



Potencial actividad antimicrobiana del péptido BTM-P1 en alimentos*

José Alexander Álvarez Bustamante^a ■ Luis Sthanlly Tandioy^b ■ Paola Andrea Zapata Ocampo^c.

Resumen: uno de los desafíos de la industria alimentaria es la preservación de los alimentos; para ello se han desarrollado técnicas que prolongan la integridad de sus nutrientes y propiedades sensoriales el mayor tiempo posible. Dentro de los principales problemas está la contaminación bacteriana, que ha sido tratada con antibióticos sintéticos, pero estos pueden dejar residuos tóxicos para el consumo humano. Adicionalmente, existe la preocupación por enfermedades que causarían las bacterias que desarrollan resistencia microbiana por el uso prolongado de antibióticos; por eso se han utilizado alternativas naturales como la nisina, utilizada con éxito desde hace varias décadas, a pesar de algunas limitaciones que se podrían superar investigando y probando con nuevos péptidos antimicrobianos. El péptido BTM-P1 es una molécula policatiónica, derivada de la protoxina natural Cry11Bb1 de *Bacillus thuringiensis subespecie Medellin*, que ha mostrado capacidad para destruir bacterias; esto lo convierte en un potencial preservante de alimentos. El propósito de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana del péptido BTM-P1 con bacterias típicas de los alimentos, tales como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*. Dicha actividad se estudió con cultivos a diferentes condiciones fisicoquímicas, con el fin de emular distintos ambientes del péptido en los alimentos. Se mostró que *Listeria monocytogenes* fue la bacteria con mejor recuperación después de su incubación con el péptido a diferentes temperaturas, y el prealmacenamiento de BTM-P1 en ambientes ácidos aumentó su actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*. Se concluye que el péptido BTM-P1 mantiene su actividad antimicrobiana en medios de incubación con pH de 3 a 7 y temperaturas de 4 a 37 °C.

Palabras clave: enfermedades bacterianas y transmitidas por los alimentos; péptidos; antimicrobiano; cultivos bacterianos

* Artículo de investigación

a Doctor en ciencias – física, magíster en Ciencias – Física, ingeniero físico. Universidad CES, de Medellín, Colombia. Correo electrónico: jaalvarez@ces.edu.co ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0376-1054>

b Microbiólogo industrial y ambiental. Universidad CES, de Medellín, Colombia. Correo electrónico: luis.sthanlly@uces.edu.co ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9284-4555>

c Doctora en biología, magíster en biología, química farmacéutica. Universidad CES, de Medellín, Colombia. Correo electrónico: pazapata@ces.edu.co ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8177-7174>

Recibido: 16/11/2020

Aceptado: 11/08/2022

Disponible en línea: 30/06/2023

Cómo citar: J.A. Álvarez, L.S. Tandioy, P.A. Zapata, "Potencial actividad antimicrobiana del péptido BTM-P1 en alimentos", Rev. Fac. Cienc. Básicas, vol. 17, n.º 2, pp. 39-53, jun., 2023, DOI: <https://doi.org/10.18359/rfcb.5434>

Potential antimicrobial activity of the peptide BTM-P1 in foods

Abstract: One of the challenges of the food industry is preserving food, for which techniques have been developed to prolong the integrity of their nutrients and sensory properties for as long as possible. One of the main problems is bacterial contamination, which has been treated with synthetic antibiotics but may leave toxic residues for human consumption. Additionally, there is concern about diseases caused by bacteria that develop microbial resistance from prolonged use of antibiotics. Therefore, natural alternatives such as nisin have been used successfully for several decades, despite some limitations that could be overcome by researching and testing new antimicrobial peptides. The BTM-P1 peptide is a polycationic molecule derived from the natural protoxin Cry11Bb1 of *Bacillus thuringiensis* subspecies Medellin, which has shown the ability to destroy bacteria, making it a potential food preservative. The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the BTM-P1 peptide with typical food bacteria, such as *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., and *Listeria monocytogenes*. This activity was studied with cultures under different physicochemical conditions to emulate different peptide environments in foods. It was shown that *Listeria monocytogenes* was the bacteria with the best recovery after incubation with the peptide at different temperatures, and pre-storage of BTM-P1 in acidic environments increased its antimicrobial activity against *Escherichia coli*. It is concluded that the BTM-P1 peptide maintains its antimicrobial activity in incubation media with pH ranging from 3 to 7 and temperatures ranging from 4 to 37 °C.

Keywords: bacterial and foodborne illnesses; peptides; antimicrobials; bacterial cultures.

Atividade microbiana em potencial do peptídeo BTM-P1 em alimentos

Resumo: Um dos desafios da indústria alimentícia é a preservação dos alimentos. Para isso, desenvolveram-se técnicas que prolongam a integridade de seus nutrientes e as propriedades sensoriais pelo maior tempo possível. Entre os principais problemas está a contaminação bacteriana, que foi tratada com antibióticos sintéticos, mas que pode deixar resíduos tóxicos para o consumo humano. Além disso, existe a preocupação com doenças causadas pelas bactérias que desenvolvem resistência microbiana pelo uso prolongado de antibióticos. Por esse motivo, alternativas naturais, como a nisina, tem sido utilizadas com sucesso há várias décadas, apesar de algumas limitações que poderiam ser superadas com investigações e testes com novos peptídeos antimicrobianos. O peptídeo BTM-P1 é uma molécula policatiónica, derivada da protoxina natural Cry11Bb1 do *Bacillus thuringiensis* subespécie Medellín, que demonstrou a capacidade de destruir bactérias; isso o converte em um conservante de alimentos em potencial. O propósito deste trabalho foi avaliar a atividade microbiana

do peptídeo BTM-P1 com bactérias típicas dos alimentos, tais como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*. Tal atividade foi estudada com cultivos em diferentes condições físico-químicas, com o fim de simular distintos ambientes do peptídeo nos alimentos. Mostrou-se que a *Listeria monocytogenes* foi a bactéria com melhor recuperação depois de sua incubação com o peptídeo em diferentes temperaturas e que o pré-armazenamento de BTM-P1 em ambientes ácidos aumentou sua atividade microbiana contra *Escherichia coli*. Conclui-se que o peptídeo BTM-P1 mantém sua atividade antimicrobiana em meios de incubação com pH de 3 a 7 e temperaturas de 4 a 37 °C.

Palavras-chave: doenças bacterianas e transmitidas pelos alimentos; peptídeos; antimicrobiano; cultivos bacterianos.

