

Caracterización y Evaluación de la capacidad proteolítica de dos cepas de *Lactobacillus sakei* nativas de carpa silvestres y carpa cultivada (*Cyprinus carpio*)

Sahagun Aguilar, M.L.¹, Villanueva Rodríguez S.J.¹; Cervantes Lugo E.C.¹; García Parra, M.D.¹

¹Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Subsele Zapopan. Camino al arenero 1227, El Bajío del Arenal, CP 45019, Zapopan, Jalisco, México. Tel: +52 (33) 3345 5200. Correo: dgarcia@ciatej.mx

Palabras clave Fermentación BAL Proteolisis

Alimentos fermentados y probióticos

Introducción

La actividad proteolítica que poseen distintos microorganismos puede ser de utilidad para la obtención de metabolitos de interés durante la fermentación en la industria de los alimentos. Diversos alimentos han sido fermentados para la obtención de biomoléculas como los péptidos bioactivos, que tienen distintas funciones biológicas: como antimicrobianos, antioxidantes, antihipertensivos, entre otros [1]. Los alimentos fermentados de los cuales se han obtenido estos péptidos incluyen los vegetales, carne como la de cerdo, res y peces como la carpa (*Cyprinus carpio*) [2].

Las bacterias ácido lácticas (BAL), han mostrado poseer un sistema enzimático proteolítico muy complejo (cada género y especie posee distinta especificidad), pudiéndose obtener péptidos con diversas funciones, este sistema enzimático consiste de una proteasa de pared de membrana que es el primer contacto de la bacteria con las proteínas presentes en el medio de cultivo, además de un sistema de transportadores específicos los cual transportan a los péptidos de la primera hidrolisis al interior de la bacteria para continuar la hidrolisis por medio de un sistema de enzimas específicas para convertirlos a péptidos más pequeños o residuos de aminoácidos [3].

Gran variedad BAL han mostrado poseer este sistema para hidrolisis de proteína, siendo las BAL nativas provenientes de fuentes proteicas (BAL que son capaces de sobrevivir en organismos o ecosistemas) las que poseen un sistema enzimático más eficiente debido a que son aisladas de ecosistemas adversos, en este caso de ecosistemas u organismos ricos en proteínas [4]. Una de las BAL como *Lactobacillus sakei*, se ha aislado de fuentes proteicas como peces en los que se incluye la carpa (*Cyprinus carpio*) [5].

Lactobacillus sakei es una BAL heterofermentativa, Gram positiva, catalasa negativa, que es comúnmente utilizada como cultivo iniciador en fermentación de carnes, debido a su potencial proteolítico (capacidad de hidrolizar proteínas). La actividad proteolítica de este tipo de bacterias (*Lactobacillus sakei*) ocurre durante el procesamiento de la carne que conduce a la generación de péptidos con actividad biológica (péptidos menores a 5KDa) [6]; la actividad proteolítica está en relación con el ecosistema donde se desarrollan las BAL. Por lo que el objetivo de esta investigación fue comparar la actividad proteolítica de dos cepas de *Lactobacillus sakei* provenientes de carpa cultivada (mercado del mar de la Zona metropolitana de Guadalajara) y carpa silvestre (Lago de Chapala).

Metodología

Aislamiento

Para el aislamiento de estas BAL nativas de la carpa, se consideró un pescado completo como una muestra experimental, por lo que se partió de tres carpas completas cultivada y tres carpas completas silvestre; posteriormente se sometieron a fermentación espontánea a 15°C, para dar lugar al desarrollo de microbiota nativa. Se consideraron dos tiempos de muestreo (5 y 10 días), el muestreo de cada carpa fue realizado en piel e intestinos, tanto para las carpas silvestres y la carpas cultivadas. Para el aislamiento de las BAL, se realizaron diluciones decimales y seriales, posteriormente se sembró en agar Man, Rogosa and Sharpe (MRS), y se incubaron a 32°C/48h en condiciones anaerobias. Después de la incubación las colonias típicas de BAL fueron seleccionadas aleatoriamente y aislados en placas de agar MRS.

A las colonias aisladas se les realizó tinción Gram, morfología celular y catalasa, para seleccionar las colonias típicas de BAL.

