



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA DE LA TUBA GUERRERENSE DE *COCOS nucifera L.*

Cuauhtémoc Pineda^{1*}, Itzel Rodríguez¹, Daysi Navez¹, Aydee Román¹, Brian Cárdenas¹,
Fernando Astudillo², Gerardo Huerta¹

Laboratorio de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo,
México, 2 Programa de Biología de Sistemas y Biología Sintética, Centro de Ciencias Genómicas,
Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.

cuauhtemoc.pineda@hotmail.com

Resumen

La Tuba es una bebida fermentada obtenida de la palma de coco. En México se produce en Colima, Michoacán y Guerrero. Su consumo se relaciona con el buen funcionamiento del organismo debido a su composición (azúcares, aminoácidos y minerales), microbioma (bacterias ácido lácticas y ácido acéticas) y propiedades antioxidante y antibacteriana. El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad antioxidante y antibacteriana de los sobrenadantes producidos por bacterias aisladas de la Tuba Guerrerense. Se fermentó Tuba comercial y tradicional en dos matraces, 100 mL de medio Tuba a temperatura ambiente y 35 h con agitación constante. Se aislaron cepas mediante difusión de placa en agar Tuba a 30°C por 24 h. Del comercial se aislaron 16 cepas Gram negativas. Al sobrenadante se evaluó la actividad antioxidante mediante los ensayos DPPH, ABTS y cromatografía de capa. De la Tuba tradicional, se aislaron 45 cepas, 86% Gram negativas. A partir del sobrenadante se evaluó la actividad antibacteriana. El 31.3% de las cepas aisladas de Tuba comercial presentaron actividad antioxidante. Mientras que de la Tuba tradicional los porcentajes de cepas con actividad antibacteriana fueron: el 73.3% para *Enterococcus faecalis*, 44.4% para *Escherichia coli* ATCC 25922, 48.8% para *Pseudomonas Aeruginosa* y 8.8% para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 9 cepas inhibieron a tres cepas de interés clínico. Se estableció un medio cultivo a base de Tuba para promover el crecimiento de la diversidad de bacterias. Las bacterias aisladas de la Tuba presentaron inhibición a bacterias de interés clínico.

Palabras clave: Tuba, Antioxidante, Antibacterial, Bacterias ácido acéticas, Bacterias ácido lácticas

Abstract

Tuba is a fermented drink obtained from coconut palm. In Mexico it is produced in Colima, Michoacán and Guerrero. Its consumption is related to the proper functioning of the organism due to its composition, sugars, amino acids and minerals among others. Microbiome; lactic acid bacteria and acetic acid. And activity; antioxidant and antibacterial. The objective of this study was to evaluate the antioxidant and antibacterial capacity of the supernatants produced by bacteria isolated from the Guerrerense's Tuba. Tuba commercial and traditional was fermented in two flasks, 100 mL of medium, room temperature and 35 h with constant stirring. Strains were isolated by plaque diffusion on Tuba agar at 30 ° C for 24 h. From the comercial Tuba, 16 Gram-negative strains were isolated. The supernatant was evaluated for antioxidant activity by DPPH, ABTS and layer chromatography assays. From the traditional Tuba, 45 strains were isolated, 86% Gram negative. From the supernatant,



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



antibacterial activity was evaluated. 31.3% of the commercial Tuba strains isolates showed antioxidant activity. While, of the traditional Tuba, the percentages of strains with antibacterial activity were: 73.3% for *Enterococcus faecalis*, 44.4% for *Escherichia coli* ATCC 25922, 48.8% for *Pseudomonas Aeruginosa* and 8.8% for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 9 strains inhibited three strains of clinical interest. A Tuba-based culture medium was established to promote the growth of bacterial diversity. The bacteria isolated from the Tuba presented inhibition to bacteria of clinical interest.

Key words: Tuba, Antioxidant, Antibacterial, Acetic acid bacteria, Lactic acid bacteria

Introducción

La palma de coco (*Cocos nucifera* L.) es una especie de palmera de la familia *Arecaceae* nativa de Asia. Presenta una estructura monocotiledónea de tipo maderable, su altura es de hasta 30 m en su etapa adulta (Olher, 1999). La inflorescencia es interfoliar de ramificación simple; las flores normalmente se encuentran en grupos de tres y su fruto es una semilla de gran tamaño (Guevara y Jáuregi, 2008). De la savia de las inflorescencias se obtienen diferentes productos como jarabes de azúcares, que algunas veces se hacen fermentar para producir una bebida fermentada (Rogelio, 2006). La fermentación se lleva a cabo por un conjunto de reacciones químicas a partir de carbohidratos y ciertos microorganismos, principalmente bacterias y levaduras (Galvis, 2009). En la fermentación alcohólica, los monosacáridos y disacáridos son transformados en etanol y dióxido de carbono con la regeneración del cofactor NAD⁺ (Nielsen et al., 2003).

La Tuba

La Tuba es una bebida fermentada proveniente de las Filipinas, fue introducida por primera vez en México

por los españoles en la costa del pacífico, actualmente se produce en los estados de Colima, Michoacán y Guerrero. Esta bebida se produce mediante un proceso de fermentación natural de la savia de la palma, puede ser de la inflorescencia, del tallo o del exudado del fruto de la palma (Chandrasekhar et al., 2012). Su color pardo a blanquecino es debido al desarrollo de microorganismos, los cuales desencadenan la fermentación después de 5 h de ser cosechada (Pérez et al., 2016).