Introducción

Uno de los propósitos de la industria alimentaria es ofrecer alimentos seguros y de calidad para el consumo humano [1], [2]. Desafortunadamente, los casos de muertes y enfermedades ocasionadas por consumir productos mal manipulados todavía son evidentes en los últimos treinta años [3]-[6]. Por lo tanto, la preservación de alimentos es una tarea primordial para asegurar la salud de los consumidores [2].

Para empezar, preservar alimentos consiste en aplicar técnicas físicas o químicas que prolonguen la integridad y los nutrientes en estos productos [7]. Para ello es necesario reducir la degradación por reacciones de oxidación de lípidos, que se puede iniciar por luz, temperatura, enzimas, metales, metaloproteínas o microorganismos [7]. Las reacciones de oxidación involucran radicales libres o especies reactivas de oxígeno, y ácidos grasos, cuyos productos generados pueden oxidar otros compuestos como vitaminas y aminoácidos [7]. Para reducir la oxidación de ácidos grasos, los antioxidantes son útiles funcionando como captadores de radicales libres, absorbentes de oxígeno o quelantes [7], [8]. También están los envasados que bloquean el acceso del oxígeno [9] y reducen la contaminación bacteriana en alimentos [10]-[13].

Con respecto a las bacterias que afectan a los alimentos y que además ocasionan enfermedades en los consumidores están *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes* [14]-[16]. Por ello, desde la década de 1930 se han utilizado antibióticos de origen sintético que han favorecido la producción, preservación e inocuidad de los alimentos [17]. Pero el uso excesivo de antibióticos ha generado preocupación por las enfermedades que podrían provocar indirectamente desde la resistencia microbiana [17], [18]. Adicionalmente, los antibióticos pueden dejar residuos en los alimentos, los cuales pueden tener efectos adversos en los humanos por toxicidad directa, como reacciones alérgicas, carcinogenicidad o teratogenicidad [18]. De modo que se ha sugerido y promovido el uso de productos naturales [19] como los péptidos antimicrobianos [20]-[23], como alternativas para la conservación de los alimentos.

Como producto natural, la nisina es una molécula con actividad antimicrobiana, aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, y conocida como el péptido antimicrobiano utilizado para la preservación de alimentos [20], [24]. Hasta el momento, no se han reportado daños y efectos adversos causados por la ingesta de alimentos con nisina, pero sí sobre sus limitaciones [24]. La nisina tiene una efectividad baja para preservar alimentos en algunas condiciones fisicoquímicas [25]-[27] que se pueden superar parcialmente aplicando algunas técnicas de procesamiento de alimentos. Por ejemplo, la adición de quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (ethylenediaminetetraacetic acid o EDTA, en inglés) [28], [29], el precalentamiento del producto alimentario [30] o la reducción del pH [25], [31], [32]. Por eso, es necesario investigar nuevos productos naturales u otros péptidos antimicrobianos que podrían superar las limitaciones de la nisina.

Por ejemplo, el péptido BTM-P1 es una molécula policatiónica proveniente de la protoxina natural *Cry11Bb1* de *Bacillus thuringiensis* subespecie *Medellin* [33]. BTM-P1 posee una actividad permeabilizadora dependiente del potencial transmembranal, demostrada en glóbulos rojos y mitocondrias [33], [34], y, además, en actividad contra algunas bacterias [34], [35]. El péptido posee una longitud de 26 aminoácidos, cinco de los cuales determinan su carga +5 a pH neutro [35]. La característica anfipática y la estructura hélice alfa de la molécula le permiten formar canales en membranas biológicas [36]. Así, BTM-P1 se convierte en un potencial preservante de alimentos de interés para la investigación.

El propósito de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana del péptido BTM-P1 bajo distintas condiciones fisicoquímicas. Para esto se realizó un seguimiento al crecimiento de las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*, a diferentes temperaturas y pH, con BTM-P1 añadido. También se estudió la actividad antimicrobiana cuando el péptido se almacenó en medios de distintas temperaturas y pH, previo a su adición en cultivos bacterianos.

Materiales y métodos

1. Péptido y microorganismos

El péptido patentado BTM-P1 [35], de secuencia de aminoácidos (NaC) Val-Ala-Pro-Ile-Ala-Lys-Tyr-Leu-Ala-Thr-Ala-Leu-Ala-Lys-Trp-Ala-Leu-Lys-Gln-Gly-Phe-Ala-Lys-Leu-Lys-Ser y peso molecular 2788,44 Da, fue sintetizado por la empresa Biomatik con pureza HPLC > 98 %.

Las bacterias utilizadas para los cultivos fueron cedidas por el Instituto de Medicina Tropical, de la Universidad CES, de Medellín (Colombia), en medio agar tripticasa de soya (TSA), a pH 7 y conservados a 4 °C. Los cultivos luego fueron repicados y mantenidos en agar Mueller-Hinton para *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 o agar infusión cerebro corazón para *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, a pH 7 y 37 °C.

2. Curvas de crecimiento en microplacas

Inicialmente, el inóculo se preparó haciendo una suspensión directa en caldo agar Mueller-Hinton (MH) o en caldo infusión cerebro corazón (ICC), desde una colonia aislada, de un cultivo en agar nutritivo, a 24 h. Luego, el caldo agar MH o ICC, con inóculo suspendido directamente, se incubó a 37 °C durante 24 h. El crecimiento de los cultivos se verificó posteriormente con la densidad óptica (DO) usando el espectrofotómetro Biotek®. La absorbancia del inóculo fue ajustada a 0,08, equivalente a 0,5 en la escala de McFarland, con lectura a 625 nm y equivalente a una suspensión de 1×10^8 a 2×10^8 unidades formadoras de colonias de bacterias por mililitro (UFC/mL), aproximadamente. Finalmente, 100 µl de inóculo se disolvieron en 100 µl de caldo agar MH o agar ICC en la microplaca, densidad óptica (DO) final 0,04 [37].

El crecimiento de los cultivos bacterianos en microplacas se siguió durante el primer y segundo día, por períodos de una a dos horas. Las microplacas fueron incubadas a 37 ± 1 °C y se prepararon ocho réplicas para cada microorganismo. Para cada medición, las microplacas fueron agitadas y se midió el crecimiento

bacteriano a la longitud de onda 625 nm en el espectrómetro para microplacas Biotek®.