Identificación de Bacterias lácticas (BAL)

Para identificar los aislados de BAL se utilizó la metodología de Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometer (MALDI-TOF MS) con MICROFLEX LT platform (Bruker Daltonics), MALDI TOF [7]. De los aislados se transfirió una colonia con un palillo estéril a la placa del equipo, sobre la colonia se aplicó una matriz en solución HCCA (10 mg/mL alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma-Aldrich) en 50% acetonitrilo and 2.5% trifluoroacético acid), esta matriz tiene como función ionizar la muestra mediante un haz de luz pulsante. Una vez ionizadas las muestras, estas proteínas viajan por una cámara de vacío siendo detectadas al final para generar un espectro. Los espectros se comparan automáticamente con la librería BDAL (Bruker Daltonics) del MALDI TOF, con un criterio de identificación exitosa con un score mayor o igual a 1.7. Todas las cepas se identificaron por duplicado y posteriormente se conservaron en congelación a -20°C con glicerol como crioprotector.

Identificación de la actividad proteolítica de BAL

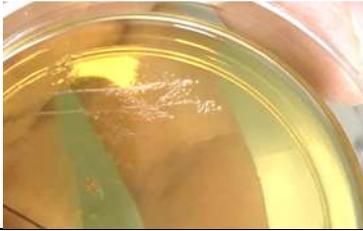
Las dos cepas identificadas como *Lactobacillus sakei*, fueron sembradas, por separado, en agar MRS e incubadas a 32°C/48h, la actividad proteolítica se llevó a cabo por medio de la técnica de ensayo de agar en placa, la cual consiste en tomar una colonia con un palillo estéril e inocular en agar compuesto (sulfato de magnesio heptahidratado 0.1 g/L; sulfato de manganeso tetrahidratado 0.05 g/L; fosfato dipotásico 2 g/L; glucosa (Sigma) 10 g/L; agar (BD Difco) 15 g/L; y suplementado con 1 mg/mL de harina de músculo de carpa), el cual se incubó a 32°C durante 5 días. Para visualizar el halo proteolítico se inundó la caja con solución de tinte (Azul Coomassie brillante R 250 (Bio-Rad) 0.25 g/L; metanol (JT Baker) 450 mL/L; ácido acético Glacial 100 mL/L (Fermont); agua destilada 450 mL/L)); el tinte se llevó a cabo por 1h, posteriormente se elimina la solución de tinte y se inundó con solución de destinte (Metanol (Fermont) 200 mL/L; ácido acético (Fermont) 150 mL/L; agua destilada 650 mL/L) por 1h. Los resultados de esta técnica se visualizan mediante la presencia de halos proteolíticos, considerando como positivos aquellos halos mayores a 0.2cm de diámetro.

Resultados y discusión

Caracterización de BAL aisladas

Se obtuvieron 35 aislados de la carpa cultivada y 28 aislados de la carpa silvestre, con características morfológicas típicas de las BAL; todos los aislados fueron Gram-positivos y catalasa negativos, además se presentaron en forma de bacilos, que son morfologías características de estas BAL, se logró aislar una colonia de *Lactobacillus sakei* de carpa cultivada y otra de carpa silvestre (Tabla 1).

Tabla 1. Morfología colonial y tinción de ambas cepas de *Lactobacillus sakei*

Origen colonias	Morfología colonial	Tinción Gram
Carpa Cultivada		
Carpa Silvestre		

Identificación de las BAL

Lactobacillus sakei fue aislada de ambas carpas como se muestra en la Tabla 2. Esta cepa es comúnmente aislada de peces como microbiota benéfica. Como podemos visualizar en la tabla, cada una de las cepas identificada proviene de diferente ecosistema, la cepa *Lactobacillus sakei* de carpa cultivada se aisló a los 5 días de fermentación del intestino de las carpas, mientras que la cepa nativa de *Lactobacillus sakei* de la carpa silvestre, se aisló a los 10 días de fermentación de la piel de las carpas.

Tabla 2. Cepas identificadas en las carpas de distinto origen

Origen	Días de fermentación		Órgano de aislamiento	
	5	10	Piel	Intestinos
<i>Lactobacillus sakei</i> cultivada				
<i>Lactobacillus sakei</i> silvestre				

Determinación de la actividad proteolítica de *Lactobacillus sakei*

Las dos cepas de *Lactobacillus sakei* mostraron halo proteolítico Figura 1.