Para la elaboración de la Tuba, la inflorescencia de la palmera deberá estar cubierta por la espata, posterior a ello se realiza un doblé y se sujeta firmemente con un lazo para que tenga el menor movimiento posible; se procede a realizar una incisión colocando un recipiente limpio debajo, tras esto, la savia se va colectando en el recipiente. Esta savia es recuperada dos veces al día, por la mañana y al atardecer (Granados y López, 2002). La savia puede ser consumida recién colectada o después de su fermentación. Los consumidores de esta bebida la toman por su sabor y porque culturalmente se asocia a una bebida de valor nutricional que contribuye a resolver problemas gastrointestinales y parasitarios



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

(Brambila, 2006). Asimismo, este derivado ayuda al buen funcionamiento del organismo ya que contiene azúcares, minerales, aminoácidos, vitamina C y fósforo, esta característica benéfica para la salud humana se ha atribuido a la probable actividad antibacteriana y antioxidante del endocarpio del fruto (Cortázar et al., 2010).

Actividad antioxidante

Actualmente diversas enfermedades se asocian con un exceso de radicales libres con los que estamos en contacto en el ambiente, debido a que estos desestabilizan el funcionamiento del metabolismo; como el tabaquismo, el alcoholismo y la contaminación atmosférica (Ansari, 1996). Los radicales libres (RL) actúan como aceptores finales de electrones dentro del metabolismo celular, lo que permite la producción de energía. Sin embargo, a altas concentraciones causan efectos indeseables a la célula, provocan reacción en cadena que desestabilizan las rutas metabólicas funcionales (Urbina-Bonilla, 2008). Los RL se encuentran presentes tanto en las células de un organismo como en el ambiente y con el tiempo, estos oxidan todos los compuestos biológicos por medio de sus metabolitos reactivos. Causan la oxidación y peroxidación de lípidos, la desnaturalización de proteínas y la despolimerización de polisacáridos. También alteran el ADN, rompen las membranas celulares, inactivan enzimas, interfieren con la inmunogenicidad y provocan carcinogénesis (Ansari, 1996). Los antioxidantes funcionan como estabilizadores de los radicales libres, además estas

moléculas inhiben la peroxidación de los lípidos (Khasraf et al., 2003). Forman parte de los alimentos que se consumen diariamente, previenen los efectos adversos causados por especies reactivas sobre las funciones fisiológicas humanas. Las propiedades antioxidantes no solo se estudian por sus interacciones químico-biológicas sino por su función para prevenir el deterioro oxidativo que afecta a los componentes celulares (Urbina-Bonilla, 2008; Serrano et al., 2006). Los análisis metagenómicos y bioinformático de la Tuba han demostrado que en esta existen microorganismos relacionados con la síntesis de vitaminas, terpenoides y compuestos fenólicos que pueden contribuir con la capacidad antioxidante de la Tuba (Astudillo-Melgar et al., 2019). Existen varios ensayos de actividad antioxidante rápidos y consistentes, sin embargo, cada uno de ellos presenta sus ventajas y desventajas, No hay un único método que defina totalmente la eficacia antioxidante de un compuesto, mezcla o alimento, por lo cual se recomienda el uso de más de un método para determinar la capacidad antioxidante de una muestra en lugar de un enfoque unidimensional. Los métodos más comunes y fiables son los ensayos de DPPH y ABTS; éstos han sido modificados y mejorados en los últimos años (Krishnaiah et al., 2011).

Actividad antimicrobiana

La pared celular protege la integridad anatomofisiológica de la bacteria y soporta su gran presión osmótica interna (mayor en las bacterias Gram positivas). La ausencia de esta estructura



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



condicionaría la destrucción del microorganismo, inducida por el elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano. Los antibióticos pueden inhibir la síntesis de la pared celular, su mecanismo de acción se realiza cuando la bacteria está en crecimiento activo, y para su acción bactericida requieren que el medio en que se encuentre la bacteria sea isotónico o hipotónico, lo que favorece el rompimiento celular cuando la pared celular se pierde o se desestructura. Suelen ser más activos sobre las bacterias Gram positivas por su mayor riqueza en peptidoglucano. En general, son poco tóxicos por actuar selectivamente en una estructura que no está presente en las células humanas. La síntesis de la pared celular se desarrolla en 3 etapas, sobre cada una de las cuales pueden actuar diferentes compuestos: la etapa citoplásmica, donde se sintetizan los precursores del peptidoglucano; el transporte a través de la membrana citoplásmica, y la organización final de la estructura del peptidoglucano, que se desarrolla en la parte más externa de la pared (Calvo y Martínez, 2009).

