

TERMORRESISTENCIA DE ENZIMAS PROTEOLITICAS DE *PSEUDOMONA AERUGINOSA* AISLADAS DE LECHE DE TANQUE DE DIFERENTES TAMBOS

PROTEOLYTIC ENZYMES THERMORESISTANCE OF *PSEUDOMONA AERUGINOSA* ISOLATED FROM BULK TANK MILK OF DIFFERENT DAIRY FARMS

C.N. Acuña¹, F.L. Pantozzi², G.B. Vigo³ y M.A. Palmieri¹

RESUMEN

Se evaluó la resistencia térmica de la actividad proteolítica de las enzimas producidas por cuatro cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, a las temperaturas de pasteurización de 74°C - 15" (HTST: high temperature short time), 63°C - 30'(LTLT: low temperature long time) y esterilización 120°C - 30', y el tiempo de aparición de la actividad proteolítica de las enzimas. Una vez obtenidos los crudos enzimáticos, se adicionaron en leche descremada reconstituida y se sometieron a las temperaturas anteriormente citadas. Para evaluar la actividad proteolítica se utilizó la técnica de difusión en agar, donde las placas se incubaron a temperaturas de 4°C, 25°C y 37°C, durante 48 horas. La lectura se realizó cada 24 horas hasta 8 días. Los resultados demostraron: 1) las exoenzimas proteolíticas fueron resistentes a los procesos HTST y LTLT; 2) estas enzimas se inactivaron en el proceso de esterilización; 3) la alteración en leche pasteurizada por HTST y refrigerada fue posterior a su vida útil y 4) la recuperación de la actividad enzimática fue mayor a 37°C.

ABSTRACT

Thermic resistance of proteolytic activity from enzymes produced by four *Pseudomonas aeruginosa* strains to temperatures of pasteurization 74°C - 15" (HTST: high temperature short time), 63°C - 30' (LTLT: low temperature long time) and sterilization 120°C - 30', and the time of appearance, were evaluated. Enzymatic raws were obtained and added to skim milk, then they were treated at temperatures above mentioned. Proteolytic activity was evaluated by agar diffusion method. Plates were incubated at 4°C, 25°C and 37°C during 48 hours. Measurements carried out each 24 hours until 8 days. Results showed 1) proteolytic exoenzymes were to HTST and LTLT processes; 2) these enzymes were inactivated by sterilization process; 3) alteration of HTST-pasteurized milk and refrigerated milk was afterwards the expiry date and 4) recovery of enzymatic activity was better at 37°C.

Palabras índices adicionales: Psicrótrofas, proteasas, HTST, LTLT.

Recepción: 10 - 06 - 97

Aprobación: 13 - 01 - 98

¹Cátedra de Industrias Agrícolas de Lechería. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. U.N.L.P. Calle 60 y 119. CC 31. La Plata (1900) Buenos Aires. Fax: 54-21-252346. E-mail : cacuna @. ceres. agro. unlp. edu.ar

²Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. U.N.L.P. Calle 60 y 118. CC 296. La Plata (1900) Buenos Aires. Fax: 54-21-211276.

³Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. U.N.L.P.

INTRODUCCION

Numerosas bacterias psicrótrofas producen enzimas resistentes al calor. La calidad y la vida útil de la leche y productos lácteos a partir de leches contaminadas por este tipo de bacterias puede, entonces, verse reducida a pesar del tratamiento térmico (Fairbairn y Law, 1986). Debido a esto, dichas bacterias son consideradas actualmente importantes como causa de deterioro en los productos lácteos refrigerados (Reinheimer y Candioti, 1994 y West y col., 1978). Según datos aportados por Cousins y Bramley (1981); Mol y Vincentie (1981), la mayoría de estos microorganismos son, *Pseudomona* spp.

Barach y col. (1976, 1978) y West y col. (1978) han señalado que la inactivación de enzimas producidas por bacterias psicrótrofas, lograda por calentamientos a temperaturas comprendidas entre 50°C y 55°C (low temperature inactivation) es superior a la lograda con temperaturas más altas, incluyendo los tratamientos UHT (ultra high temperature). Reinheimer y Candioti (1994) estudiaron la termorresistencia a distintas temperaturas de proteasas de crudos enzimáticos de bacterias psicrótrofas y encontraron mayor estabilidad térmica frente a calentamientos a temperaturas mayores a 100°C que los efectuados a 55°C y 63°C.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la resistencia térmica de las enzimas producidas por cuatro cepas de *Pseudomona aeruginosa*, aisladas de leche de tanque de diferentes tambos, a las temperaturas de pasteurización (HTST: high temperature short time y LTLT: low temperature long time) y de esterilización (120°C-30') y el tiempo de aparición de la actividad proteolítica de estas enzimas luego de los mismos.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos: Se seleccionaron 4 cepas de *Pseudomona aeruginosa*, aisladas de leche de tanque de diferentes tambos, las cuales se identificaron según Bergey (1984). Para su aislamiento se utilizaron placas agar cetrinida, las que se incubaron a 42°C por 48 horas. Al microscopio óptico se observaron bacilos Gram negativos. Se determinó la existencia de un flagelo por medio de microscopía electrónica.

