



## Verificación de las Actividades Proteolíticas y Lipolíticas de la Flora Microbiana Aislada de la Leche Cruda Tipo B Refrigerada. II-Microorganismos Psicrotróficos

I. A. Silveira,\* E. P. Carvalho, D. Teixeira y B. E. B. Barrios

Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Universidad Federal de Lavras - Lavras, CEP 37.200-000. Minas Gerais. Brasil

\*Corresponding author. Caixa Postal 37 - DCA Universidad Federal de Lavras, Lavras - M. G. Brasil CEP. 37200-000.  
E-Mail: ivana@ufla.br

**ABSTRACT.** The aim of this work was to evaluate the microbiological quality of raw type B milk, kept under refrigeration at 3°C, for a period of 15 days. The milk was enumerated and isolated a total of 180 microorganisms, of which 80 were psychrotrophics. The ability of these microorganisms to produce lipolysis and/or proteolysis in the milk was evaluated. Concerning the microbiological analysis, the samples analyzed presented high values for total counting. The results from the initial counting were  $2.7 \times 10^4$  UFC/ml for psychrotrophic, with a predominance of Gram negative bacilli, which were highly lipolytic and had proteolytic activities associated.

**Key words:** Psychrotrophic, Proteolytic and Lipolytic activities, Milk.

**RESUMEN.** Con el objetivo de analizar la calidad microbiológica de la leche tipo B cruda mantenida en refrigeración a 3°C por 15 días, se enumeró y aisló un total de 180 microorganismos siendo 80 psicrotróficos. La capacidad de estos microorganismos en producir lipolisis y/o proteolisis en la leche también fue observada. El análisis microbiológico de la leche presentó altos valores en las cuentas totales realizadas, alcanzándose  $2.7 \times 10^4$  UFC/ml de microorganismos psicrotróficos con el dominio de Gram negativos, algunos de ellos altamente lipolíticos, además de presentar actividades proteolíticas asociadas.

**Palabras clave:** Psicrotróficos, Actividades proteolíticas y lipolíticas, Milk.

### INTRODUCTION

La leche, por ser considerada un alimento completo en nutrientes fácilmente asimilables, es un excelente alimento para el hombre y un medio de cultivo para la mayoría de los microorganismos presentes en la naturaleza.

La carga microbiológica de la leche cruda es de extrema importancia en la calidad final de los productos lácteos. Un leche de baja calidad microbiológica no se conserva por períodos largos, incluso en refrigeración, debido a su contaminación principalmente debida a las bacterias psicrotróficas, que a pesar de su crecimiento lento, producen grandes cantidades de enzimas (lipasas y proteasas) que rápidamente alteran el producto.<sup>2,6</sup>

El almacenamiento de la leche por largos períodos en temperaturas de refrigeración han resultado en nuevos problemas de calidad para la industria de lácteos. Estos problemas están relacionados al crecimiento y a las actividades metabólicas de microorganismos en bajas temperaturas.<sup>14</sup>

Gounot<sup>8</sup> y Alais<sup>1</sup> observaron que los microorganismos que normalmente contaminan la leche crecen en una amplia faja de temperatura. Esta flora incluye, además de los microorganismos mesófilos, a termófilos y psicrotróficos.

El término psicrotrófico ha confundido los microbiólogos desde el inicio del siglo. Otros términos sinónimos son usados, tales como: psicrófilos, psicrófilos facultativos, tolerantes al frío o psicrotolerantes.<sup>8</sup>

Witter<sup>18</sup> definió a las bacterias psicrófilas como aquellas que tienen un crecimiento relativamente rápido a la temperatura de refrigeración como 7.2°C o menos. Sugirió además que el término psicrotrófico fuese usado para indicar los microorganismos que son capaces de crecer a bajas temperaturas. Debido a su sensibilidad a temperaturas altas, los psicrófilos son menos importantes que los psicrotróficos en el procesamiento de alimentos. Los psicrófilos verdaderos son de origen marino, e incluyen sólo algunos géneros, siendo de pequeña importancia en alimentos.<sup>8</sup>