3. Crecimiento de bacterias en presencia de diferentes concentraciones de péptido

La actividad del péptido BTM-P1 fue evaluada a diferentes concentraciones en cultivos bacterianos. Inóculos de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. o *Listeria monocytogenes* fueron suspendidos en caldo Mueller-Hinton (MH) o caldo infusión cerebro corazón (ICC), desde colonias aisladas de cultivo en agar nutritivo, e incubados 24 h. El péptido BTM-P1 fue almacenado en solución stock a 5 mg/mL (1,8 mM), en agua destilada, luego fue separado en alícuotas de concentraciones diferentes, en viales de polipropileno, cerrados y almacenados a -20 °C [38], [39]. De cada alícuota se extrajeron 100 µl que fueron adicionados a 100 µl de inóculo para lograr concentraciones finales de 2,5 µM, 5,0 µM, 7,5 µM, 10 µM, 15 µM y 20 µM BTM-P1 en los pozos de las microplacas (sin péptido para el control). El pH y la temperatura fue 7 y 37 °C, respectivamente.

4. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad antimicrobiana del péptido BTM-P1 en el crecimiento de bacterias

Se llevó a cabo el mismo procedimiento de preparación de cultivo descrito previamente, 1×10^8 a 2×10^8 UFC/mL, para las pruebas de crecimiento bacteriano en presencia y ausencia del péptido BTM-P1. Se adicionaron 100 µl del inóculo y se mezclaron con 100 µl del péptido disuelto en agua destilada para lograr una concentración final de 20 µM BTM-P1 en las microplacas. Luego se siguió el crecimiento bacteriano a diferentes temperaturas de incubación (4, 26, 37 o 60 °C).

En otros experimentos se adicionaron 100 µl del inóculo con pH 3, 5 o 7, preajustado con búfer fosfato, y se mezcló con 100 µl de péptido disuelto en agua destilada hasta lograr la concentración final 20 µM BTM-P1 en la microplaca. Luego se siguió el crecimiento bacteriano a 37 °C. Aunque el búfer acetato es más apropiado para pH ácido, se mantuvo el uso de búfer fosfato [40] en todas las pruebas, para descartar

posibles cambios o efectos nuevos por el cambio de búfer.

Para evaluar si la propiedad antimicrobiana del péptido se afectaría durante su almacenamiento, se almacenó en viales con medios de distinto pH y temperatura. El péptido se mantuvo en agua destilada a 4, 26, 37 o 60 °C, por 10 minutos, o en búfer fosfato a pH 3, 5 o 7, en nevera a 4 °C, antes de ser adicionado a los cultivos bacterianos. Para estos ensayos se tomaron 100 µl de solución peptídica de los viales, y se mezclaron con 100 µl del inóculo en las microplacas, para luego incubar a 37 °C. La concentración final de péptido fue 20 µM BTM-P1.

5. Tratamiento de datos

Los gráficos y estadísticos fueron obtenidos desde el lenguaje R con los softwares RStudio y Jamovi. Datos con promedio y desviación estándar de la densidad óptica (DO), como indicador de la cantidad de bacterias en las muestras, fueron reportados. Comparaciones entre dos grupos se hicieron con prueba t de Student (diferencia estadística $P < 0,05$; Test-T). Para comparar entre más de dos grupos se aplicó Anova con prueba de Tukey (diferencia estadística $P_{\text{tukey}} < 0,05$). Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se verificaron con prueba Shapiro-Wilk y prueba de Levene, respectivamente. Algunas correlaciones se describieron con prueba de Pearson, usando el coeficiente de correlación r_{pearson} .

Resultados y discusión

Los resultados del crecimiento de las bacterias con péptido BTM-P1 adicionado a diferentes

concentraciones se muestra en la Figura 1. La adición de 2,5 µM BTM-P1 no redujo significativamente la cantidad de *Escherichia coli* a las 4 h de estudio ($P = 0,038$; Test-T) pero sí se observó, por ejemplo, a las 17 h ($P = 0,002$; Test-T) y 25 h ($P < 0,01$, Test-T) de incubación (Figura 1A). Se identificaron mayores efectos en *Escherichia coli* desde 5 µM BTM-P1 ($P < 0,001$; Test-T). Las mediciones realizadas a las 17 h ($r_{\text{pearson}} = -0,958$) y 25 h ($r_{\text{pearson}} = -0,816$) mostraron que a mayor concentración de péptido se inhibe mejor el crecimiento de *Escherichia coli* (Figura 1A). Se observó inhibición en el crecimiento de *Salmonella* sp. desde 5,0 µM BTM-P1, en las primeras 4 h ($P = 0,033$; Test-T) y desde las 17 h ($P < 0,001$; Test-T) de estudio (Figura 2B). A las 17 h ($r_{\text{pearson}} = -0,945$) y 25 h ($r_{\text{pearson}} = -0,867$) se observa que la población de *Salmonella* sp. decae con el incremento de la concentración de BTM-P1 (Figura 1B). Para el caso de *Listeria monocytogenes*, se observaron efectos por la adición de péptido dentro de las primeras 4 h de iniciados los cultivos, excepto para la concentración 2,5 µM BTM-P1 ($P = 1,000$; Test-T) (Figura 1C). De las 17 horas en adelante no se encontraron diferencias significativas, con respecto al control ($P > 0,05$; Test-T comparando a una hora fija), para todas las concentraciones estudiadas con BTM-P1 (Figura 1C). Por lo visto, *Listeria monocytogenes* muestra una mejor recuperación en su población y resistencia al péptido BTM-P1, si se compara con *Escherichia coli* y *Salmonella* sp. Pero debido la complejidad de los componentes presentes en la pared celular de estas bacterias, no es posible ofrecer todavía una explicación detallada de la interacción péptido-membrana que justifiquen diferencias en su actividad antimicrobiana [41].

