

# 9 CIBIA

Congreso Iberoamericano  
de Ingeniería de Alimentos

Valencia (España)

13 - 16 enero 2014

## Libro de Actas

Vol. 2

Editado por Pedro Fito, Ana María Andrés,  
Ángel Luis Argüelles y María Dolores Ortolá



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

## USO DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICO E NO TÉRMICO (ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA) PARA LA INACTIVACIÓN DE ENZIMAS BACTERIANAS METALOPROTEASAS PRESENTES EN LA DEGRADACIÓN DE LECHE

Pinto Junior, W. R.<sup>1</sup>, Pereira, P.R.<sup>1</sup>, Silva, J. M.<sup>1</sup>, Del Aguila, E. M.<sup>1</sup>, Silva, J. T.<sup>1</sup>, Paschoalin, V. M. F.<sup>1</sup> And Rosenthal, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup> Embrapa Food Technology, Rio de Janeiro, Brazil.

### 1 INTRODUCCIÓN

A pesar del potencial presentado por la leche nutricional, productos de alta calidad sólo pueden ser producidos a partir de materias primas de buena calidad. La leche de calidad debe tener la posibilidad de tolerar la tecnología de tratamiento y se convirtió en un producto que satisfaga las expectativas de los consumidores, como atributos nutricionales, sensoriales e higiene (Ribeiro, 2010). El enfriamiento de la leche cruda en el origen de la producción y el transporte a la industria, se practica en muchas propiedades en el Brasil. Sin embargo, la aplicación de este procedimiento favorece el crecimiento de bacterias psicrófilas. Mayoría de las bacterias psicrófilas, *Pseudomonas fluorescens*, son inactivadas por pasteurización o tratamiento UHT. Sin embargo, antes del tratamiento térmico puede ocurrir, la producción de enzimas proteolíticas resistentes al calor que puedan resultar en problemas técnicos como la formación de malos sabores, la coagulación y la reducción de rendimiento de productos lácteos. Es interesante destacar que entre las bacterias psicrófilas, el género *Pseudomonas* es prevalente en la leche refrigerada. Varios estudios informan las propiedades bioquímicas de las proteasas producidas por la especie *P. fluorescens* asociada con el deterioro de los productos lácteos. Aprx, se llama una proteasa que pertenece a la familia de serralisina, se ha caracterizado a partir de *P. fluorescens* y por la codificación del gen que fue identificado en muchas culturas. Está situado dentro del operón, que puede contener genes que codifican la lipasa, inhibidores de la proteasa, la proteasa y las proteínas secretoras auto-portadoras (Liao y McCallus, 1998; Johnson et al., 1992; Kawai et al., 1999; Ahn et al., 1999; Doug et al., 1992). El gen Aprx también se detectó en *P. tolaasi*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Flavobacterium* aislado del suelo (Martins et al., 2005). La mayoría de las proteasas de *Pseudomonas spp.* Son una metaloenzima monómero de 40 a 50 kDa, que comprende un átomo de zinc y de cuatro a ocho átomos de calcio (Frank, 1997; Nielsen, 2002; Stepania, 2004). Tener una actividad óptima entre 30 °C y 45 °C, con una actividad significativa a temperaturas de refrigeración (Frank, 1997) y el pH óptimo entre 6.5 y 8.0 (Chen et al.,

2003). La termorresistencia de estas proteasas es un obstáculo importante para la industria lechera (Mu et al., 2009). La alta presión hidrostática como método para procesar y conservar los alimentos, se ha estudiado desde finales del siglo XIX. Sin embargo, estos estudios se intensificaron, sólo al final del siglo pasado (Costa et al., 1999) cuando el equipo desarrollado para la industria de la cerámica se sometió a modificaciones con el fin de adaptarse a la industria alimentaria (Sangronis et al., 1997). La conservación de los alimentos por alta presión se caracteriza por un proceso no térmico donde estos son sometidos a las presiones de 150 a 900 MPascal (MPa) equivalente a 1500 hasta 9000 atmósferas (atm), respectivamente, con opciones para la variable en el tiempo, los ciclos y la temperatura del proceso, y se pueden usar solos o en combinación con otras tecnologías (Rosenthal, 2008). Este procedimiento da a la comida el aumento de la validez comercial, la inactivación de enzimas y microorganismos y, por otra parte, puede dar lugar a la capacidad de promover cambios estructurales en las proteínas, lo que provoca la alteración de la conformación, dependiendo de la presión aplicada, lo cual es a menudo beneficioso para alimentos (Rosenthal, 2008; Buckow y Heinz, 2008; Ludikhuyze et al., 2002). Por lo tanto, el estudio de la aplicación de la tecnología de alta presión en el tratamiento de la leche para la inactivación de las enzimas proteolíticas puede proporcionar un producto con alta calidad y salubridad diferencial, capaz de investir en un aumento del consumo y de valor agregado, con el fin de beneficiarse de la cadena de producción, con impactos económicos y sociales.