Para caracterizar la cepa fueron realizadas las siguientes pruebas bioquímicas: hidrólisis de la Arginina, reacción de oxidasa, utilización de glucosa, el resultado en todos los casos fue positivo, la prueba de utilización de trealosa resulto negativa (Bergey, 1984).

Preparación de crudos enzimáticos en leche reconstituida: Las cepas se cultivaron en tubos con 10 ml de leche en polvo descremada esterilizada reconstituida al 10 %, a un valor de 6,3 +/- 0,1 unidades de pH, adicionada con 1 mM de Cl₂Ca y 0,5 mM de SO₄Zn, y se incubaron durante 5 días a 25 °C. Estos cultivos se centrifugaron 15 minutos a 4.000 rpm, hasta obtener un sobrenadante límpido. Luego se esterilizaron por filtración (Millipore 0,22 (μ) y se almacenaron a -20°C hasta su uso (Barach y col., 1978; Fairbairn y Law, 1986; Gorbetti y col., 1995; Vercet y col., 1997). Por otro lado, a partir de los mismos cultivos, se realizaron diluciones para determinar el inóculo bacteriano inicial (10⁸ - 10⁹ ufc/ml), para lo cual se sembraron en placas con agar tripticasa soya que se incubaron por 24 horas a 37°C.

Tratamientos térmicos de los crudos enzimáticos: Se tomó 1ml de cada uno de los cuatro crudos enzimáticos y se colocaron en tubos con 9 ml de leche descremada reconstituida al 10%. Cada uno de ellos se sometió a los siguientes tratamientos térmicos: 63°C durante 30' (LTLT), 74°C durante 15'' (HTST) y 120°C durante 30' (esterilización clásica) e inmediatamente se enfriaron. Se realizó un ensayo control para cada cepa sin tratamiento térmico.

Actividad proteolítica de los crudos enzimáticos: Se utilizó la técnica de difusión en agar de Kirby-Bauer modificada (Reinheimer y Candioti, 1994). Se sembraron 10μl de cada uno de los crudos enzimáticos (control y tratados térmicamente), por triplicado, dentro de conos de metal de 6 mm de diámetro sobre placas con agar leche (agua agarizada al 1,5%, adicionada con 10% de leche descremada reconstituida al 10%) a pH 7,2. Se incubaron a tres temperaturas: 4°C, 25°C y 37°C, durante 48 horas y posteriormente se procedió a la lectura del diámetro de los halos en mm. La actividad proteolítica se observó cada 24 horas hasta el octavo día.

Análisis estadístico: Para evaluar la termorresistencia de los crudos enzimáticos se utilizó el diseño experimental de bloques completos al azar. Los tratamientos correspondieron a las cepas ensayadas y los subtratamientos a las temperaturas de pasteurización alta (HTST), baja (LTLT), esterilización y control, realizándose tres series para cada tratamiento. Los datos fueron analizados estadísticamente a través del análisis de la varianza y la significancia fue evaluada por medio del Test de Tukey ($P < 0,05$).

Para el análisis del tiempo de aparición de la actividad proteolítica en cada una de las tres temperaturas, se utilizó el mismo diseño estadístico. Se tomaron como tratamientos las cuatro cepas y como subtratamientos los días de incubación, realizándose tres series para cada uno.

RESULTADOS Y DISCUSION

La Tabla 1 muestra los valores promedios y las medias de las áreas de los halos de hidrólisis en mm a 37°C, con un período de incubación de 48 horas, en las leches con los crudos enzimáticos, con y sin tratamiento térmico. Se determinó diferencias significativas para la leche esterilizada con respecto a los otros tratamientos, observándose una inactivación total de los crudos enzimáticos motivada por el tratamiento de esterilización. Tales diferencias no existen entre los procesos de pasteurización, a las temperaturas y tiempos utilizados en el ensayo (HTST = LTLT). Todas las cepas ensayadas se comportaron igual frente a los diferentes tratamientos térmicos.

