

Cinética de crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* en leche cruda a temperaturas de refrigeración

Costa M., Gómez M.F., Molina L.H. y Romero A.

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ICYTAL. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile

RESUMEN. El uso generalizado de la refrigeración de la leche cruda ha contribuido a mantener la calidad de ésta pero ha traído como consecuencia la selección de una flora psicrotrofica la cual durante su desarrollo produce enzimas termorresistentes responsables, en parte, del deterioro de productos de larga vida. Dada la condición de prolongada refrigeración de la leche antes del procesamiento, se planteó determinar las curvas de crecimiento bacteriano a temperaturas entre 2°C y 10°C y las cinéticas de producción de proteasas en leche cruda recién ordeñada, inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* RV10, utilizando un fermentador modular, con mínima agitación bajo condiciones de pH y temperatura controlados. Los resultados muestran un desarrollo por sobre los 10⁵ ufc/mL para los cultivos a 6°C, 8°C y 10°C a las 30 h y con niveles de actividad proteásica superiores a 30 µM p-NA/2h, los que se incrementan fuertemente hasta niveles de 80 a 180 µM p-NA/2h después de las 50 h de cultivo. Sólo los cultivos a 2°C muestran un comportamiento estable con recuentos inferiores y sin incremento en la actividad enzimática. Una situación intermedia puede observarse en los cultivos a 4°C.

Palabras clave: Psicrotroficas en leche cruda, proteasas termorresistentes, *Pseudomonas fluorescens*.

SUMMARY. Growth kinetics and proteases production of *Pseudomonas fluorescens* in raw milk at refrigeration temperatures. The general use of refrigeration of raw milk has contributed to maintenance of its quality, but has induced the selection of a psychrotrophic bacteria which during its growth produces heat-resistant enzymes responsible, in part, for the deterioration of long-life products. Given the condition of the prolonged refrigeration of the milk before the process, it was necessary to determine the growth curves for bacteria at temperatures between 2°C and 10°C and the kinetics of production of proteases in raw fresh milk, inoculated with *Pseudomonas fluorescens* RV10, using an automatic fermentation system, with minimal agitation under conditions of controlled temperature and pH. The results show a development over 10⁵ ufc/mL in the cultures at 6°, 8° and 10°C during the first 30 h and proteasic activities over 30 µM p-NA/2h getting levels of de 80 - 180 µM p-NA/2h over 50 h of cultivation. Only the cultures at 2°C appeared stable with inferior cell counts and without inducing enzymatic activity. At 4°C an intermediate situation occurs.

Key words: Psychrotrophic in raw milk, heat resistance proteases, *Pseudomonas fluorescens*.

INTRODUCCION

El almacenamiento de la leche cruda a temperaturas entre 4°C y 8°C permite seleccionar microorganismos psicrotrofos, que representan menos del 10% de la flora inicial de la leche cruda, donde crecen y se convierten en la flora predominante tras permanecer de dos a tres días bajo condiciones de refrigeración antes de ser sometidas a un determinado proceso térmico (1-2).

En Chile los estanques refrigerados en los campos operan a temperaturas reales alrededor de los 6°C, lo que sumado al transporte (generalmente no refrigerado) y está en silos (5°C por 24 h en verano y hasta 72 h en invierno) en la planta, facilita el desarrollo de esta flora, con las consecuencias ya señaladas. Los microorganismos psicrotrofos predominantes pertenecen al género *Pseudomonas* y dentro de éste, la especie más comúnmente encontrada en el sur de Chile es *Pseudomonas fluorescens* (3), situación que se

también observa en otros países (4).

El problema de la contaminación de la leche cruda con microorganismos psicrotrofos durante las etapas de producción y manejo, es difícil de evitar, al igual que el deterioro posterior debido a las condiciones de almacenamiento, y no podría ser eliminado completamente, ya que, a pesar de que los microorganismos son destruidos mediante los procesos térmicos de pasteurización y de ultra alta temperatura (UHT), las proteasas extracelulares que son producidas por estas bacterias durante su crecimiento en la etapa de refrigeración de la leche cruda, permanecen activas o parcialmente activas durante el período de almacenamiento del producto terminado, presentando sus efectos principalmente sobre leches fluidas UHT y otros productos de larga vida (1-2).