Según Collins,<sup>4</sup> de acuerdo con las normas de la International Dairy Federation, los psicrotrófilos fueron definidos como aquellos microorganismos que pueden crecer a 7°C o menos, independiente de la temperatura óptima de crecimiento. Éste grupo es extremadamente importante en productos que son conservados o almacenados en condiciones de refrigeración por períodos relativamente largos (1 a 4 semanas). El problema se torna todavía más serio con el uso intensivo de la refrigeración, desde la hacienda hasta la residencia del consumidor, puede provocar una



gradual selección para estos grupos. Se ha observado que un gran número de especies consideradas mesófilas estriadas, ya están siendo incluidas también entre los psicrotróficos.

La flora psicrotrófica de la leche es responsable de la producción de enzimas, y los procesos de pasteurización de la leche eliminan la mayoría de los microorganismos inicialmente presentes en la leche cruda. Existe aún, la posibilidad de sobrevivencia de microorganismos o de enzimas producidas por ellos en la leche pasteurizada. Existe también la posibilidad de una recontaminación por esas bacterias durante las fases de procesamiento de la leche.<sup>9</sup>

Las lipasas y proteasas, inclusive a bajas concentraciones, son capaces de degradar grasas y proteínas, causando respectivamente sabores rancio y amargo a la leche y productos lácteos almacenados en refrigeración.

Los psicrotróficos, de un modo general, producen enzimas que no son completamente inactivadas por el proceso UHT. Éste grupo representa menos de 10% de la flora inicial de la leche cruda y, aunque sean capaces de crecer rápidamente durante la permanencia de la leche cruda en refrigeración, pueden convertirse en el grupo dominante. El género más común encontrado en la leche es *Pseudomonas*, particularmente *Pseudomonas fluorescens*. Otros microorganismos psicrotróficos incluyen *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter* y *Aeromonas*. Las proteasas producidas por los psicrotróficos pueden, a bajas concentraciones, hidrolizar las proteínas de la leche causando sabor amargo y gelificación en el almacenamiento de la leche UHT.<sup>9</sup>

Ternstrom et al.<sup>17</sup> mencionan que la actividad lipolítica de los microorganismos psicrotróficos es de gran importancia en lácteos. *Pseudomonas fragi* se ha descrito que es una cepa lipolítica, cuando crece en bajas temperaturas. Los autores destacan las diferentes temperaturas y pH donde la acción de la lipasa es considerada óptima y, describen la especificidad que tiene la enzima por los triglicéridos, que difiere entre las lipasas producidas por los psicrotróficos.

Este trabajo tuvo como objetivo, verificar la presencia de microorganismos psicrotróficos en la leche cruda tipo B refrigerada, en diferentes tiempos de almacenamiento en refrigeración. La capacidad de los microorganismos de producir proteólisis y/o lipólisis en la leche también fue observada.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Muestra.** Se colectaron 20 litros de leche tipo B cruda en tanques de cobre con capacidad para 20 litros, debidamente esterilizados. En el laboratorio, después de retirar una alícuota para las análisis iniciales (día 0), este tanque contenido la leche en estudio fue almacenado en una cámara fría a  $3^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 15 días. Fueron retiradas alícuotas de 10 ml para la análisis microbiológico en los días 1, 3, 5, 8, 10, 13 e 15 de almacenamiento.

**Análisis microbiológicos.** Se realizaron cuentas totales

de microorganismos psicrotróficos de acuerdo a la metodología descrita por Standard Methods for the Examination of Dairy Products.<sup>12</sup>

**Cuenta total.** Después de la dilución de las muestras en agua peptonada al 0.1%, por triplicado se retiraron 0.1 ml, se colocaron y extendió en la superficie del medio de cultivo sólido PCA (Merck). Las placas fueron incubadas a  $6^{\circ}\text{C}$  por 14 días para la cuenta de psicrotróficos. También fueron retiradas algunas colonias a las que se titró mediante la técnica de Gram. Los aspectos morfológicos y las actividades lipolíticas y proteolíticas fueron determinadas. Esas colonias fueron repicadas en PCA inclinado y mantenidas en refrigeración adicionadas de aceite mineral.