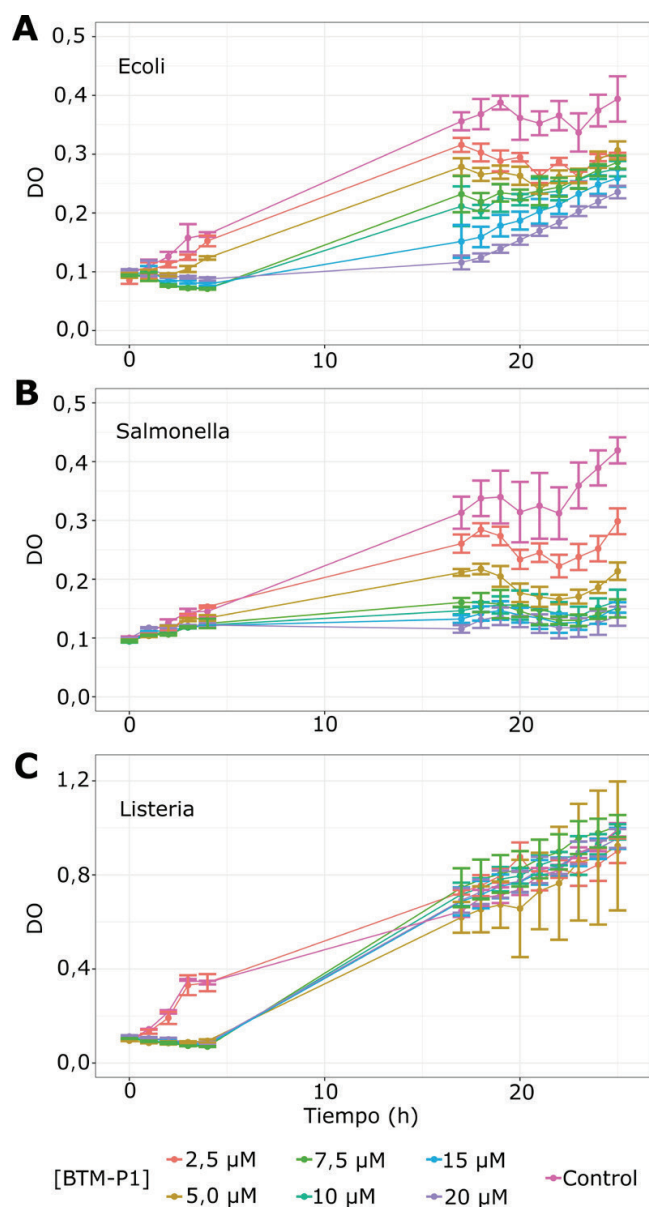


Figura 1. Efecto de la concentración del péptido BTM-P1 sobre el crecimiento de *Escherichia coli* (A) y *Salmonella* sp. (B), en caldo-agar Mueller-Hinton, y *Listeria monocytogenes* (C) en caldo-agar infusión cerebro corazón. Cada punto es la media de cinco réplicas de un ensayo, y su respectiva barra es la desviación estándar.

Los péptidos y las proteínas pueden cambiar su estructura secundaria con la temperatura o desnaturalizarse cuando se someten a temperaturas altas [42] [43]. Por ello, y con el fin de probar la actividad antimicrobiana del péptido después de un tratamiento térmico, se prealmacenó BTM-P1 a diferentes temperaturas (4, 26, 37 y 60 °C), por 10 minutos,

y luego se adicionó a los cultivos bacterianos, en los que logró inhibir el crecimiento en *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes* (Figura 2). No se encontraron diferencias significativas (entre temperaturas) dentro de las primeras siete horas y después de 19 horas de estudio, al comparar los resultados con péptido añadido ($P_{\text{tukey}} > 0,05$).

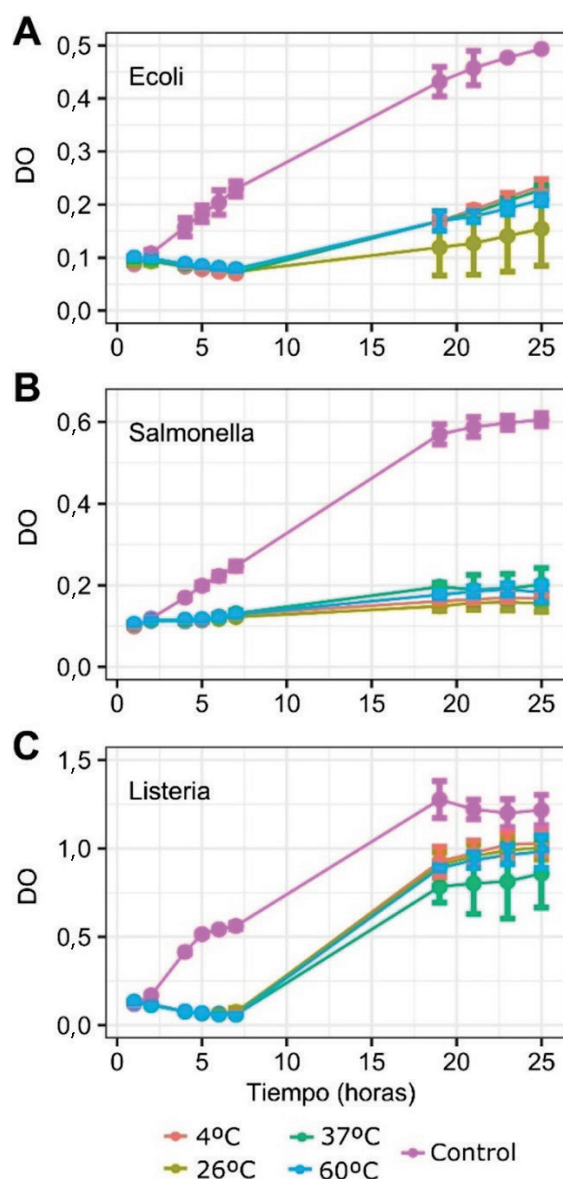


Figura 2. Crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* (A) y *Salmonella* sp. (B), en caldo-agar Mueller-Hinton, y *Listeria monocytogenes* (C) en caldo-agar infusión cerebro corazón, en presencia de péptido BTM-P1 prealmacenado a diferentes temperaturas. Cada punto es la media de seis réplicas de un ensayo, y su respectiva barra es la desviación estándar.

Debido a que los péptidos pueden cambiar su carga eléctrica o estructura secundaria, según la acidez o basicidad del medio donde se encuentran [44] [45], se evaluó la actividad antimicrobiana de BTM-P1 después de estar prealmacenado en viales a diferentes valores de pH (3, 5 y 7). El péptido logró inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*,

Salmonella sp. y *Listeria monocytogenes* (Figura 3), pero no se observó un efecto por el cambio del pH dentro de las primeras ocho horas de estudio ($P_{\text{tukey}} > 0,05$; comparando entre distintos valores de pH) y tampoco después de las 20 h, excepto para *Escherichia coli*, en la que el péptido fue más activo cuando fue prealmacenado a pH más ácido.