La temperatura de crecimiento tiene un marcado efecto en la producción de proteasas. Por ejemplo, en un estudio realizado por Fairbairn y Law (2-5) con *Pseudomonas*

fluorescens NCDO 2085 en un cultivo continuo con limitación de carbono y siendo 18°C la temperatura óptima para la producción total de proteasa, la producción de esta enzima por unidad de peso seco aumentó con la disminución de temperatura, mientras que la cantidad de células a temperaturas bajo los 20°C, se redujo con la disminución de temperatura. Estos resultados apoyan la hipótesis que las bacterias psicrotróficas sintetizan mayores cantidades de enzima a bajas temperaturas, para compensar un descenso en la actividad de la enzima ayudando a mantener su velocidad de crecimiento a expensas del rendimiento celular.

En un estudio realizado por Juffs (6), se estableció que la temperatura y composición del medio de cultivo afectaría y/o influiría marcadamente la producción de estas proteasas en *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se demostró que la temperatura de incubación influiría en la producción de proteasas por unidad de crecimiento en las cepas estudiadas, así la producción de proteasas disminuyó cuando la temperatura de crecimiento fue menor a la temperatura óptima para la producción de enzimas.

Celestino, Iyer y Roginski (7) estudiaron el efecto del almacenamiento refrigerado en leche cruda en silos verificando el aumento de bacterias proteolíticas y de psicrotróficas desde un 47% a un 80% a las 48±2 h; la actividad enzimática también fue mayor en las leche refrigerada durante ese período de tiempo respecto de su condición inicial.

Debido a la importancia industrial de estas enzimas y a las condiciones del prolongado almacenamiento, entre el ordeño y el procesamiento de la leche, resulta importante conocer el desarrollo de *Pseudomonas fluorescens* bajo los 10°C y, asimismo los niveles de actividad proteásica que son detectados. Según lo anterior se planteó como objetivo determinar las curvas de crecimiento y de producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* a 2°C, 4°C, 6°C, 8°C y 10°C, en leche cruda recién ordeñada.

MATERIALES Y METODOS

Los cultivos de *Pseudomonas fluorescens* RV10 se realizaron en un fermentador modular (Gallenkamp) de 1 L, con control automático de pH y temperatura ($\pm 0,2^\circ\text{C}$) sin aireación y con mínima agitación, en 500 mL de leche recién ordeñada de vacas sanas pertenecientes al fundo Vista Alegre de la Universidad Austral de Chile. Las leches fueron inoculadas con un cultivo previo de *Pseudomonas fluorescens* RV10 en caldo cerebro corazón de forma tal de obtener una concentración inicial de 4 a 6 $\times 10^3$ ufc/mL. Se tomaron muestras cada 2 horas durante 100 horas y se determinó cada vez el recuento total en placa con Agar Plate Count, de acuerdo con Houghtby *et al.*, (8) y la actividad proteásica mediante el método de Linden *et al.* (9), que fue modificado en el presente

trabajo como sigue: 3 mL de leche se mezclan con 1 mL de una solución de leucyl-p-nitroanilida 6 mM (Sigma Chemical Co.) en 20 mM buffer bis-tris propano (Sigma Chemical Co.) e incubados a 37°C por 2 h, al término del cual se toman 2 mL de la mezcla y se mezclan con 4 mL de etanol absoluto (Merck), luego de dejar reposar unos minutos la mezcla es centrifugada a 14.720g por 20 min a 4°C. El sobrenadante es extraído con mucho cuidado y se lee su absorbancia a 405 nm. Se construye una curva de calibración estándar de p-nitroanilina (Sigma Chemical Co.) el rango de 0-200 $\mu\text{moles/L}$. La actividad proteásica se expresa como μM de p-nitroanilina (pNA) liberados en 2 h a 37°C.