**Observación de las actividades lipolíticas y proteolíticas.** Se usó el medio agar leche desnatada para verificación de proteólisis y agar-tributirina para la verificación de lipólisis. Los medios fueron preparados con PCA (MERCK) adicionado de 1% de leche en polvo desnatada y 1% de tributirina, para las respectivas actividades.<sup>15</sup> Colocamos 20 ml del medio en cada placa y las colonias puras fueron estriadas en la superficie. Después de la incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 h, se verificó la presencia de una zona clara al rededor de la colonia, lo que indicaba reacción de proteólisis y lipólisis. Halos de hasta 1 mm de espesura indicaron una reacción débilmente positiva; de 1 a 2 mm reacción positiva (+); halos > 2 a 4 mm- reacción positiva (+ +) y halos > 4 mm-reacción positiva (+ + +).

**Coloración de esporas.** Las colonias de bacilos Gram positivos, fueron sometidos a choque térmico para estimular la producción de esporas ( $80^{\circ}\text{C}$  por 10 min). Se inoculó en caldo BHI (Merck) y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Después de la incubación, los tubos eran sometidos al choque térmico y entonces, la coloración de esporas se realizó con el método de Wirtz-Conklin descrito por Ribeiro y Soares.<sup>13</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Cuantificación de la flora psicrotrófica de la leche.** La flora psicrotrófica de la leche cruda varió de  $10^4$  a  $10^8$  UFC/ml durante el período de almacenamiento. De acuerdo con la legislación Brasileña (Ministerio de la Agricultura-RIISPOA, 1980) la flora psicrotrófica no debe superar a 10% el número de microorganismos mesófilos, hecho que es claramente observado en este trabajo. La tabla 1 muestra la media de las cuentas por ml de los microorganismos psicrotróficos en la leche cruda por ml. También de acuerdo con los datos obtenidos en el lácteo, la presencia elevada de estos microorganismos puede ser debida al tiempo en que la leche permanece almacenada refrigerada, hasta que el volumen deseado sea atingido. Muchos productores de esta región almacenan la leche de más de una ordeña, antes de entregarla al lacticíneo. Esto también ocurre en el lacticíneo, donde grandes volúmenes de leche permanecen refrigerados por 3 a 4 días antes del procesamiento.



to. En este trabajo, las altas cuentas obtenidas pueden ser atribuidas al tiempo y temperatura de refrigeración en la cual esa leche permaneció hasta la colecta de la muestra. Los estudios realizados por Cunha et al<sup>7</sup> en leche cruda tipo B refrigerado, presentaron resultados de psicrotróficos variando en el orden de  $10^2$  a  $10^5$  UFC/ml en varias muestras colectadas de un mismo productor, demostrando fallas en la higiene y almacenamiento inadecuado del producto.

**Caracterización de los grupos de microorganismos.** Durante el período de almacenamiento fueron aisladas 80 colonias de psicrotróficos, siendo 16 (20%) Gram positivas y 64 (80%) Gram negativas (tabla 2). El predominio de psicrotróficos Gram negativos es confirmado por Ternstron et al,<sup>17</sup> que asocia los psicrotróficos Gram negativos como los principales contaminantes y responsables del deterioro de la leche mantenida en refrigeración. La tabla 2 muestra los grupos microbianos psicrotróficos aislados en la leche cruda tipo B refrigerada.

Entre los bacilos Gram positivos 15% eran esporulados. De acuerdo con Ternstron et al,<sup>17</sup> los bacilos Gram positivos formadores de esporas forman el segundo grupo más importante en el deterioro de productos lácteos; esto refuerza los resultados obtenidos, en los cuales la presencia de los bacilos esporulados sólo es esperada por la mayoría casi absoluta (80%) de bacilos Gram negativos. La pasteurización convencional destruye la mayoría de estos microorganismos Gram negativos, entretanto que las enzimas producidas por ellas permanecen activas. A esta gran mayoría de microorganismos Gram negativos pueden pertenecer bacterias del género *Pseudomonas*, que es una bacteria de gran importancia dentro del grupo psicrotrófico como deterioradora de leche y derivados. Kohlmann et al<sup>10,11</sup> relata la importancia de este género en la industria de lácteos principalmente en lo que se refiere a producción de en-