Microorganismos con actividad antibacteriana

Existen microorganismos que han tomado un papel muy importante en los alimentos por su considerable contribución al valor agregado que dan a un producto, gracias a las propiedades metabólicas que poseen. Un ejemplo de ello, son las bacterias ácido lácticas que desempeñan un papel importante en la industria alimentaria. Este grupo está compuesto de un gran número de géneros incluyendo *Lactococcus*,

Lactobacillus, *Enterococcus*, *Leuconostoc* entre otras. Entre sus funciones destacan, la formación de sabor ácido, formación de aroma, gelificación de la leche y la inhibición de organismos patógenos. Se han encontrado presencia de bacteriocinas, que son sustancias antimicrobianas, estas pueden ser sintetizadas por varios microorganismos, pero las que son sintetizadas por bacterias ácido lácticas tiene un gran potencial para ser utilizadas como bioconservadores (Parra-Huertas, 2010). Cepas como *Enterococcus malodoratus* y *E. mundtii* fueron aisladas de bebidas fermentadas típicas de México, como tepache y pulque, donde se encontró presencia de bacteriocinas, su actividad fue ensayada contra diversas cepas patógenas como *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*. Se obtuvieron pruebas positivas para la inhibición de las cepas patógenas, teniendo mejor resultados contra *Klebsiella pneumoniae* (Pérez-Villanueva et al., 2016). Por otra parte, las bacterias ácido lácticas pueden producir componentes inhibitorios de otros microorganismos, dentro de los que se pueden encontrar patógenos y de descomposición (Olvera-García et al., 2015). Los extractos de la fibra de la cáscara de *Cocos nucifera L.* han sido utilizados en la medicina tradicional en el noreste de Brasil para el tratamiento de la diarrea y la artritis. Las fracciones de dichos extractos han mostrado actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Esquenazi et al., 2002). En estudios realizados con extracto alcohólico de cascara de *Cocos nucifera* se



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



demonstró actividad antibacteriana contra patógenos orales comunes como bacterias cariogénicas (Maji et al., 2014). En un estudio reciente sobre la diversidad bacteriana y la dinámica de población durante la fermentación de la Tuba se reportó que los géneros de bacterias que más predominan en esta bebida en el tiempo 35 h fueron *Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Gluconacetobacter*, *Sphingomonas*, *Vibrio* y algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. La dinámica de la población tuvo una tendencia similar en Tuba fermentada en condiciones controladas pero con un porcentaje diferente en las abundancias de OTU (Unidad Taxonómica Operativa); se observó una disminución del género *Vibrio* y un aumento de las bacterias del género ácido láctico (BAL), las bacterias del género ácido acético (BAA) y algunas proteobacterias como *Sphingomonas* a lo largo del tiempo de fermentación. Para comprender la funcionalidad de la comunidad bacteriana en la fermentación de Tuba, se utilizó el software PICRUST para predecir los perfiles metagenómicos de las muestras. Se obtuvieron características funcionales de los 3 niveles de KEGG (Nivel 1: funciones celulares generales, Nivel 2: Funciones específicas, es decir, metabolismo de carbohidratos, y Nivel 3: Vía asociada con una función específica). Para analizar genes específicos relacionados con funciones de relevancia biotecnológica. Teniendo en cuenta las 328 funciones registradas en KEGG. Se encontró que las 19 funciones más abundantes se asociaron con el metabolismo de carbohidratos, vitaminas,

aminoácidos, antibióticos y biosíntesis de moléculas antioxidantes (Astudillo-Melgar et al., 2019)

En la fermentación de la Tuba se han encontrado altos niveles de bacterias ácido lácticas (BAL) y bacterias ácido acéticas (BAA). Un importante atributo de las BAL es su capacidad de producir compuestos antimicrobianos denominados bacteriocinas de origen proteico producidos por síntesis ribosomal. Las bacteriocinas tienen un amplio espectro de actividad, mecanismos de acción, pesos moleculares, y propiedades fisicoquímicas (Pérez-Villanueva et al., 2016). Dependiendo de la región, las bebidas alcohólicas tradicionales preparadas a partir de jugo de palma, se les conoce como “vino de palma” son conocidas por varios nombres, los microorganismos responsables de este tipo de fermentación son *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Acetobacter aceti* (Tamang et al., 2016). El descubrimiento del genoma de microorganismos cultivables y no cultivables procedentes de alimentos fermentados naturalmente, permite la identificación de diversos grupos bacterianos funcionales de interés biotecnológico mediante la expresión del ARNm en un sustrato particular además de la detección del nivel de ADN (Díaz y Wachter. 2003).

Actualmente, diversos países reconocen la importancia del potencial genético de cepas obtenidas a partir de las fermentaciones de alimentos y bebidas tradicionales, sin embargo, muchas de ellas siguen desconocidas. En México la investigación acerca del potencial genético de la Tuba aún es escaso, por lo



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

que conocer más acerca de estas cepas es un elemento crucial para la preservación del patrimonio cultural. En el presente estudio se aislaron bacterias presentes durante la fermentación de la Tuba comercial y tradicional para evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de los metabolitos producidos.

Metodología

Obtención de la Tuba y preparación de medio Tuba

Se recolectaron muestras de Tuba de palma de *Cocos nucifera L.* del municipio de Acapulco, Guerrero, México. Una muestra de Tuba Tradicional de 1.5 L y una muestra de Tuba comercial de 2 L. La Tuba tradicional se obtuvo de la localidad de Poza Zanja en abril del 2018. Ambas muestras fueron transportadas y almacenadas en recipientes previamente esterilizados a 4°C hasta su uso. Se diseñó y probó un nuevo medio denominado “medio Tuba” para el aislamiento de cepas de Tuba, éste se preparó diluyendo la tuba en agua estéril en una relación 1:10 y se agregó agar estéril hasta alcanzar una concentración de 15 g/L en placas de Petri.