RESULTADOS

En las Figuras 1, 2, 3, 4 y 5 se muestran las curvas para el crecimiento y la actividad de las proteasas de *Pseudomonas fluorescens* a las temperaturas de trabajo de 2°C, 4°C, 6°C, 8°C y 10°C, respectivamente.

FIGURA 1
Crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* a 2°C

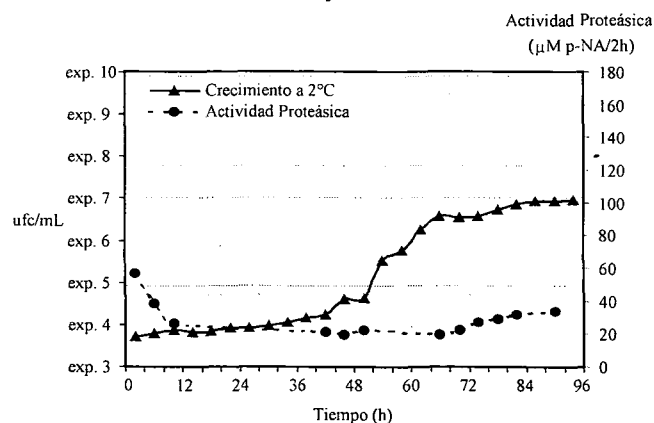


FIGURA 2
Crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* a 4°C

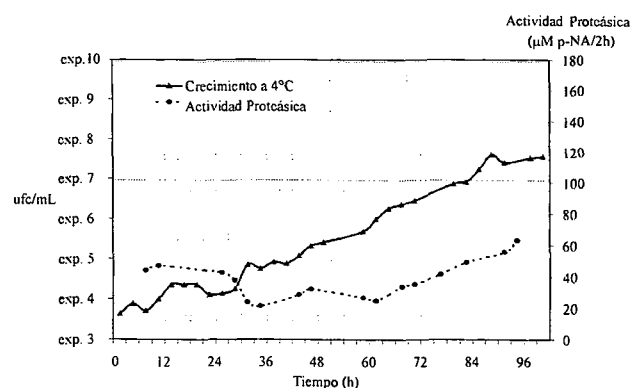


FIGURA 3
Crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* a 6°C

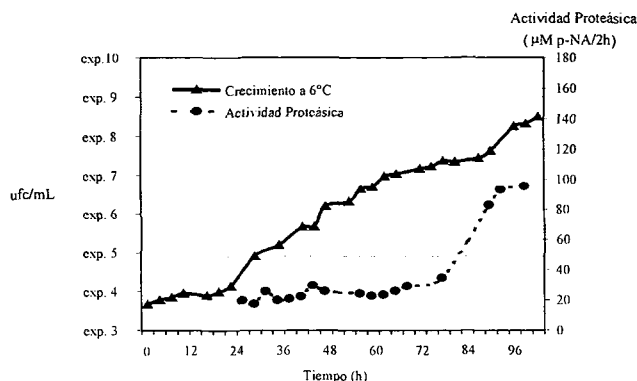


FIGURA 4
Crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* a 8°C

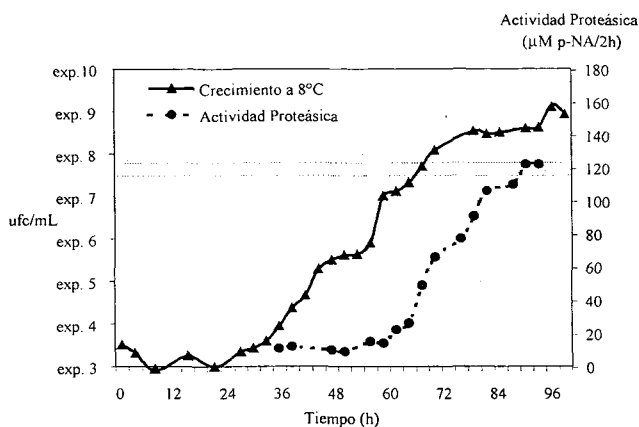
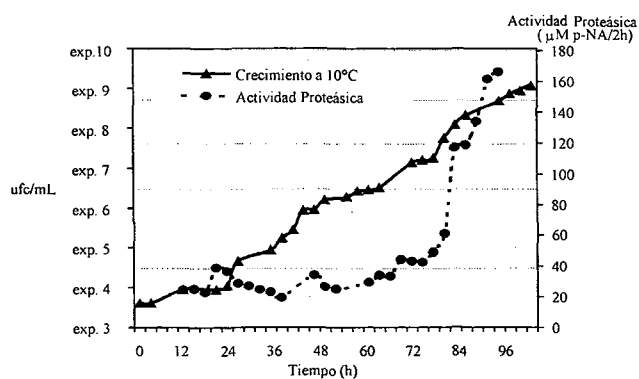