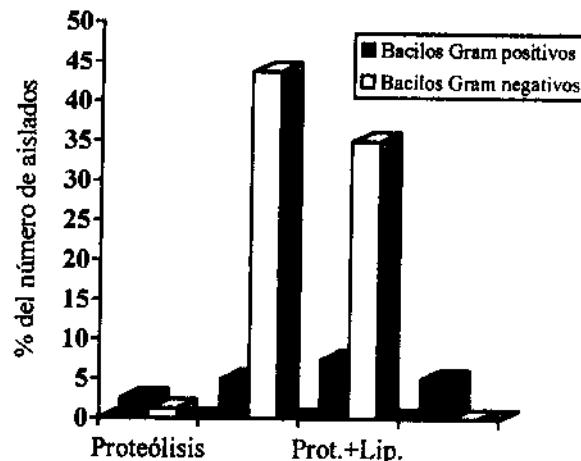


Figura 1: Relación en porcentaje (en relación a cada grupo microbiano aislado) de la actividad proteolítica y lipolítica de los microorganismos psicrotróficos en la leche cruda

zimas en productos mantenidos en almacenamiento refrigerado. Estas bacterias, causan problemas en la leche cruda, almacenada en refrigeración prolongada, volviendo el producto inaceptable para el consumo (producción de sabores y olores no deseables).

**Actividades proteolíticas y lipolíticas de los grupos estudiados.** Fueron medidas las intensidades de lipólisis y proteólisis de los aislados en agar tributirina y agar leche desnatada, respectivamente. Los resultados son mostrados en la fig. 1.

Las actividades lipolíticas y proteolíticas en productos lácteos mantenidos en refrigeración están muy correlacio-

Tabla 1. Evolución de la flora psicrotrófica de la leche cruda durante el almacenamiento

Período de almacenamiento (días)	Cuenta microbiana (UFC/ml)
0	$2.7 \times 10^4$
1	$1.4 \times 10^5$
3	$1.9 \times 10^5$
5	$1.6 \times 10^6$
7	$7.6 \times 10^6$
10	$1.0 \times 10^7$
13	$1.0 \times 10^7$
15	$1.5 \times 10^8$

\* temperatura de almacenamiento: 3°C; período total de almacenamiento: 15 días



Tabla 2. Números y porcentajes de los grupos microbianos psicrotróficos aislados de la leche cruda tipo B refrigerada.

Grupos microbianos	Psicrotróficos	
	Nº de colonias	Porcentaje
Gram positivos	16	20
Gram negativos	64	80
Cocos	0	0
Bacilos Gram positivos esporulados	12	15
Bacilos Gram positivos sin esporas	4	5
Bacilos Gram negativos	64	80
Total	80	100

\* 3°C / 15 días

nadas con la presencia del grupo de los psicrotróficos, siendo los bacilos Gram negativos los principales causadores del deterioro en estos productos. En la fig. 1. se verifica que 64 (43,75%) de bacilos Gram negativos muestran solamente actividad lipolítica y 28 (35%) de ellos fueron bacilos con actividad lipolítica y proteolítica. La proteólisis como actividad aislada fue contactada en sólo 1 (1,25%) de estos bacilos.

Los bacilos Gram positivos también presentaron actividades lipolíticas y proteolíticas, siendo que 2 de los aislados (2,5%) presentaron solamente actividad proteolítica, 4 (5,0%) presentaron actividad lipolítica y 6 (7,5%) presentaron actividades asociadas de proteólisis y lipólisis y 4 (5,0%) no presentaron ninguna de las actividades en estudio. Estos 4 bacilos que no presentaron actividades no eran formadores de esporas.