Métodos analíticos

La concentración de azúcares reductores de la Tuba comercial y tradicional se evaluaron mediante el método DNS (Abdel et al., 2018) y la concentración de proteína se evaluó mediante el método de Bradford (Javeed et al., 2023). En el caso de la Tuba tradicional se realizaron las evaluaciones a 4 tratamientos

diferentes: Tuba estéril, Tuba estéril diluida (1:10), Tuba sin esterilizar y Tuba sin esterilizar diluida (1:10).

Fermentación de la Tuba

Se colocaron 100 mL de Tuba tradicional en un matraz Erlenmeyer por triplicado y se almacenaron muestras a las 12 h, 24 h y 35 h de fermentación en crioviales con glicerol a -70°C. El resto de la solución se centrifugó a 8000 rpm por 10 min para separar al sobrenadante de las células. El sobrenadante se utilizó para los ensayos de antagonismo. Por otro lado, se fermentó 100 mL de Tuba comercial en un matraz Erlenmeyer por duplicado durante 24 h y 35 h a 30 °C y 100 rpm. A cada matraz se muestreó 800 µL a las 24 h y 35 h y se almacenaron en crioviales con glicerol al 80% a -70°C por triplicado para conservar la diversidad bacteriana de la Tuba. El sobrenadante se utilizó para evaluar la actividad antioxidante.

Aislamiento y caracterización de microorganismos de la Tuba

Se aislaron los microorganismos de la tuba tradicional a las 35 h de fermentación y los de tuba comercial a las 24 h y 35 h. Los crioviales se descongelaron lentamente y homogenizaron, de cada uno se tomó una muestra de 100 µL de Tuba y se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 10 a 10⁻⁵ para la Tuba tradicional y comercial respectivamente. Se incubó la Tuba tradicional a 30°C x 12 h en el medio Tuba, y la Tuba comercial a 30°C x 24 h en el medio Tuba y medio tuba con ketoconazol (2 µg/mL). Posteriormente se agregó 1 mL de agua destilada con



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



la finalidad de separar a los microorganismos de diferentes morfologías. Posteriormente se hizo una resiembra en cajas Petri con medio Tuba a 30°C x 24 h. Los microorganismos aislados de la Tuba Tradicional se utilizaron para la evaluación de la actividad antimicrobiana y los de la Tuba comercial para la actividad antioxidante. Las características microscópicas y macroscópicas de las cepas aisladas se determinaron mediante tinción Gram (Aquiahuatl y Pérez, 2004).

Cepas patógenas

Se seleccionaron a los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* como microorganismos patógenos para evaluar la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas. Las cepas patógenas fueron provienen del cepario de la Universidad Autónoma de Guerrero, estas se recuperaron en diferentes medios de cultivo: agar bilis esculina con azida, agar MacConkey, agar cetrimida y agar TSA.

Determinación de la actividad antibacteriana

Se evaluó la actividad antibacteriana de la Tuba fermentada con 24 h y 35 h mediante ensayos de susceptibilidad de bacterias patógenas, colocando una asada de los cultivos patógenos en 3 mL de medio LB en caldo, se incubó durante 18 h a 35 °C, para obtener una concentración bacteriana correspondiente al estándar 0.5 de MacFarland ajustado a una densidad óptica de 600 nm de acuerdo

al CLSI. Después se colocó el sobrenadante obtenido de la Tuba fermentada a 24 h y 35 h. Se utilizaron 40 µL de sobrenadante en discos de papel y 80 µL en un pocillo hecho previamente en el agar, como control positivo se utilizó cloro (4.0-6.0%). Las cajas se incubaron 24 h a 37°C para posteriormente analizar los halos de inhibición formados.

Evaluación de actividad antioxidante de la Tuba comercial

La actividad antioxidante se determinó mediante ensayos DPPH, ABTS y cromatografía en capa fina (CCF) a partir de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos aislados de la Tuba comercial. Primero se cultivaron las cepas en 10 mL de medio Tuba líquido a 30 °C durante 24 h, posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min para recuperar los sobrenadantes. Inicialmente se evaluó por CCF de manera cualitativa, para ello se colocaron 3 mL de sobrenadante con ácido ascórbico (1 g/L) en láminas de sílice y se sumergieron en DPPH. Como control se utilizó Tuba comercial estéril. Posteriormente sobre una placa de gel sílice de 5 cm de espesor se colocaron 5 µL de sobrenadante a intervalos de 1 µL en el centro de la placa dejando 1 cm de espacio entre cada muestra y la placa, posteriormente se cubrió con DPPH y se observó la presencia o ausencia de halos. Para los ensayos de actividad antioxidante (DPPH y ABTS) se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes recuperados 1:10, 1:100 y 1:1000. Se utilizaron placas de 96 pozos y se colocaron 50 µL de la muestra total y 50 µL de sus diluciones por triplicado



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



en cada placa. Se utilizó Tuba comercial estéril como control negativo y ácido ascórbico como control positivo. Posteriormente se agregaron 150 μ L de DPPH a cada muestra en una placa y 150 μ L de ABTS en una placa diferente, ambas placas fueron incubadas durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Al término de la incubación, cada placa se introdujo a un fotómetro de microplacas de 96 pozos para medir su longitud de onda (λ), se determinó una $\lambda = 545$ nm y 735 nm para el DPPH y el ABTS, respectivamente.