FIGURA 5
Crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* a 10°C



En relación con el crecimiento, se observa que, en todos los cultivos a las diferentes temperaturas probadas, entre 2°C y 10°C, se produjo un aumento de la masa bacteriana. Sin embargo, el crecimiento se vió afectado por la temperatura de cultivo. En el cultivo realizado a 2°C, se observa que el desarrollo alcanza niveles superiores a 10⁷ ufc/mL, a las 96 horas de cultivo. A 4°C el nivel de crecimiento bacteriano llega a niveles de 5x10⁷ ufc/mL a las 100 horas de cultivo. Por otro lado, en los cultivos realizados a 6°C, 8°C y 10°C, se observa que el crecimiento celular alcanza niveles sobre las 10⁸ ufc/mL, alrededor de las 100 horas de cultivo. Un crecimiento similar se apreció en los cultivos a 8°C y 10°C alcanzando niveles de 10⁹ ufc/mL.

Al analizar en la siguiente tabla las velocidades de crecimiento para cada temperatura de cultivo, se puede observar que ésta aumenta cuando aumenta la temperatura de cultivo, y el tiempo de duplicación promedio para cada temperatura disminuye según la temperatura aumenta.

Temperatura (°C)	Velocidad específica de crecimiento*, μ (h ⁻¹)	Tiempo de duplicación*, t _p (h)
2°	0,42	1,65
4°	0,49	1,41
6°	0,52	1,33
8°	0,63	1,10
10°	0,66	1,05

Promedio de tres determinaciones (DE_≤0,05)

Con respecto a la actividad proteásica, se puede observar que para todas las temperaturas a las que se trabajó, a partir de las 60 horas de cultivo comienza a elevarse notoriamente, en especial, en los cultivos realizados a 6°C, 8°C y 10°C, llegando a niveles de actividad cercanos a 80, 120 y 160 μ M p-NA/2h, respectivamente, a las 100 horas de cultivo.

Para el caso de los cultivos realizados a 2°C y 4°C, se observa que existe un notorio aumento de actividad, solamente a 4°C a partir de las 60 horas de cultivo, pero con niveles de actividad muy inferiores a los cultivos a 6°C, 8°C y 10°C. Este aumento no es apreciable en los cultivos realizados a 2°C, manteniéndose la actividad proteásica en un nivel más o menos constante a lo largo de las 100 horas de cultivo; es así que a las 60 horas se observa una actividad proteásica de 20 μ M p-NA/2h y a las 100 horas una actividad cercana a los 30 μ M p-NA/2h.

Es importante notar que los niveles de crecimiento alcanzados a las 60 horas, para los cultivos realizados a 6°, 8° y 10°C son cercanos a los 10⁹ ufc/mL. En cambio, a 2° y 4°C el nivel de 10⁷ ufc/mL es alcanzado sólo a las 100 y 80 horas de cultivo, respectivamente.