Tabla 1: Halos de hidrólisis (mm) a 37°C luego de 48 horas de incubación de leches con agregado de enzimas proteolíticas sometidas a diferentes tratamientos térmicos.

CEPAS	CONTROL	ESTERILIZACION	HTST	LTLT
3	11	0	0	9
5	13	0	10	13
7	10	0	9	8
8	9	0	8	9
x*	10,75 a	0,00 b	6,75 a	9,75 a

* Las medias seguidas de la misma letra en sentido horizontal no presentan diferencias significativas al nivel del 5% de probabilidad del test de Tukey.

LTLT: tratamiento térmico 63°C-30 minutos

HTST: tratamiento térmico 73°C-15 segundos

Esterilización: 120°C-30 minutos

Control: sin tratamiento térmico

La Tabla 2 indica que no se encontró actividad proteolítica de los crudos enzimáticos de las cepas ensayadas de *Pseudomonas aeruginosa* en las leches pasteurizadas (HTST y LTLT), incubadas a 4°C durante un período de 8 días. Consideramos esto de suma importancia debido a que si bien la enzima resistió ambos tratamientos térmicos no se observó actividad a la temperatura establecida por el Código Alimentario Argentino (1994) (4°C) para su conservación en góndola. Por otra parte no hubo actividad enzimática a ésta temperatura durante ocho días, por lo tanto la alteración en leches pasteurizadas, de ocurrir, sería posterior al plazo de tres días establecido por el Código Alimentario Argentino para su consumo. Estos resultados coinciden con los hallados por Reinheimer y Candiotti (1994) para *Pseudomonas fluorescens*.

Tabla 2: Desarrollo en el tiempo de la acción proteolítica a 4°C de leche con crudos enzimáticos de *Pseudomonas aeruginosa* tratados térmicamente, por la técnica de difusión en agar (mm de halos).

CEPAS	2 DIAS	3 DIAS	6 DIAS	7 DIAS	8 DIAS	x*
3 LTLT	0	0	0	0	0	0,00 a
5 HTST	0	0	0	0	0	0,00 a
5 LTLT	0	0	0	0	0	0,00 a
8 HTST	0	0	0	0	0	0,00 a
8 LTLT	0	0	0	0	0	0,00 a

* Las medias seguidas de la misma letra en sentido vertical, no presentan diferencias significativas al nivel del 5% de probabilidad del test de Tukey.

LTLT: tratamiento térmico 63°C-30 minutos

HTST: tratamiento térmico 73°C-15 segundos

La Tabla 3 muestra el desarrollo en el tiempo de la acción proteolítica a 25°C expresada en los valores promedio y las medias en mm de los halos de hidrólisis, para 3 muestras de leche con el agregado de crudos enzimáticos de tres cepas *Pseudomonas aeruginosa*, sometidas a pasteurización (HTST, LTLT). No se encontraron diferencias significativas entre las cepas tratadas a pasteurización alta y a pasteurización baja. La cepa 5 tratada por HTST fue la única que mostró actividad al segundo día, con un porcentaje del 69% de recuperación de la actividad inicial, siendo éste del 100% al séptimo día, comparada con un ensayo control sin tratamiento térmico. En esta cepa se observó el mayor porcentaje de recuperación de la actividad inicial de las leches trata-

das con pasteurización alta (HTST), lo que coincide con los datos aportados por Reinheimer y Candiotti, (1994) para *Pseudomona fluorescens*, donde la recuperación de la actividad está relacionada con el tiempo de exposición térmica.

La presencia de actividad enzimática a temperatura de 25°C es de suma importancia para aquellos productos conservados a temperatura ambiente que sufren alteraciones tales como sabores amargos en quesos y gelificación en leche Ultra-Hight temperature (UHT), según lo indicado por Fairbairn y Law (1986).

Tabla 3: Desarrollo en el tiempo de la acción proteolítica a 25°C de leche con crudos enzimáticos de *Pseudomona aeruginosa* tratados térmicamente, por la técnica de difusión en agar (mm de halos).

CEPAS	2 DIAS	3 DIAS	6 DIAS	7 DIAS	8 DIAS	x*
3 LTLT	0	0	8	9	9	5,20 a b
5 HTST	9	10	12	14	14	11,80 b
5 LTLT	0	0	9	11	11	6,20 a b
8 HTST	0	0	9	10	10	5,80 a b
8 LTLT	0	0	0	0	0	0,00 a

* Las medias seguidas de la misma letra en sentido vertical no presentan diferencias significativas al nivel del 5% de probabilidad del test de Tukey.