Resultados y Discusión

Caracterización del sustrato

Se caracterizó el contenido de azúcares reductores, proteínas y pH de la Tuba tradicional y de la Tuba comercial. así como de los medios de cultivo elaborados a partir de las dos muestras de Tuba (Tabla 1). El pH de todas las muestras fue de 5.0, únicamente la Tuba tradicional presentó un pH más ácido de 4.0. La concentración de proteína en todos los casos fue menor a 1 g/L, mientras que la concentración de azúcares fue superior en la Tuba comercial en comparación con la Tuba tradicional, sin embargo, ambas presentan valores muy cercanos a 50 g/L cuando la Tuba tradicional se esteriliza. Los medios de cultivo de cada Tuba se utilizaron para aislar microorganismos, así como para determinar las condiciones de crecimiento, consumo de azúcares y producción de metabolitos.

Tabla 1. Caracterización de Tuba comercial y tradicional.

Muestra	Azúcares (g/L)	Proteínas (g/L)	pH
Tuba tradicional	35.90	0.23	4.0
Tuba tradicional estéril	50.60	0.40	5.0
Medio Tuba (tradicional)	5.15	0.04	5.0
Tuba comercial	51.30	0.60	5.0
Medio Tuba (comercial)	6.30	0.05	5.0

Aislamiento de microorganismos de la Tuba tradicional y comercial

Se realizaron diluciones seriadas de 10^0 a 10^{-5} de la muestra de Tuba comercial y de la tradicional a las 35 h de fermentación. Posteriormente se plaquearon 100 μ L de la dilución en los medios Tuba respectivos con ketoconazol (2 ppm) para evitar el crecimiento de hongos. Se obtuvo una población bacteriana de $9.8 \times$

10^6 UFC/mL de las cuales se aislaron 98 colonias con características morfológicas distintas para la Tuba comercial y una población de 4×10^5 UFC/mL de la Tuba tradicional de las cuales se aislaron y seleccionaron 45 cepas diferentes (9 Gram + y 39 Gram -) (Tabla 2). La mayoría de las cepas caracterizadas son de tipo cocos y Gram negativas, estos resultados son opuestos a los reportados por

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Salgado et al., (2016), donde aislaron de Tuba fermentada principalmente Gram + (60%). La diferencia de resultados puede deberse al tiempo de cosecha de las cepas ya que *Salgado et al.*, (2016)

aislaron cepas de Tuba fermentada por apenas 12 h y 24 h, un tiempo mucho menor a realizado en este estudio de 35 h, en una fermentación principalmente de tipo acética.

Tabla 2. Caracterización morfológica de las bacterias aisladas de la Tuba comercial y la Tuba tradicional

Característica		Comercial	Tradicional
		(%)	
Morfología	Cocos	87.5	100
	Cocobacilos	12.5	0
Tinción	Gram-	100	100
Forma	Circular	68.75	56
	Puntiforme	5.25	44
	Irregular	25	0
Elevación	Convexa	87.5	0
	planoconvexa	12.5	100
Margen	Entero	100	100
Color	Blanco	31.3	100
	Beige	25	0
	Amarillo	37.5	0
	Naranja	6.2	0
Superficie	Lisa	100	100
Consistencia	Suave	100	100
Producción de CO ₂	Negativo	100	ND
Aspecto	Húmedo	ND	100

Análisis cualitativo y cuantitativo de la actividad antioxidante de la Tuba comercial

La actividad antioxidante se observó por la presencia de pequeños halos de inhibición con los extractos de las cepas CAB02, CAB04, CAB05, CAB08, CAB10, CAB12, CAB14, CAB16, tomando como referencia los controles positivos: P1 (Tuba palmera 1), P2 (Tuba

palmera 2), TSE (Tuba sin esterilizar), TSE N (Tuba sin esterilizar nueva), AC ASC (ácido ascórbico). Por medio de CCF se determinó que 7 cepas presentaron actividad antioxidante, mientras que los ensayos de ABTS y DPPH permitieron identificar a 4 y 16. Se realizaron los ensayos de CCF, ABTS y DPPH para determinar actividad antioxidante de las cepas

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023



aisladas de la Tuba comercial, el ensayo con mayor sensibilidad fue DPPH, debido a que permitió identificar actividad antioxidante en 16 cepas, mientras que con ABTS y CCF coincidió la actividad antioxidante en sólo 4 y 7 cepas respectivamente. De acuerdo al ensayo por DPPH, las cepas con mayor actividad antioxidante fueron CAB06, CAB13 y CAB10 con un porcentaje de inhibición mayor al 18%, mientras que por medio del ensayo con ABTS, sólo CAB08 y CAB16 mostraron porcentajes de inhibición mayores al 17%. De los anteriores todos mostraron actividad antioxidante mediante CCF con excepción de CAB06 y CAB13. Para identificar de manera global a las cepas que presentaron mejores resultados con las tres técnicas de evaluación de actividad antioxidante se evaluó un promedio ponderado de los resultados en las tres evaluaciones con las 16 cepas que mostraron actividad de acuerdo a la ec.1

$$\varphi = \left(CCF_x + \frac{ABTS_x}{ABTS_{Max}} + \frac{DPPH_x}{DPPH_{Max}} \right) \div 3$$

