desarrollar, es factible centrar los esfuerzos en buscar y elaborar productos disminuidos en el contenido de sustancias químicas, debido al aumento en la incidencia de enfermedades que se desarrollan en relación directa con su consumo. Actualmente, debido a la globalización, la difusión de la información induce a que el comprador sea más consciente y selectivo respecto a la disponibilidad productos en el mercado, buscando aquellos menos industrializados, sin presencia de conservadores sintéticos.

Debido a la necesidad de incrementar la producción de alimentos para satisfacer la alimentación de la población, el mundo actual se ha esforzado por producir alimentos en masa que tengan una mayor vida de anaquel, demostrando la importancia de los antibióticos para la conservación de algunos productos lácteos. Aunado a esto el tema de seguridad alimentaria es un factor fundamental en la sociedad, como es mencionado en la agenda 2030 de la ONU.

Si revisamos el concepto de seguridad alimentaria desde su base, consiste en asegurar que todas las personas tengan acceso a la cantidad necesaria de productos alimenticios de calidad y variados para su correcta nutrición, sin embargo, tristemente la mayoría de los productos naturales: frutas, hortalizas, carnes, huevo, entre otros, representan pérdidas incalculables por su corta vida de anaquel, es por ello imprescindible continuar con investigación que se pueda aplicar realmente en sistemas de producción primaria sin importar el tamaño del huerto, parcela o corral, y con ello garantizar una conservación de alimentos con productos elaborados a partir de antibióticos como la nisina, que no son dañinos para los consumidores.

## Referencias:

Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol* 100: 2939–2951

Badui Dergal, S. (2013). *Química de los alimentos* (5a. ed.). México: Pearson Education.

Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C and Mahillon J (2019) Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group.

*Front. Microbiol.* 10:302. doi: 10.3389/fmicb.2019.00302

Flores Pérez A. 2017. Estudio de la actividad proteolítica y perfil de péptidos de *Lactococcus lactis* UQ2 Rif L+ como cultivo protector incorporado en el proceso de queso tipo panela. (Tesis de posgrado), Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.

Gaare, Manju & Hussain, Abdul & Mishra, Dr. Santosh & Ram, Chand. 2013. Natural Antimicrobials For preservation of Food.

Gutiérrez Jiménez M. 2018. Nuevos deshidroaminoácidos quirales: Síntesis, reactividad y aplicaciones biológicas. (Tesis de posgrado), Universidad de la Rioja, España.

Heredia-Castro, Priscilia y; Hernández-Mendoza, Adrian; González-Córdova, Aarón f.; Vallejo-Cordoba, Belinda. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, vol. 42, núm. 6, junio, 2017, pp. 340-346 asociación interciencia caracas, Venezuela.

Katrin Christ, Imke Wiedemann, Udo Bakowsky, the role of lipid II in membrane binding of and pore formation by nisin analyzed by two combined biosensor techniques, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1768, Issue 3, 2007, Pages 694-704, ISSN 0005-2736, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.12.003>.

Kawada-Matsuo, Miki & Komatsuzawa, Hitoshi. (2017). Role of *Streptococcus mutans* two-component systems in antimicrobial peptide resistance in the oral cavity. *Japanese Dental Science Review*. 53. 10.1016/j.jdsr.2016.12.002.

Kemperman, R.; Kuipers, A.; Karsens, H.; Nauta, A.; et al 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 1589-1597.

Li Q, Montalban-Lopez M, Kuipers OP. 2018. Increasing the antimicrobial activity of nisinbased lantibiotics against Gram-negative pathogens. *Appl Environ Microbiol*

84: e00052-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00052-18>.

Mondragón Preciado, G.; Escalante Minakata, P; Osuna Castro, J. A.; Ibarra Junquera, V. I.; Morlett Chávez, J. A.; Aguilar González, C. N.; Rodríguez Herrera, R., Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 59, 63-69, 2013.

Parra H. R. 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Universidad Tecnológica y Pedagógica de Colombia*.

Perin, Luana and Nero, Luís. 2014. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. *BMC microbiology* 14. 36. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-36>

Prince, A., Sandhu, P, Ror, P. et al. Lipid-II Independent antimicrobial mechanism of nisin depends on its crowding and degree of oligomerization. *Sci Rep* 6, 37908 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep37908>

Programa conjunto fao/oms sobre normas alimentarias comité del Codex sobre aditivos alimentarios 45a reunión beijing (china), 18 al 22 de marzo de 2013.

Siodlak D. (2015).  $\alpha,\beta$ -Dehydroamino acids in naturally occurring peptides. *Amino acids*, 47(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1846-4>

Song, A.A., In, L.L.A., Lim, S.H.E. et al. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microb Cell Fact* 16, 55 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0669-x>

Williams G. C, Delves-Broughton J. (2003) *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Dorset, UK. Elsevier Science.

Ziarati, Parisa & Tamaskani Zahedi, Maryam & Shirkhan, Faezeh & Mostafadi, Mahdieh & Hochwimmer, Bernhard. (2018). Potential Health Risks and Concerns of High Levels of Nitrite and Nitrate in Food Sources. 1. 1-13.