LTLT: tratamiento térmico 63°C-30 minutos

HTST: tratamiento térmico 73°C-15 segundos

Tabla 4: Desarrollo en el tiempo de la acción proteolítica a 37°C de leche con crudos enzimáticos de *Pseudomona aeruginosa* tratados térmicamente, por la técnica de difusión en agar (mm de halos).

CEPAS	2 DIAS	3 DIAS	6 DIAS	7 DIAS	8 DIAS	x*
3 LTLT	9	10	11	13	13	11,20 a
5 HTST	13	15	19	21	21	17,80 b
5 LTLT	10	10	12	13	15	12,00 a
7 HTST	8	9	11	11	11	10,00 a
7 LTLT	9	9	12	12	12	10,80 a
8 HTST	9	10	15	15	15	12,80 a
8 LTLT	8	10	10	11	11	10,00 a

* Las medias seguidas de la misma letra en sentido vertical, no presentan diferencias significativas al nivel del 5% de probabilidad del test de Tukey. Means followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by Tukey's test.

LTLT: tratamiento térmico 63°C-30 minutos

HTST: tratamiento térmico 73°C-15 segundos

La Tabla 4 indica el desarrollo en el tiempo de la acción proteolítica a 37°C expresada en los valores promedio y las medias en mm de los halos de hidrólisis, para muestras de leche con el agregado de crudos enzimáticos de *Pseudomona aeruginosa*, sometidos a pasteuriza-

ción (HTST, LTLT). Se encontraron diferencias significativas entre la cepa 5 tratada a pasteurización alta (HTST) y en relación a los demás tratamientos. La cepa 5 tratada a pasteurización alta (HTST) se comporta igual a 37°C que a 25°C. A los dos días, con tratamiento HTST recuperó el 100 % de la actividad proteolítica y con tratamiento LTLT el 77 %, llegando al 100 % al séptimo día, comparada con el ensayo control sin tratamiento térmico.

Por otra parte se observó que luego de una incubación a 25°C durante 5 días, hubo aumento en los valores de pH de las leches ensayadas (pH 6,6) con respecto al valor inicial.

CONCLUSIONES

- Las exoenzimas proteolíticas, de las cepas ensayadas, son resistentes a los procesos HTST y LTLT.
- Las exoenzimas proteolíticas de las cepas ensayadas se inactivan en el proceso de esterilización.
- La alteración por exoenzimas de las cepas ensayadas en leche pasteurizada (HTST) y refrigerada es posterior a su vida útil.
- La recuperación de la actividad proteolítica de las leches con exoenzimas tratadas térmicamente es mayor a 37°C.

LITERATURA CITADA

1. BARACH, J. T.; D. M. ADAMS and M. L. SPECK. 1976. Low temperature inactivation in milk of heat-resistant proteases from psychrotrophic bacteria. J. Dairy Sci. 59 (3): 391-395.
2. BARACH, J. T.; D. M. ADAMS and M. L. SPECK. 1978. Mechanism of low temperature inactivation of a heat-resistant bacterial protease in milk. J. Dairy Sci. 61:523-528.
3. BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology. 1984. Volume 1, 8th Edition. Williams & Willkins (Baltimore).
4. CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, edición 1994, anexo Normas Mercosur.
5. COUSINS, C. M. and A. J. BRAMLEY. 1981. In Dairy Microbiology. Vol.1 pp.119-163 (Ed. R. K. Robinson). London: Applied Science.

6. FAIRBAIRN, D.J. and LAW, B.A. 1986. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.* 53: 139-177.
7. GORBBETTI, M. and A.CORSETTI, P.F. FOX. 1995. Purification and Characterization of Intracellular Aminopeptidase from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948. *J. Dairy Sci.* 78: 44-54.
8. MOL, H. and H. M. VINCENTIE. 1981. In *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*. pp.97-108 (Eds. T.A. Roberts, G. Hobbs, J.H.B. Christian and N. Skovgaard). New York: Academic Press.
9. REINHEIMER, J. A. y M. C. CANDIOTI. 1994. Actividad y termorresistencia de enzimas exocelulares de bacterias psicrotrofas aisladas de leche cruda. *La Alimentación Latinoamericana* 202: 39-46.
10. VERCET, A.; P. LOPEZ and J. BURGOS. 1997. Inactivation of Heat-Resistant Lipase from *Pseudomonas fluorescens* by Manothermosonication. *J. Dairy Sci.* 80: 29-36.
11. WEST, F. B.; D. M. ADAMS and M. L. SPECK, 1978. Inactivation of heat resistant proteases in normal ultra-high-temperature sterilized skim milk by a low temperature treatment. *J. Dairy Sci.* 61: 1078-1084.