Donde CCF_x es la actividad antioxidante de la cepa x medida por CCF, $ABTS_x$ es la actividad antioxidante de la cepa x evaluada por el ensayo ABTS, $ABTS_{Max}$ es la actividad antioxidante máxima de las 16 cepas evaluadas, $DPPH_x$ es la actividad de la cepa x por el ensayo DPPH y $DPPH_{Max}$ es la actividad antioxidante máxima de las 16 cepas evaluadas. Las tres cepas con mejores resultados por las tres técnicas para la evaluación de actividad antioxidante fueron CAB16, CAB08 y CAB05.

Las diferencias entre los resultados con los ensayos DPPH y ABTS pueden deberse a la diferencia de los metabolitos producidos por las cepas, la interacción cruzada extracto-radical (Prior et al., 2005), a la sensibilidad y selectividad del método dado que el radical ABTS es catiónico mientras que el radical DPPH es neutro (Sánchez-Moreno, 2002; Schlesier et al., 2002).

La actividad antioxidante identificada puede deberse a la presencia de bacterias productoras de vitaminas, antibióticos y antioxidantes. Astudillo et al., (2019), identificó bacterias con estas características, identificadas como *Leuconostoc*, *Gluconacetobacter*, *Sphingomonas*, *Vibrio* y principalmente *Fructobacillus*, en muestras de Tuba comercial mediante un estudio bioinformático. De los metabolitos bacterianos con mayor capacidad para depurar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno son los terpenos y los carotenoides, como la enzima 15-cis-fitoeno sintetasa junto con los tocoferoles, ácido ascórbico, flavonoides, antocianinas y ácidos fenólicos (Carranco et al., 2011). Otro metabolito con capacidad antioxidante producido por bacterias son los pigmentos, estos compuestos presentan diversas aplicaciones con valor agregado como los colorantes sintéticos (Liu y Nizet, 2009). Asker et al., (2007) obtuvieron un pigmento amarillo de *Sphingomonas TDMA-16* y reportaron actividad antioxidante del mismo. En el presente estudio se observaron pigmentos amarillos y naranjas en las bacterias CAB16, CAB13, CAB05, CAB06 y CAB08, lo

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

cual indica un potencial uso de estos compuestos como antimicrobianos y antioxidantes.

Tabla 3. Actividad antioxidante de las cepas asiladas de la Tuba comercial

Cepa	Capa fina	DPPH (%)	ABTS (%)	Φ
CAB16	1.0	17.4	17.0	88.3
CAB08	1.0	12.5	18.6	84.2
CAB05	1.0	17.1	6.1	68.3
CAB10	1.0	18.1	0.0	58.8
CAB02	1.0	17.1	0.0	57.4
CAB14	1.0	15.6	0.0	55.3
CAB12	1.0	15.3	0.0	54.9
CAB04	1.0	9.3	2.3	50.5
control +	1.0	1.9	2.2	39.9
CAB06	0.0	23.7	0.0	33.3
Control -	1.0	0.0	0.0	33.3
CAB13	0.0	19.3	0.0	27.1
CAB09	0.0	16.8	0.0	23.6
CAB01	0.0	16.5	0.0	23.2
CAB11	0.0	16.5	0.0	23.2
CAB03	0.0	15.6	0.0	21.9
CAB07	0.0	15.6	0.0	21.9
CAB15	0.0	15.0	0.0	21.1

Actividad antibacteriana de sobrenadantes de Tuba tradicional

Se realizaron ensayos de antagonismo contra cuatro cepas de interés clínico; *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 con

sobrenadantes de Tuba fermentada (35 h). Se determinó que el sobrenadante de la Tuba fermentada inhibió el crecimiento bacteriano de las 4 cepas patógenas. Los halos de inhibición más grandes se observaron en *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, (**Fig 1**) con tamaños de los halos ≥ 10 mm y 15 mm con muestras

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

de 40 μ L y 80 μ L de sobrenadante de Tuba fermentada respectivamente. Mientras que con *S. aureus* y *E. coli* sólo se observaron inhibiciones al usar 80 μ L y 40 μ L de sobrenadante de Tuba respectivamente, en ambos casos los halos no superaron los 10 mm de tamaño. De las 40 cepas aisladas de la Tuba tradicional, el 82.5% fue capaz de inhibir en algún grado el crecimiento de *E. faecalis*, seguido con un 55% y 50% de inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa* y *E. coli*, respectivamente. *S. aureus* fue el patógeno que mayor resistencia presentó a la actividad antibacteriana de la Tuba tradicional ya que sólo el 10% de las cepas logró inhibir su crecimiento. Se identificó a 9 cepas capaces de inhibir de manera individual el crecimiento de 3 cepas patógenas (**Fig 2**). La actividad antibacteriana observada puede deberse a la producción de bacteriocinas. Las bacteriocinas son sustancias que inhiben el crecimiento de diferentes bacterias debido a que son capaces de formar poros en la membrana celular de las bacterias, lo que promueve efectos de apoptosis, otros mecanismos reportados son la