## **2 MATERIALES Y MÉTODOS**

Para investigar la capacidad termo-resistente y la inactivación inducida por la presión sobre la proteasa extracelular cruda producida a partir de *Stenotrophomonas maltophilia*, en la que fue detectada el gen Aprx. La cepa fue aislada a partir de una planta de productos lácteos después de 72 h de crecimiento del microorganismo a 30 °C en un medio complejo (CM) que contiene peptona (5 g / L), extracto de carne (3 g / l) suplementado con 1% de leche desnatada en polvo. La cepa de *P. fluorescens* (CT) ATCC 13525 (cepas de referencia), fue obtenida de la colección del Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud (INCQS) de la Fiocruz, Rio de Janeiro - RJ.

### **2.1 Tratamiento de Alta Presión Hidrostática**

Cuatro microgramos del extracto bruto fueron colocados en bolsas de plástico de la muestra (3 cm x 2 cm), sellado libres de burbujas de aire, fueron tratadas con alta presión hidrostática (Stansted Fluid Power Co.) en la unidad del laboratorio existente en el Instituto

Embrapa Alimentación en Río de Janeiro. Fue tratada a 30° C y 300 MPa o a 600 MPa y 35 °C durante 15 minutos seguido por el almacenamiento a 4 °C hasta la determinación de la actividad de la proteasa.

## 2.2 Tremoresistencia

El extracto en bruto fue tratado térmicamente a 63,5 °C durante 30 min e guardado enseguida a 4 °C hasta la determinación de actividad de la proteasa, con algunas modificaciones (THE, et al., 2011).

## 2.3 Evaluación de la Actividad Proteolítica Extracelular

Las cepas en diferentes sectores industriales fueron activados en medio complejo (CM) que contiene peptona (5 g/L), extracto de carne (3 g/L) es un medio de agar sólido y bacto (15 g/L), suplementado o no con leche desnatada en polvo para una concentración final de 1 % (w/v) a 30 °C durante 24 h con el fin de inducir la producción de la enzima propuesto por Dufour et al. (2008). El crecimiento de las células ( $10^5$  UFC/ ml) fueron controlados por turbidimetría a 600 nm en un espectrofotómetro (BELphotonics, modelo SP1105, Monza, Italia, después que se inoculó en 100 ml del medio complejo a 30 °C durante 72 h con agitación (140 rpm). Al final del período de fermentación, las células se fueron colectadas por centrifugación (12.000 g durante 15 min a 4 °C) y el sobrenadante libre de células se utilizó como un extracto de enzima en bruto. La concentración de proteína fue evaluada por fluorimétrica usando el método Qubit (Invitrogen).

## 3 RESULTADOS

En este estudio, la enzima termo-resistente, mostró una reducción de la actividad enzimática después del tratamiento térmico, como es observada con la cepa *S. maltophilia* y la cepa de referencia de *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) donde mostraron una disminución de 52,8 % y 73,3 % de la actividad enzimática, respectivamente (gráfico 1). Según Teh et al., (2011) de las 52 cepas aisladas de las superficies internas de los tanques de leche cruda, productoras de enzimas termo-resistentes, veintinueve cepas aisladas produjeron únicas enzimas proteolíticas termo-resistentes, cuando fueron tratados durante a 63,5 °C durante 30 min. La mayor parte de los aislados termoresistentes productores de enzimas durante el invierno pertenecían al género *Staphylococcus aureus* (85%), mientras que una mezcla de bacterias fue aisladas en verano como *Serratia* spp. (68%), *Streptococcus* spp. (12%), *Staphylococcus* spp. (12%) y *Pseudomonas* spp. (8%). La baja estabilidad térmica se observó para *Bacillus* sp. con actividad proteasica en la leche, la inactivación se encontró