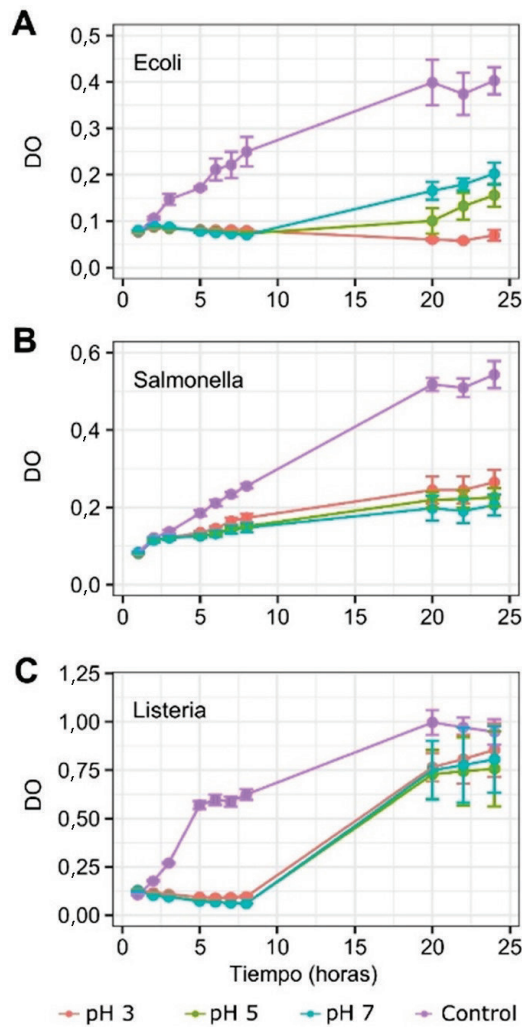


Figura 3. Crecimiento de las bacterias *Escherichia coli* (A) y *Salmonella* sp. (B), en caldo-agar Mueller-Hinton, y *Listeria monocytogenes* (C) en caldo-agar infusión cerebro corazón, en presencia de péptido BTM-P1 prealmacenado a diferentes valores de pH. Cada punto es la media de seis réplicas de un ensayo, y su respectiva barra es la desviación estándar.

Las Figuras 2 y 3 correspondieron a ensayos de efecto de temperatura y pH sobre el péptido en el stock. Se muestra que, a pesar de las variaciones fisicoquímicas en el medio de almacenamiento, BTM-P1 mantiene su actividad antimicrobiana.

En la Figura 4 se muestran los resultados de las pruebas de BTM-P1 adicionado en cultivos bacterianos que crecieron a diferentes temperaturas y en medios de distinto pH. Los resultados para los cultivos sin péptido (curvas control, Figura 4) estuvieron acordes con las observaciones dadas por

Membre *et al.* (2005) [46]. La temperatura más favorable para el crecimiento bacteriano es alrededor de 37 °C; reducir la temperatura conlleva a una menor tasa de crecimiento, y por encima de 45 °C no es posible el crecimiento bacteriano [46]. La metodología utilizada en esta investigación es un acercamiento a las condiciones ambientales para el crecimiento de las bacterias en distintos alimentos. Esto permitió probar la actividad antimicrobiana del péptido BTM-P1 en cultivos a distintas temperaturas y pH.

Aunque las bacterias lograron crecer a 4 °C, se observó mayor actividad antimicrobiana de BTM-P1 sobre *Escherichia coli* (diferencias de medias con control para pH 3: -0,08833; pH 5: -0,10567; y pH 7: -0,09600. Error estándar = 0,00307) y *Listeria monocytogenes* (diferencias de medias con control para pH 3: -0,3800; pH 5: -0,3340; y pH 7: -0,4050. Error estándar = 0,00588) respecto a *Salmonella* sp. (diferencias de medias con control para pH 3: -0,04033; pH 5: -0,06967; y pH 7: -0,05967. Error estándar = 0,00127) según registros a las 23 h de estudio (Figuras 4A, 4E y 4I).

A 26 °C, y para todos los valores de pH (3, 5, y 7), se observó una caída en la población de *Escherichia coli* (Figura 4B) y *Listeria monocytogenes* (Figura 4J), desde 1 h a 3 h por la adición de BTM-P1. No se observó actividad antimicrobiana en *Salmonella* sp. a estos tiempos de 1 h a 3 h (Figura 4F). Después de 7 h se observó un incremento alrededor de tres veces respecto a las primeras horas de estudio en *Listeria monocytogenes* (Figura 4J). Para *Salmonella* sp. el incremento fue alrededor de 1,5 veces (Figura 4F), y en *Escherichia coli* no se observó una recuperación en la población (Figura 4B).

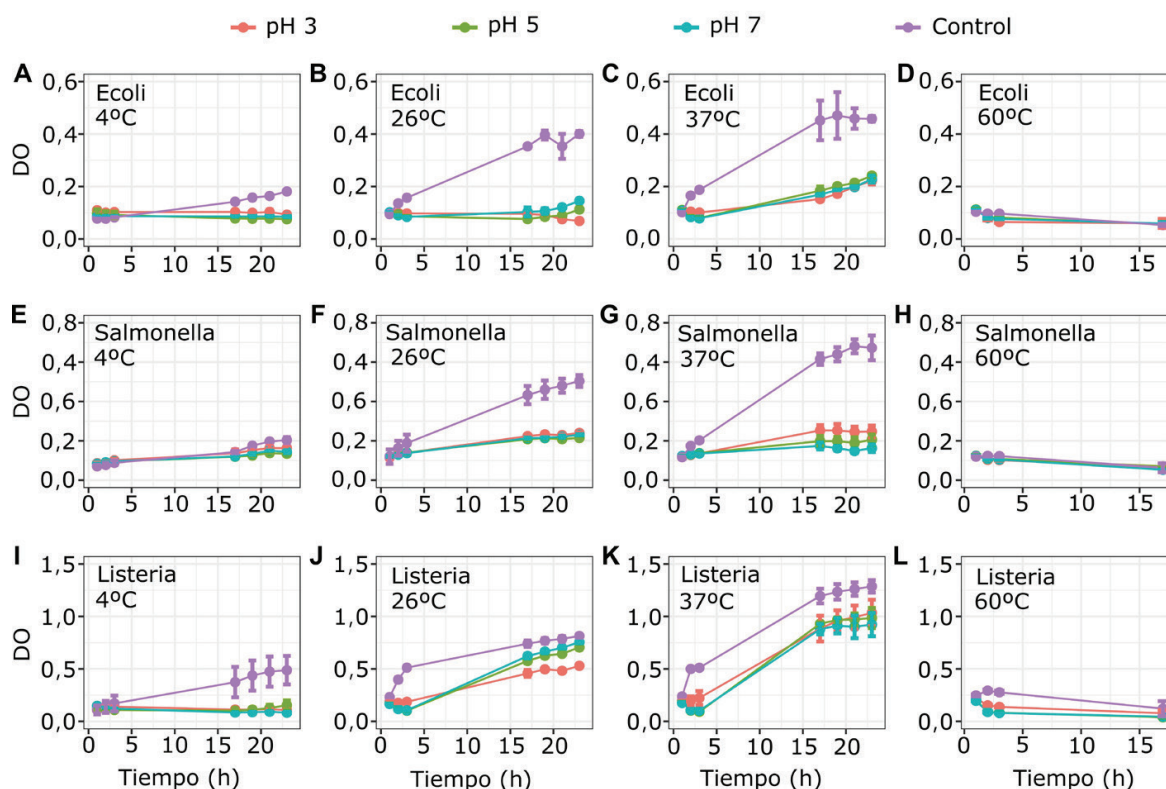


Figura 4. Efecto combinado del pH y la temperatura de incubación en cultivos sobre la actividad inhibitoria del péptido BTM-P1 en el crecimiento de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* sp. Cada punto es la media de tres réplicas de un ensayo, y su respectiva barra es la desviación estándar.