inhibición de la síntesis de la pared celular, de la síntesis de proteínas y del metabolismo bacteriano. Las bacteriocinas son compuestos son estables a diferentes niveles de pH y temperatura (Heredia et al., 2015). Heredia et al., (2017) reportaron que las bacteriocinas nisina y pediocina son capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus* en alimentos. Pérez et al., (2016) reportaron los mismos efectos de las bacteriocinas enterocina y nisina contra cepas de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes* y *E. coli*. De la Fuente et al., (2015), ha reportado la presencia de estos metabolitos en extractos de Tuba fermentada. Otros compuestos que pueden ser responsables de la actividad antibacteriana son la producción de enzimas, estas intervienen en diversos procesos biológicos tales como la digestión, el recambio de proteínas y la defensa contra bacterias patógenas (Runeberg-Roos et al., 1998).

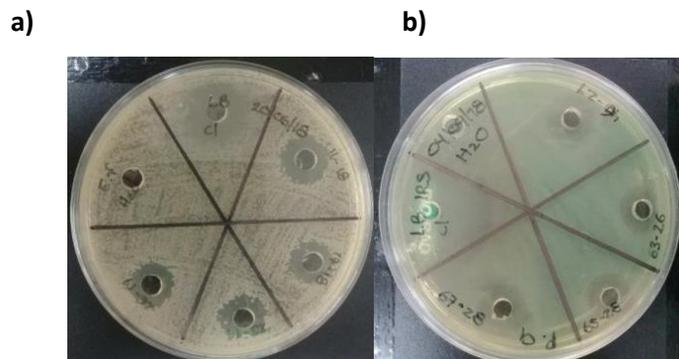


Fig 1. Halos de inhibición de crecimiento para a) *E. faecalis* y b) *P. aeruginosa*. utilizando sobrenadantes de cultivos bacterianos aislados de Tuba tradicional Guerrerense.

XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

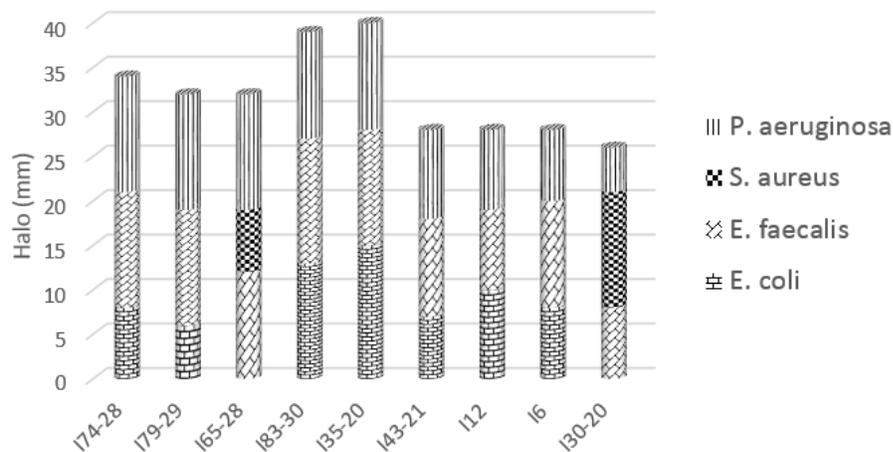


Fig 2. Ensayo de antagonismo de cepas aisladas de Tuba tradicional y bacterias patógenas.

Conclusiones

La concentración de azúcares y proteínas en los medio Tuba, tradicional y comercial, permitieron el crecimiento y desarrollo de bacterias con propiedades antioxidantes y antibacterianas. Cuarenta cepas de bacterias aisladas de la Tuba tradicional mostraron actividad antibacteriana contra cuatro cepas de interés clínico y 9 de ellas inhiben el crecimiento de *E. faecalis*, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa*. Se aislaron 16 cepas de bacterias Gram negativas a partir de Tuba comercial. Los metabolitos extracelulares de las cepas CAB16, CAB13, CAB06, CAB05 y CAB08 aisladas de la Tuba mostraron la mayor capacidad antioxidante mediante los ensayos de DPPH, ABTS y CCF. Los resultados obtenidos pueden ser de importancia biotecnológica para el diseño de tratamientos contra molestias estomacales.

Referencias

- Abdel AZ, Mohamed A, Sara I (2018) 2-Aminoethanaminium 2-(ethoxycarbonyl)-4,6-dinitrophenolate as a greener route in reducing sugar quantification. MethodsX. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.017>.
- Ansari K. (1996) Free radical induced diseases. J Indian Med Assoc 94(6), pp.238–239.
- Aquihuatl RM & Perez CM (2004) Manual de prácticas de Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México 21- 123.
- Asker D, Beppu T, Ueda K (2007) *Sphingomonas japsi* sp. nov., a novel carotenoid-producing bacterium isolated from Misasa, Tottori, Japan. Int J Syst Evol Microbiol. 57(7), pp.1435-1441.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Astudillo MF, Ochoa LA, Utrilla J, Huerta G. (2019). Bacterial diversity and population dynamics during the fermentation of palm wine from Guerrero Mexico. *Front Microbiol.* 22 (10), pp.531.