Las observaciones de Stead,<sup>16</sup> sobre estándares de bacterias psicrotróficas Gram negativas, proteolíticas y lipolíticas, cultivadas en leche, que mantuvieron altas cuentas celulares y altas actividades de enzimas extracelulares durante incubación prolongada a la temperatura de refrigeración, sirven para demostrar el potencial de deterioro de estos microorganismos. Se debe enfatizar que las reacciones más intensas, tanto lipolíticas como proteolíticas ocurrió después del 8º día de almacenamiento refrigerado, cuando la cuenta de los microorganismos se encontraba en el orden de 10<sup>6</sup> UFC/ml.

La constatación de altos valores en las cuentas de psicrotróficos se debe principalmente al tiempo en que la leche permaneció en refrigeración, tanto en las haciendas como en el laticíneo, donde la leche permanece hasta de 3 a 4 días de refrigeración antes del envío para el procesamiento, favoreciendo la multiplicación de estos grupos de microorganismos.

La mayoría de los microorganismos aislados presentaron actividades enzimáticas (proteolíticas y lipolíticas) solas o asociadas, con una intensidad y frecuencia variables.

La actividad lipolítica presentada por los microorganismos fue superior en el grupo psicrotrófico, siendo que los bacilos Gram negativos fueron los principales responsables de tal reacción.

mos fue superior en el grupo psicrotrófico, siendo que los bacilos Gram negativos fueron los principales responsables de tal reacción.

## REFERENCIAS

1. Alais, C. 1991. Ciencia de la leche - principios de técnica lechera. 8<sup>a</sup> ed. México: Compañía Editorial S.A. de CV. 594 p.
2. Bishop, J. R., White, C. H. 1988. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing bacterial numbers and metabolites. *J. Food Prot.* 48:663-667.
3. Brasil. Ministério da Agricultura. 1980. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal-RIISPOA. Brasília, 116 p.
4. Collins, E. B. 1981. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. *J. Dairy Sci.* 64:157-160.
5. Collins, S. J., B. H. Bester y A. E. J. McGill. 1993. Influence of psychrotrophic bacterial growth in raw milk on the sensory acceptance of UHT skim milk. *J. Food Prot.* 56:418-425.
6. Craven, H. M. Y. B. J. Macauley. 1993. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. III. Effects of milk processor. *J. Dairy Technol.* 47:50-55.
7. Cunha, L. T., E. P. Carvalho y L. R. Abreu. 1996. Determinação das condições físicas-químicas e microbiológicas de leite B cru refrigerado. En: Congreso Brasileiro de Ciencia y Tecnología de alimentos, 15, Poços de Caldas, 1996. 2:73.
8. Gounot, A. M. 1986. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Nederlands Melk en Zuiveltds* 42:1192-1197.
9. Gregory-Stevenson, R., G. Brian Wisdom, M. T. Bowe, y D. A. McConaghay. 1996. Growth characteristics of post-pasteurization contaminants isolated from pasteurized milk. *J. Dairy Res.* 63:585-591.
10. Kohlmann, K. L., S. S. Nielsen, y M. R. Ladisch. 1991.



- Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. *J. Dairy Sci.* 74:4125-4136.
11. Kohlmann, K. L., S. S. Nielsen, L. R. Steenson y M. R. Ladisch. 1991. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. *J. Dairy Sci.* 74:3275-3283.
12. Marshall, R. T. 1992. Standard methods for the examination of dairy products. 16. ed. Washington: American Public Health Association, 416 p.
13. Ribeiro, M. C. Y M. M. S. R. Soares. 1993. Microbiología prática: roteiro e manual - bactérias e fungos. São Paulo: Atheneu, 112 p.
14. Robinson, R. K. 1987. Microbiología de la leche. España: Acríbia, v.1. 230 p.
15. Speck, M. L. 1976. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington: American Public Health Association, 701 p.
16. Stead, D. 1987. Production of extracellular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in whole milk. *J. Dairy Res.* 54:539-543.
17. Ternstrom, A., A. M. Lindberg y G. Molin. 1993. Classification of the spoilage flora of raw pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* 75:25-34.
18. Witter, L. D. 1961. Psychrophilic Bacteria -a review. *J. Dairy Sci.* 44:983-1015.