A 37 °C, los registros obtenidos dentro de las tres primeras horas de estudio, con péptido adicionado, fueron comparables a lo observado con 26 °C a estos mismos tiempos. A las 17 h, *Escherichia coli* (Figura 4C) y *Listeria monocytogenes* (Figura 4K) mostraron incrementos en la población bacteriana

para todos los valores de pH estudiados, manteniéndose por debajo de sus respectivos controles. Pero la población de *Salmonella* sp. no cambió significativamente entre las 19 h y 23 h (comparación entre horas; $P_{\text{tukey}} > 0,05$) para las muestras con péptido (Figura 4G).

Los experimentos a diferentes valores de pH, ajustados directamente en los cultivos, muestran que la adición de BTM-P1 serviría para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* (Figura 4A) y *Listeria monocytogenes* (Figura 4I) en alimentos refrigerados. Además, los resultados a 26 °C (Figuras 4B, 4F y 4J) muestran que se podría mantener un alimento durante más tiempo fuera de la refrigeración, ya que la cantidad de bacterias fue comparable respecto al control a 4 °C. Pero el tiempo adicional se reduciría si el alimento se expone a temperaturas superiores, como los 37 °C, especialmente con *Listeria monocytogenes*, que mostró una mayor recuperación en su población.

Aunque se sabe que el tratamiento térmico a 60 °C evita el crecimiento bacteriano [46], se podría llegar a niveles de densidad óptica comparables a estos resultados (Figuras 4D, 4H, 4L), utilizando concentraciones por encima de 20 µM BTM-P1 a temperaturas más bajas (4, 26 y 37 °C) y según la tendencia observada en la Figura 1. No se conocen aún los efectos adversos por consumir alimentos con BTM-P1, pero pruebas con el software ExPASy PeptideCutter tool [47] mostraron que el péptido se puede digerir con enzimas gástricas como pepsina y tripsina (Tabla 1). Esto está acorde con lo observado por Lemeshko y Orduz (2013) [48], que mostraron la sensibilidad de BTM-P1 ante proteasas naturales.

Tabla 1. Zonas de corte sobre el péptido BTM-P1* con algunas proteasas típicas, según ExPASy PeptideCutter tool

Nombre de la enzima	Número de cortes	Posiciones de los sitios de corte
Pepsina (pH1,3)	7	7, 11, 12, 17, 21, 23, 24
Pepsina (pH>2)	10	6, 7, 11, 12, 14, 15, 17, 21, 23, 24
Proteinasa K	17	1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 21, 22, 24
Tripsina	5	6, 14, 18, 23, 25

*Secuencia de aminoácidos del péptido BTM-P1:

10 20
VAPIAKYLAT ALAKWALKGG FAKLKS

La nisina es el péptido antimicrobiano aprobado para la preservación de los alimentos, pero posee algunas limitaciones que solo se pueden superar si es adicionado junto a quelantes [28], [29], o si el alimento es ácido [32] o precalentado [30]. De acuerdo con los resultados presentados en este estudio, el péptido BTM-P1 presenta ventajas frente a la nisina. BTM-P1 podría utilizarse tanto en ambientes ácidos como en neutros y en medios de temperatura ambiente y de refrigeración.

Finalmente, se ha mostrado que el péptido BTM-P1 posee actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*, en medios a diferentes condiciones fisicoquímicas. Determinar una relación entre la temperatura o el pH sobre la actividad de este péptido está fuera del alcance de este estudio. Se recomienda, para futuras investigaciones, identificar

los cambios estructurales de la molécula y analizar la interacción péptido-membrana en modelos simplificados como liposomas. También realizar pruebas de actividad antimicrobiana directamente en alimentos; es posible que BTM-P1 sea menos activo por proteasas presentes en el medio [48], [49], lo que implicaría utilizar mayores concentraciones del péptido [50]. El estudio de péptidos antimicrobianos como potenciales preservantes de alimentos es atractivo, e investigar sobre cómo aplicarlos y producirlos en masa es un desafío interesante dentro de la biotecnología.

Conclusiones

Este estudio proporciona la primera evaluación antimicrobiana del péptido BTM-P1 a diferentes condiciones fisicoquímicas, ofreciendo algunas bases para futuras investigaciones con diferentes

bacterias y pruebas de preservación de alimentos. El péptido BTM-P1 posee actividad antimicrobiana en cultivos de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*, después de estar previamente almacenado en medios de diferentes temperaturas y pH. No se encontraron diferencias entre los diversos tratamientos de temperatura y pH, aunque aparentemente, en un medio más ácido el péptido actuó mejor contra *Escherichia coli*; se desconoce la causa para lograr esta actividad mejorada. El péptido también mantiene actividad antimicrobiana en cultivos bacterianos incubados directamente con medios de distintas temperaturas y pH. Los ensayos realizados en este trabajo todavía son insuficientes para establecer una correlación entre el pH y la actividad antimicrobiana del péptido BTM-P1, debido a la complejidad de las membranas y a las diferencias existentes entre bacterias. Se propone, para futuros estudios, realizar ensayos de permeabilización en membranas artificiales como liposomas, bajo diferentes temperaturas, pH y fuerzas iónicas en el medio con péptido añadido.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo de la Dirección de Investigación e Innovación, de la Universidad CES, de Medellín (Colombia).