Brambila J (2006) El umbral de una agricultura nueva. Universidad Autónoma de Chapingo y Colegio de Postgraduados. primera edición. Montecillos, Estado de México. p. 319.

Calvo J, Martínez L (2009) Mecanismos de acción de los antimicrobianos. En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (44-52). Santander, España.

Carranco ME, Calvo MC, Pérez F (2011) Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Arch Latinoam Nutr.* 61(3) pp.233-241.

Chandrasekhar K, Sreevani S, Seshapani P, Pramodhakumari J (2012) A Review on palm wine. *Int J Biol Sci*, 2(1), pp. 33–38.

Cortázar M, Flores R, Fuentes I (2010) Proceso productivo de la tuba de coco: una alternativa económica para los cococultores del sureste mexicano. Comité Editorial del CIRSE. Primera Edición. Campo Experimental Chetumal, Quintana Roo. Folleto para Productores Núm. 1. Serie INIFAP p. 43.

De la Fuente-Salcido NM, Villarreal-Prieto JM, Díaz León MA, García Pérez AP (2015) Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Rev Mex Cienc Farm* 46 (2).

Díaz Ruiz G, Wachter Rodarte C (2003) Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista latinoamericana.* pp. 30-40.

Esquenazi D, Wigg MD, Miranda MM, Rodriguez HM, Tostes JB, Rozental S, da Silva AJ, Alviano CS (2002) Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera L.* (Palmae) husk fiber extract, 10, pp. 647-52.

Galvis M (2009) Estudio del proceso de fermentación de glucosa para la producción de bioetanol a partir de levaduras nativas. Tesis de Licenciatura no publicada. Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander.

Granados D & López G (2002) Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera L.*) en México. México. Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 1(8), pp. 39-48.

Guevara L, Jáuregui D (2008) Anatomía Floral De *Cocos nucifera L.* (Arecaceae, Arecoideae). *Acta Bot Venez*, 31(1), pp. 35–48.

Heredia-Castro P, Méndez-Romero J, Hernández-Mendoza A, Acevedo-Félix E, González-Córdoba AF, Vallejo-Córdoba B (2015) Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of Dairy Science* Vol. 98 No. 12.

Heredia-Castro P, Hernández-Mendoza A, González-Córdoba A, Vallejo B (2017) Bacteriocinas de bacterias



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*. Vol. 42, No. 6.

Javeed AT, Sheikh M, Rasy FCW & Nighat UN (2023) Chapter 20 – To estimate protein by Bradford assay. *Basic Life Science Methods*, 20, pp. 83-86.

Khassaf M, McArdle A, Esanu C, Vasilaki A, McArdle F, Griffiths RD (2003) Effect of vitamin c supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *J Physiol*. 549(2), pp. 645–652.

Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R (2011) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process*. 89 (3), pp. 217– 233.

Liu G, Nizet V (2009) Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trend Microbiol*, 17(9), pp. 406-413.

Maji J, Cyriac M, Pai V, Varghese I, Shantaram M (2014) Antimicrobial properties of *Cocos nucifera* (coconut) husk: An extrapolation to oral health. *J Nat Sci Biol Med*. 5(2), pp. 359-364.

Nielsen J, Villadsen J, Lidén G (2003) *Bioreaction Engineering Principles*. New York. Plenum Publisher.

Oler JG (1999) *Modern coconut management: palm cultivation and products*. Gran Bretaña: Intermediate Technology Publications. p. 458.

Olvera-García M, Serrano-Maldonado C, Quirasco M (2015) Detección de proteínas con actividad

antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. 2019, de Sitio web: https://www.researchgate.net/publication/280568781_Deteccion_de_Proteinas_con_Actividad_Antibacteriana_Producidas_por_Bacterias_Acido_Lacticas.

Parra-Huertas RA (2010) Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de ciencias agropecuarias*. 8(1), pp. 94-105.

Pérez-Villanueva MP, Vázquez-García A, De la Fuente-Salcido NM, Barboza Corona JE (2016) Optimización de la producción y actividad antimicrobiana de bacteriocinas sintetizadas por cepas aisladas de bebidas fermentadas mexicanas. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), pp. 269-274.

Prior RI, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agri Food Chem*, 53, pp. 4290–4302.

Rogelio F (2006) *Alternativas tecnológicas del cocotero de Asia-Pacífico, ventaja competitiva para el cocotero de México*. Tesis de doctorado publicada. Colima, Mexico: Universidad de Colima.

Runeberg-Roos P, Saarma M (1998) Phytapsin, a barley vacuolar aspartic proteinase, is highly expressed during autolysis of developing tracheary elements and sieve cells. *Plant J*. 15, pp. 139-145.



XX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA IXTAPA ZIHUATANEJO, GUERRERO

Del 11 al 15 de septiembre de 2023

Sánchez-Moreno C (2002) Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int*, 8, pp.121-137.

Schlesier K, Harwat M, Bohm V, Bitsch R (2002) Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res*. 36, pp. 177-187.

Serrano M, López M, Sainz T (2006) Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(4), pp. 58-68.

Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH (2016) Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-28.

Urbina-Bonilla, A. (2008). Nuevo papel de los radicales libres en el ejercicio: ¿otra paradoja?. *Colom méd*. 39(3), pp. 266-275.