Los resultados obtenidos para las curvas de crecimiento a 6°C, 8°C y 10°C, indican que el crecimiento bacteriano es considerable a estas temperaturas llegando a niveles de 10^8 ufc/mL a las 90 horas de cultivo y con velocidades específicas de crecimiento de: 0,52, 0,63 y 0,66 h^{-1} , respectivamente; y con tiempos de duplicación de 1,33, 1,10 y 1,05 horas, respectivamente. Para el caso de cultivos a 4°C, se observa que la velocidad de crecimiento (0,49 h^{-1}) y el tiempo de duplicación (1,41 horas) son similares a los valores obtenidos para estos parámetros en cultivos a 6°C, aunque el crecimiento bacteriano a 4°C sólo alcanza a 5×10^7 ufc/mL aproximadamente, mientras a 6°C alcanza a 5×10^8 ufc/mL cercano a las 100 horas de cultivo. A 2°C, se observa que el crecimiento bacteriano es menor que en todos los demás cultivos con velocidad de crecimiento de 0,42 h^{-1} y tiempo de duplicación de 1,65 horas.

Las curvas de actividad proteásica, indican un marcado aumento a partir de las 60 horas en los cultivos a 6°, 8° y 10°C con niveles de actividad sobre los 100 μ moles de p-nitroanilina/2 horas (a 37°C), al final del tiempo de cultivo. En el caso de los cultivos a 2°C y 4°C se observa un aumento en la actividad proteásica solamente a esta última temperatura de cultivo pero con valores de actividad menores que en los cultivos a 6°, 8° y 10°C. A 2°C la actividad proteásica se mantiene casi sin aumento a lo largo del tiempo de cultivo. El nivel de crecimiento bacteriano a 2°C a las 100 horas alcanza levemente a las 10^7 ufc/mL, valor mucho más bajo a los niveles alcanzados a las restantes temperaturas de trabajo.

DISCUSION

La leche cruda a temperaturas de refrigeración es un excelente medio de crecimiento y para la producción de proteasas por las bacterias psicrotróficas, en este caso, *Pseudomonas fluorescens*, una de las especies más frecuentemente encontradas en la leche cruda refrigerada de la Xª Región de Chile.

Uno de los principales factores que influyen en la calidad en los productos lácteos fabricados a partir de leche cruda almacenada a 7°C o menos, por varios días, es el desarrollo de la flora psicrotrófica y la producción de proteasas termoestables (1-10).

En el caso de los cultivos a 4°, 6°, 8° y 10°C, las enzimas comienzan a ser producidas a partir de las 60 horas de cultivo, lo que correspondería al comienzo de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, donde los recuentos están sobre los 10^7 ufc/mL. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Stead (11), donde 2 cepas de *Pseudomonas* psicrotróficas fueron cultivadas en leche a 7°C y con niveles de crecimiento cercanos a 10^8 ufc/mL y que también coincide con el comienzo de la detección de actividad proteásica. También

concuerdan con los resultados obtenidos por Griffiths (12), que encontró que la producción de proteasas de 3 cepas de *Pseudomonas fluorescens*, comienza al final de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria cuando se alcanzó un recuento de $3,2 \times 10^7$ ufc/mL. En el estudio realizado por Costa, et al. (13), donde se estudió el crecimiento a 4°C de la cepa psicrotrófica *Pseudomonas fluorescens* RV10 en leche esterilizada entera y descremada, también se estableció que estas enzimas proteolíticas comienzan a ser secretadas durante el final de la fase exponencial de crecimiento, cuando el recuento alcanza las 10^7 ufc/mL.

El medio ambiente fisiológico influye en la producción de las proteasas, ya que en este estudio se ve que la producción de las mismas es dependiente de la temperatura; a 2°C la producción de enzima es mínima con respecto a los valores de actividad obtenidos a otras temperaturas. Así también, al comparar los resultados obtenidos por Costa (13), en los que el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* se evaluó en leche esterilizada a 121°C durante 15 minutos, la velocidad de crecimiento es mayor a cualquiera de las temperaturas obtenidas en el presente estudio y el tiempo de duplicación es más bajo, es decir el desarrollo bacteriano es más rápido. Esto puede deberse a que en el caso de la leche cruda se tiene un ambiente no estéril por lo cual se produciría un efecto de competición entre la flora nativa de la leche cruda y la que es inoculada. Así en un estudio realizado por Cox y MacRae (14) se examinó la velocidad de crecimiento de seis cepas de *Pseudomonas fluorescens* en leche de cabra cruda y UHT, siendo para todas ellas mayor el crecimiento en la leche UHT.