Referencias

- [1]. M.M. Aung y Y.S. Chang, "Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives", *Food Control*, vol. 39, pp. 172-184, 2014, doi: 10.1016/j.foodcont.2013.11.007
- [2]. G. El-Saber Batiha, D.E. Hussein, A.M. Algammal, T.T. George, P. Jeandet, A.E. Al-Snafi, A. Tiwari, J.P. Pagnossa, C.M. Lima, N.D. Thorat, M. Zahoor, M. El-Esawi, A. Dey, S. Alghamdi, H.F. Hetta y N. Cruz-Martins, "Application of natural antimicrobials in food preservation: recent views", *Food Control*, vol. 126, pp. 1080-66, 2021, doi: 10.1016/j.foodcont.2021.108066
- [3]. D.G. Newell, M. Koopmans, L. Verhoef, E. Duizer, A. Aidara-Kane, H. Sprong, M. Opsteegh, M. Langelaar, J. Threlfall, F. Scheutz, J. van der Giessen y H. Kruse, "Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge", *Int. J. Food. Microbiol.*, vol. 139, pp. S3-S15, 2010, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021
- [4]. I.A. Rather, W.Y. Koh, W.K. Paek y J. Lim, "The sources of chemical contaminants in food and their health implications", *Front. Pharmacol.*, vol. 8, pp. 830, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00830
- [5]. D.M. Tack, L. Ray, P.M. Griffin, P.R. Cieslak, J. Dunn, T. Rissman, R. Jervis, S. Lathrop, A. Muse, M. Duwell, K. Smith, M. Tobin-D'Angelo, D.J. Vugia, J. Zablotsky, B.J. Wolpert, R. Tauxe y D.C. Payne, "Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food - foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. Sites, 2016-2019", *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 69, no. 17, pp. 509-514, 2020, doi: 10.15585/mmwr.mm6917a1
- [6]. D.C. Love, E.M. Nussbaumer, J. Harding, J.A. Gephart, J.L. Anderson, F. Asche, J.S. Stoll, A.L. Thorne-Lyman y M.W. Bloem, "Risks shift along sea-food supply chains" *Glob. Food Sec.*, vol. 28, pp. 1004-76, 2021, doi: 10.1016/j.gfs.2020.100476
- [7]. A. J. St. Angelo J. Vercellotti, T. Jacks y M. Legendre, "Lipid oxidation in foods", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 36, no. 3, pp. 175-224, 1996, doi: 10.1080/10408399609527723
- [8]. R. Franco, G. Navarro y E. Martínez-Pinilla, "Antioxidants versus food antioxidant additives and food preservatives", *Antioxidants (Basel)*, vol. 8, no. 11, pp. 542, 2019, doi: 10.3390/antiox8110542
- [9]. C.N. Cutter, "Microbial control by packaging: a review", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 42, no. 2, pp. 151-161, 2002, doi: 10.1080/10408690290825493
- [10]. L. Gram, L. Ravn, M. Rasch, J.B. Bruhn, A.B. Christensen y M. Givskov, "Food spoilage--interactions between food spoilage bacteria". *Int. J. Food. Microbiol.*, vol. 78, no. 1-2, pp. 79-97, 2002, doi: 10.1016/s0168-1605(02)00233-7
- [11]. D. Dave y A.E. Ghaly, "Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review", *Am. J. Agric. Biol. Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 486-510, 2011, doi: 10.3844/ajabssp.2011.486.510
- [12]. B. Ramos, F.A. Miller, T.R.S. Brandão, P. Teixeira y C.L.M. Silva, "Fresh fruits and vegetables - an overview on applied methodologies to improve its quality and safety", *Innov. Food. Sci. Emerg. Technol.*, vol. 20, pp. 1-15, 2013, doi: 10.1016/j.ifset.2013.07.002
- [13]. N. Upadhyay, A. Goyal, A. Kumar, D. Lal Ghai y R. Singh, "Preservation of milk and milk products for analytical purposes", *Food Rev. Int.*, vol. 30, no. 3, pp. 203-224, 2014, doi: 10.1080/87559129.2014.913292
- [14]. M. Zarei, N. Basiri, A. Jamnejad y M.H. Eskandari, "Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria mo-*

- nocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef, buffalo and lamb using multiplex PCR”, *Jundishapur J. Microbiol.*, vol. 6, no. 8, pp. e7244, 2013, doi: 10.5812/jjm.7244
- [15]. R.E. Patiño-Burbano, A.K. Carrascal, J. L. Parra-Arango, J. L. Rodríguez-Bautista y J. C. Salcedo-Reyes, “Assessment of a multiplex detection method for *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in cow milk”, *Univ. Sci.*, vol. 24, no. 1, pp. 200-217, 2019, doi: 10.11144/javeriana.sc24-1.a0am
- [16]. E. Abebe, G. Gugsy y M. Ahmed, “Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens”, *J. Trop. Med.*, vol. 2020, ID. 4674235, 2020, doi: 10.1155/2020/4674235
- [17]. C. Kirchhelle, “Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017)”, *Palgrave Commun.*, vol. 4, no. 96, 2018, doi: 10.1057/s41599-018-0152-2
- [18]. J. Chen, G.G. Ying y W.J. Deng, “Antibiotic residues: extraction, analysis, and human health concerns”, *J. Agric. Food. Chem.*, vol. 67, no. 27, pp. 7569-7586, 2019, doi: 10.1021/acs.jafc.9b01334
- [19]. Vaishali, P. Jhanda, V.J. Jadhav y R. Gupta, “Bio-preservation of foods: a review”, *Eur. J. Nutr. Food. Saf.*, vol. 11, no. 4, pp. 164-174, 2019, doi: 10.9734/ejnf-2019/v11i430159
- [20]. M. Rai, R. Pandit, S. Gaikwad y G. Kövics, “Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food”, *J. Food Sci. Technol.*, vol. 53, no. 9, pp. 3381-3394, 2016, doi: 10.1007/s13197-016-2318-5
- [21]. E. Dell’Olmo, R. Gaglione, M. Sabbah, M. Schibeci, A. Cesaro, R. Di Girolamo, R. Porta y A. Arciello, “Host defense peptides identified in human apolipoprotein B as novel food biopreservatives and active coating components”, *Food Microbiol.*, vol. 99, pp.103-804, 2021, doi.org/10.1016/j.fm.2021.103804
- [22]. M.L. Heymich, S. Srirangan y M. Pischetsrieder, “Stability and activity of the antimicrobial peptide Leg1 in solution and on meat and its optimized generation from chickpea storage protein”, *Foods*, vol. 10, no. 6, pp. 1192, 2021, doi: 10.3390/foods10061192
- [23]. Y.L. Vishweshwaraiah, A. Acharya, V. Hegde y B. Prakash, “Rational design of hyperstable antibacterial peptides for food preservation”, *NPJ Sci. Food*, vol. 5, no. 1, pp. 26, 2021, doi:10.1038/s41538-021-00109-z
- [24]. A. Gharsallaoui, N. Oulahal, C. Joly y P. Degraeve, “Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses”, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 56, no. 8, pp. 1262-1274, 2016, doi: 10.1080/10408398.2013.763765
- [25]. K. Rayman, N. Malik y A. Hurst, “Failure of nisin to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in a model cured meat system”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 46, no. 6, pp. 1450-1452, 1983, doi: 10.1128/AEM.46.6.1450-1452.1983
- [26]. A. Sobrino-López y O. Martín-Belloso, “Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products”, *Int. Dairy J.*, vol. 18, pp. 329-343, 2008, doi: 10.1016/j.idairyj.2007.11.009
- [27]. M.L. Van Tassell, L.A. Ibarra-Sánchez, S.R. Takhar, S.L. Amaya-Llano y M.J. Miller, “Use of a miniature laboratory fresh cheese model for investigating antimicrobial activities” *J. Dairy Sci.*, vol. 98 (26454301), pp. 8515-8524, 2015, doi: 10.3168/jds.2015-9967
- [28]. C.N. Cutter y G.R. Siragusa, “Population reductions of gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions”, *J. Food. Prot.*, vol. 58, no. 9, pp. 977-983, 1995, doi: 10.4315/0362-028X-58.9.977
- [29]. J.K. Branen y P.M. Davidson, “Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin”, *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 90, no. 1, pp. 63-74, 2004, doi: 10.1016/s0168-1605(03)00172-7
- [30]. I.S. Boziaris, L. Humpheson y M.R. Adams, “Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4”, *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 43, no. 1-2, pp. 7-13, 1998, doi: 10.1016/s0168-1605(98)00083-x
- [31]. W. Liu y J.N. Hansen, “Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 56 (2119570), pp. 2551-2558, 1990.
- [32]. E.A. Davies, H.E. Bevis, R. Potter, J. Harris, G.C. Williams y J. Delves-Broughton, “Research note: The effect of pH on the stability of nisin solution during autoclaving”, *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 27, pp. 186-187, 1998, doi: 10.1046/j.1472-765X.1998.t01-1-00401.x
- [33]. V.V. Lemesko, M. Arias y S. Orduz, “Mitochondria permeabilization by a novel polycation peptide BTM-P1”, *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 16, pp. 15579-15586, 2005, doi: 10.1074/jbc.M414064200
- [34]. C. Segura, F. Guzmán, L.M. Salazar, M.E. Patarroyo, S. Orduz y V. Lemesko, “BTM-P1 polycationic peptide biological activity and 3D-dimensional structure”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 353, no. 4, pp. 908-914, 2007, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.113