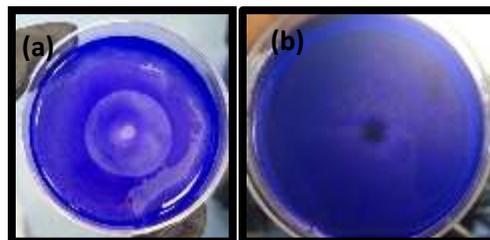


Figura 1. Halo proteolítico. (a) *Lactobacillus sakei* silvestre, (b) *Lactobacillus sakei* cultivada.

Lactobacillus sakei proveniente de carpa silvestre muestra un halo proteolítico evidentemente mayor que el *Lactobacillus sakei* proveniente de carpa cultivada (Tabla 3). Esta diferencia puede ser debida a que *Lactobacillus sakei* proveniente de carpa silvestre, probablemente estuvo expuesta a una mayor fuente de

proteínas durante su desarrollo en el Lago de Chapala y esto la obligo a desarrollar un sistema proteolítico más eficiente, mientras que la cepa de *Lactobacillus sakei* proveniente de carpa cultivada puede estar expuesta a una menor cantidad de proteínas durante su desarrollo por lo que su halo proteolítico es menor [8].

Tabla 3. Actividad proteolítica de ambas cepas de *Lactobacillus sakei*

BAL	Halo (cm)
<i>Lactobacillus sakei</i> cultivada	0.5 ± 0.0
<i>Lactobacillus sakei</i> silvestre	2.2 ± 0.4

Conclusiones

Las dos cepas de *Lactobacillus sakei* tuvieron capacidad proteolítica, de acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que el ecosistema de donde son obtenidas estas cepas proteolíticas influye en la eficiencia de su actividad proteolítica ya que *Lactobacillus sakei* aislada de carpas silvestre obtuvo un halo 4.4 veces mayor que *Lactobacillus sakei* cultivada.

De acuerdo con estos resultados puede ser que entre más adverso es el ecosistema de donde son aisladas pueden poseer un sistema metabólico más eficiente como en el caso de *Lactobacillus sakei* silvestre. La cepa nativa aislada de *Lactobacillus sakei* silvestre, obtenida de carpas (*Cyprinus carpio*) del Lago de Chapala con sistema metabólico eficiente en la hidrólisis de proteínas, puede ser de utilidad en la industria de alimentos para la elaboración de alimentos fermentados funcionales, de donde se pudieran obtenerse péptidos bioactivos.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por el Proyecto “Desarrollo de un alimento nutracéutico inhibidor de la enzima convertidora de la Angiotensina, principal responsable de la hipertensión arterial, a partir de músculo de carpa (*Cyprinus carpio*), del FODECIJAL.

Bibliografía

1. Cai Y, Suyanandana P, Saman P, Benno Y (Agosto 1999) Classification and characterization of lactic acid bacteria from the intestines of common carp and freshwater prawns, *The Journal of General and Applied Microbiology* [online] Vol. 45, Art. #4. Consultado: 6 junio 2021.
2. Venegas MG, Flores AC, Martinez JL, Aguilar CN, Nevarez GV (6 junio 2019) Production of bioactive peptides from lactic acid bacteria: a sustainable approach for healthier foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online] Vol.18, Art. #4. Consultado: 5 junio 2021.
3. Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P (13 marzo 2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria, *Applied Microbiology Biotechnology* [online] Vol. 71, Art. #3. Consultado: 10 junio 2021.
4. Fadda S, Lopez C, Vignolo G (6 abril 2010) Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Science* [online] Vol. 86, Art. #
5. Hagi T, Hoshino T (22 May 2014). Screening and Characterization of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria from Cultured Common Carp Intestine. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online] Vol. 73, Art. #7. Consultado 21 junio 2021.
6. Beristain SC, Mani E, Palau E (12 octubre 2016). Antimicrobial activity of whey protein films supplemented with *Lactobacillus sakei* cell-free supernatant on fresh beef. *Food Microbiology* [online] Vol. 62. Consultado 15 junio 2021.

7. De la Torre F., Gutierrez D., Gschaedler A., & Reinhart, M. (6 junio 2018). Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for differentiation of *Pichia kluyveri* strains isolated from traditional fermentation processes. [online] *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. [online] Vol 32, 1514-1520. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rcm.8192>. Consultado: 20 de septiembre de 2020.
8. Liu M, Bayjanov JR, Renckens B, Nauta A, Siezen R-J (2010) The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics* [online] Vol. 2010, Art. #36. Consultado: 17 junio 2021.