bajo de 50 °C y una completa inactivación después de 5 min a 80 °C (Bilbao-Sáinz, et al., 2011). Una leve disminución de la actividad de la proteasa de *S. maltophilia* se observó cuando la presión se incrementó en el pH 8,3 mostrando una inactivación de 14,3% a 300 MPa y de 17,3% a 600 MPa (gráfico 2). Las inactivaciones parciales no parecen ser un mecanismo general ya que la inactivación proteolítica se observó cuando el extracto crudo producido por la cepa de referencia, *P. fluorescens* (ATCC 13525) fue utilizado en las mismas condiciones. La enzima aislada a partir de *S. maltophilia* fue sometida a diferentes niveles de presión (300 y 600 MPa) durante dos períodos de tiempo (0 y 15 min). La actividad caseinolítica se determinó usando azocaseína como sustrato. Según Bilbao-Sáinz, et al. (2011), la enzima parecía ser muy resistente a la presión en la leche, después de los tratamientos más severos a la temperatura inicial de 60 °C y presión de 600 MPa durante 15 min, las actividades residuales fueron superiores a 70%. Ludikhuyze et al., (2001) también observó un pequeño aumento en la actividad de la actoperoxidase (LPO) encontrada en la leche y suero de leche debido al tratamiento de la presión. Para algunas enzimas, presiones bajas (100 - 400MPa) combinados con temperaturas moderadas mostraron que mejoran significativamente la actividad enzimática (Anese, et al., 1995; Cano, et al., 1997; Verlent, et al., 2004). Este estudio mostró que el tratamiento térmico fue más eficaz para la reducción de la actividad enzimática de la proteasa en comparación con la tecnología no térmica de alta presión hidrostática.

#### 4 CONCLUSIÓN

La actividad de la proteasa en la bacteria *S. maltophilia* presentó una inactivación con 300 MPa y a 600 MPa. La inactivación parcial no parece ser un mecanismo común en todas las bacterias ya que no fue observado ninguna alteración con el extracto crudo de la cepa de referencia, *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), cuando submetidas a las mismas condiciones experimentales. También fue observado que la pérdida de la actividad de la proteasa fue alterada por el cambio de temperatura, llegando a ser más drástica que cuando submetida a la alta presión. La inactivación parcial de las enzimas proteolíticas de *S. maltophilia* dependía del pH, la temperatura de procesamiento y del tiempo de procesamiento. La combinación de estos factores pueden aumentar la sensibilidad de la proteasa en diferentes condiciones de presión.