- [35]. V.V. Lemesko, F. Guzmán, M.E. Patarroyo, C. Segura y S. Orduz, "Synthetic peptide having an ionophoric and antimicrobial activity". *U.S. Patent No.* 7.041.647, 2005.
- [36]. V.V. Lemesko, "Permeabilization of mitochondria and red blood cells by polycationic peptides BTM-P1 and retro-BTM-P1", *Peptides*, vol. 32, no. 10, pp. 2010-2020, 2011, doi: 10.1016/j.peptides.2011.08.023
- [37]. J.M. Andrews, "Determination of minimum inhibitory concentrations", *J. Antimicrob. Chemother.* vol. 48, no. 1, pp. 5-16, 2001, doi:10.1093/jac/48.suppl_1.5
- [38]. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically", approved standard-ninth edition, M07-A9, vol. 32, no. 2, pp. 18-20, 2012.
- [39]. J.M. Shin, I. Ateia, J.R. Paulus, H. Liu, J.C. Fenno, A.H. Rickard y Y.L. Kapila, "Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells", *Front. Microbiol.*, vol. 6, pp. 617, 2015, doi: 10.3389/fmicb.2015.00617
- [40]. A.P. Schellinger y P.W. Carr, "Solubility of Buffers in Aqueous-Organic Eluents for Reversed-Phase Liquid Chromatography", *LGC North America*, vol. 22, no. 6, pp. 544-548, 2004.
- [41]. N. Malanovic y K. Lohner, "Gram-positive bacterial cell envelopes: the impact on the activity of antimicrobial peptides", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1858, no. 5, pp. 936-946, 2016, doi: 10.1016/j.bbamem.2015.11.004
- [42]. G. Bhardwaj, V. Khipple, C.D. Bahl, J.M. Gilmore, P.J. Harvey, O. Cheneval, G.W. Buchko, S.V.S.R.K. Pulavarti, Q. Kaas, A. Eletsy, P.S. Huang, W.A. Johnsen, P.J. Greisen, G.J. Rocklin, Y. Song, T.W. Linsky, A. Watkins, S.A. Rettie, X. Xu, L.P. Carter, R. Bonneau, J.M. Olson, E. Coutsiyas, C.E. Correnti, T. Szyperski, D.J. Craik y D. Baker, "Accurate *de novo* design of hyperstable constrained peptides", *Nature*, vol. 538, pp. 329-335, 2016, doi: 10.1038/nature19791
- [43]. D. Bogahawaththa, J. Chandrapalaab y T. Vasiljevic, "Thermal denaturation of bovine immunoglobulin G and its association with other whey proteins". *Food Hydrocoll.*, vol. 72, pp. 350-357, 2017, doi: 10.1016/j.foodhyd.2017.06.017
- [44]. A. Bañares-Hidalgo, J. Pérez-Gil y P. Estrada, "Acidic pH triggers conformational changes at the NH₂-terminal propeptide of the precursor of pulmonary surfactant protein B to form a coiled coil structure", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1838, no. 7, pp. 1738-1751, 2014, doi: 10.1016/j.bbamem.2014.03.016
- [45]. V. Cabra, R. Arreguin, R. Vásquez-Duhalt y A. Farres, "Effect of temperature and pH on the secondary structure and processes of oligomerization of 19 kDa alpha-zein", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1764, no. 6, pp. 1110-1118, 2006, doi: 10.1016/j.bbapap.2006.04.002
- [46]. J. Membre, B. Leporq, M. Vialette, E. Mettler, L. Perrier, D. Thuault y M. Zwietering, "Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food". *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 100, no. 1-3, pp. 179-186, 2005, doi: https://doi.org/10.1016/j.ijfood-micro.2004.10.015
- [47]. E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel y A. Bairoch, "Protein identification and analysis tools on the ExpASY Server", (In) *John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 2005.
- [48]. V.V. Lemesko y S. Orduz, "Electrical hypothesis of toxicity of the Cry toxins for mosquito larvae", *Biosci Rep.*, vol. 33, no. 1, pp. 125-136, 2013, doi: 10.1042/BSR20120101
- [49]. H.M. Werner, C.C. Cabalteja y W.S. Horne, "Peptide backbone composition and protease susceptibility: impact of modification type, position, and tandem substitution", *Chembiochem.*, vol. 17, no. 8, pp. 712-718, 2016, doi: 10.1002/cbic.201500312
- [50]. R. Rink, A. Arkema-Meter, I. Baudoin, E. Post, A. Kuipers, S.A. Nelemans, M. Haas Jimoh y G.N. Moll, "To protect peptide pharmaceuticals against peptidases", *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 61, no. 2, pp. 210-218, 2010, doi: 10.1016/j.vascn.2010.02.010