Los resultados muestran que *Pseudomonas fluorescens* se desarrolla por sobre los 10^5 ufc/mL en leche cruda inoculada a niveles de 4 a 6×10^5 ufc/mL a temperaturas de 6°C, 8°C y 10°C a las 30 h y con niveles de actividad proteásica superiores a 30 μ M p-NA/2h, los que se incrementan fuertemente hasta niveles de 80 a 180 μ M p-NA/2h luego de las 90 h de cultivo. Por otra parte, en los cultivos a 2°C muestran que hay una disminución con relación al crecimiento bacteriano y por consiguiente, una disminución notable en la producción de enzimas proteolíticas a esta temperatura. Una situación intermedia puede observarse en los cultivos a 4°C.

Del trabajo se puede concluir que, la leche cruda con recuento de psicrotróficas, almacenada en condiciones de refrigeración sobre las 30 h puede no ser apta para la elaboración de leches UHT por cuanto presentan una actividad proteásica importante, lo que puede conducir a un acortamiento de la vida útil del producto terminado.

Esta investigación fue financiada por el Proyecto N° 1951116 de FONDECYT, Chile.

REFERENCIAS

1. Marshall RT. Critical points to control: contamination, growth and enzymatic activity. Proceedings of the Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk, Wolfpassing, Austria. 1996, 46p.
2. Fairbairn DJ y Law BA. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. J Dairy Res, 1986;53: 139- 177.
3. Levicán J. Caracterización de la flora psicotrófica y sus proteasas en la leche cruda refrigerada. Tesis. Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 1992. p. 132.
4. Jayarao BM and Wang LA. study on the prevalence of Gram-negative bacteria in bulk tank milk. J Dairy Sci, 1999; 82 (12) 2620-2624.
5. Shah NP. Psychrotrophs in milk: a review. Milchwissenschaft, 1994;49(8): 432-437.
6. Juffs HS. Effects of temperature and nutrients on proteinase production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* in broth and milk. J Applied Bacteriology, 1976;40: 23-32.
7. Celestino EL, Iyer M and Roginski H. The effects of refrigerated storage on the quality of milk. Australian J Dairy Tech, 1996; 51 (2) 59-63.
8. Houghtby GA, Maturin LJ and Koenig EK. (Messer JW, Tech. Comm.). (1992). Chapter 6. Microbiological Counts Methods. In: Standard Methods of Dairy Products, 16th Edition. Robert T. Marshall, Editor. American Public Health Association, 1992;213-244.
9. Linden G, Humbert G, Desnouveaux R et J. Picard. Applications de la dissolution complete du lait à la détermination de quelque activités enzymatiques. Le Lait, 1982;62 (615-616): 209-219.
10. San José C, Fernández L and Palacios P. Compositional changes in cold raw milk supporting growth of *Pseudomonas fluorescens* NCDO 2085 before production of extracelular proteases. J Food Protection, 1987;50(12): 1004-1008.
11. Stead D. Production of extracellular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in whole milk. J Dairy Res, 1987;54: 535-543.
12. Griffiths MW. Effect of temperature and milk fat on extracellular enzyme synthesis by psychrotrophic bacteria during growth in milk. Milchwissenschaft, 1989;44(9): 539-542.
13. Costa M, Herrera VM, Romero A y Carrasco E. Purificación y caracterización de proteasas y lipasas producidas por *Pseudomonas fluorescens* en leche a 4°C. Alimentos 1997; 22(1-2):73-82.
14. Cox JM and Mac Rae IC. Growth of psychrotrophic bacteria in raw and UHT-treated goat's milk. J Applied Bacteriology, 1988;64 (403):7.

Recibido: 06-04-2001

Aceptado: 27-08-2001