## 5 REFERENCIAS

- Ahn, J. H.; Pan, J. G.; Rhee, J. S. Identification of the tliDEF ABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *Journal of Bacteriology*. v.181, p.1847–1852, 1999.
- Anese, M.; Nicoli, M.; Dall'anglio, G. & Lerici, C. Effect of high pressure treatments on peroxidase and polyphenol oxidase activities. *Journal of Food Biochemistry*, v.18, 285–293, 1995.
- Buckow R.; Heinz V. High pressure processing: a database of kinetic information. *Chemistry Ingenieur Technik*, v.80, p.1081–95, 2008.
- Cano, M.; Hernandez, A. & Ancos, B. High pressure and temperature effects on enzyme inactivation in strawberry and orange products. *Journal of Food Science*, v.62, n.1, 85–88, 1997.
- Chen, L.; Daniel, R. M.; Coolbear, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, v.13. p.255–275. 2003.
- Doug, F.; Lazdunski, A.; Cami, B.; Murgier, M. Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to other secretory pathways. *Gene*. v.121, p.47–54, 1992.
- Dufour, D; Nicodème, M; Perrin, C; Driou, A; Brusseau, E; Humbert, G; Gaillard, J; Dary, A. Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. *International Journal of Food Microbiology*, n.125, p.188–196, 2008.
- Frank, J. F. Milk and dairy products. In Doyle, P., Beuchat, R. Montville, J. *Food microbiology – Fundamentals and frontiers*, Washington, cap.6, p.101–116, 1997.
- Johnson, L. A.; Beacham, I. R.; Macrae, I. C.; Free, M. L. Degradation of triglycerides by a pseudomonad isolated from milk: molecular analysis of a lipase-encoding gene and its expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. v.58, n.5, p.1776–1779, 1992.
- Kawai, E.; Idei, A.; Kumura, H.; Shimazaki, K.; Akatsuka, H.; Omori, K. The ABC exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in *Pseudomonas fluorescens* no. 33. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1446, p. 377–382, 1999.
- Liao, C. H.; McCallus, D. E. Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Applied and Environmental Microbiology*. v.64, p.914–921, 1998.
- Ludikhuyze, L.; Van Loey, A.; Indrawati; Denys, S.; Hendrickx, M. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. In *Ultra High Pressure Treatments of Food*. *Food Science and Technology*, p.115–66, 2002.
- Martins, M. L.; De Araujo, E. F.; Mantovani, H. C.; Moraes, C. A.; Vanetti, M. C. Detection of the apr gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, v.102, p.203–211, 2005.
- Mu. Z.; Du, M.; Bai, Y. Purification and properties of a heat-stable enzyme of *Pseudomonas fluorescens* Rm12 from raw milk. *European Food Research and Technology*, v.228, p.725–734, 2009.

Nielsen, S. S. Plasmin system and microbial proteases in milk: Characteristics, roles, and relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.6628–6634, 2002.

Ribeiro, A. C; Ribeiro; S. D. A. Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research*, Elsevier. v 89, p. 225–233, 2010.

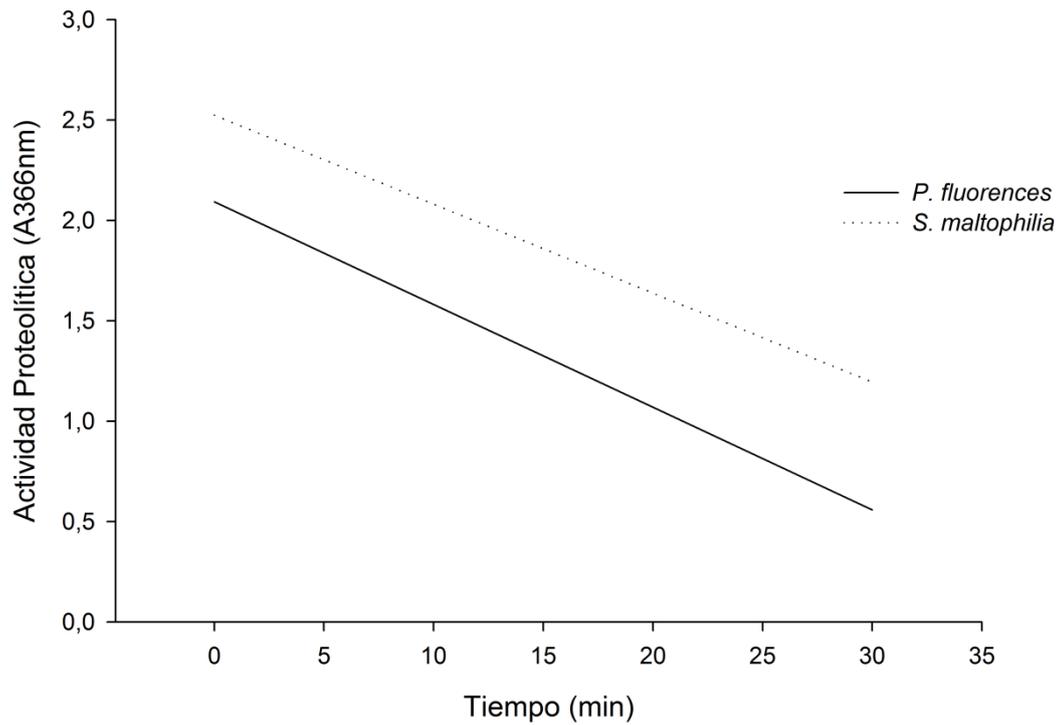
Rosenthal, A. *Tecnologias de Alimentos e Inovação: Tendências e Perspectivas*. Embrapa informações tecnológica, Brasília, DF, Embrapa, 1º edição, 193p, 2008.

Sangronis. E.; Pothakamury, U.; Ramos, A. M.; Ibraz, A.; Barbosa Cánovas, G. V.; Swanson, B. G. La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de los alimentos. *Alimentaria*. p.33–43, 1997.

Stepaniak, L. Dairy enzymology. *International Journal of Dairy Technology*, v. 57, n. 2/3, p. 153–171, 2004

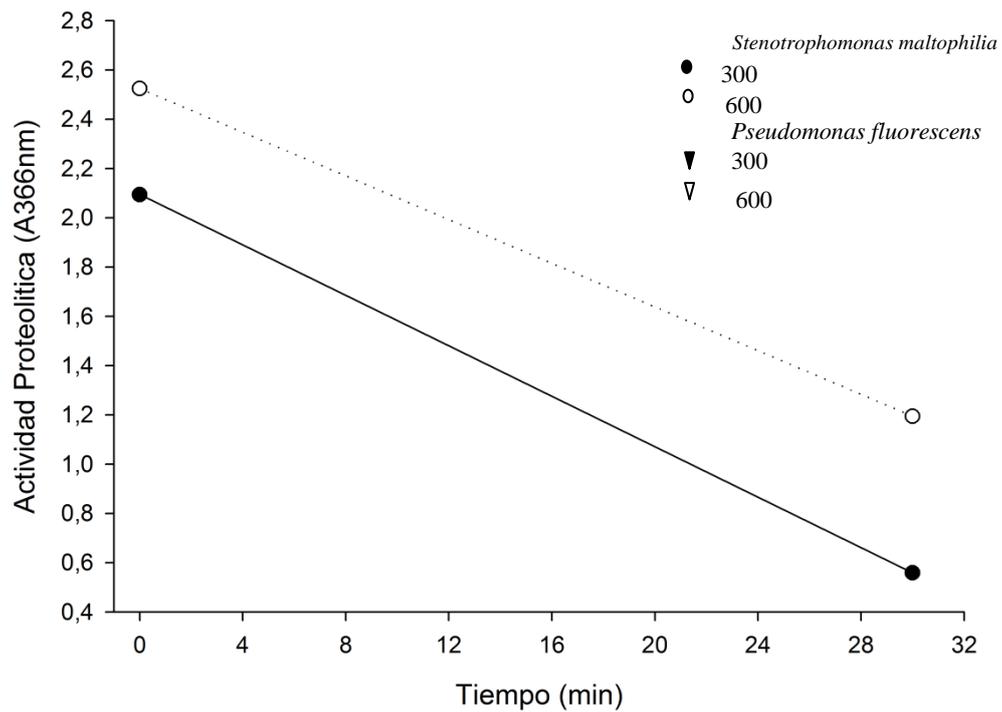
The, K. H.; Steve Flint, S.; Palmer, J.; Lindsay, D.; Andrewes, P. And Bremer, P. Thermo resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal Surfaces of raw milk tankers. *International Dairy Journal*, v.21, 742–747, 2011.

Verlent, I., Van Loey, A., Smout, C., Duvetter, T., & Hendrickx, M. E. Purified tomato polygalacturonase activity during thermal and high pressure treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, v.86, n1, 63–71, 2004.



**Gráfico 1. Actividad Caseinolítica después del tratamiento térmico**

La enzima aislada de *S. maltophilia* fue tratada durante al 63.5 °C durante 30 min donde el substrato utilizado fue azocaseína.



**Gráfico 2. Actividad proteásica con diferentes variaciones de presión**

La enzima aislada a partir de *S. maltophilia* fue sometido a diferentes niveles de presión (300 y 600 MPa) durante diferentes intervalos de tiempo (0 y 15 min). La actividad caseinolítica fue determinada usando azocaseína como sustrato.