

Evolución y caracterización de esporas mesófilas y termófilas dentro de líneas de procesamiento de leche



11° Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos

27/9 - 29/9 :: Montevideo :: Tendencias en sistemas alimentarios sostenibles



CELANO, Laura (*); TECHEIRA, Nora (*); INFANTE, María Inés, López-Pedemonte, Tomás.

Unidad de Ciencia y Tecnología de Lácteos.
Instituto Tecnológico Regional Suroeste.
Universidad Tecnológica del Uruguay

(*) Proyecto FMV 2020 (ANII-UTEC)



LICENCIATURA EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE LÁCTEOS

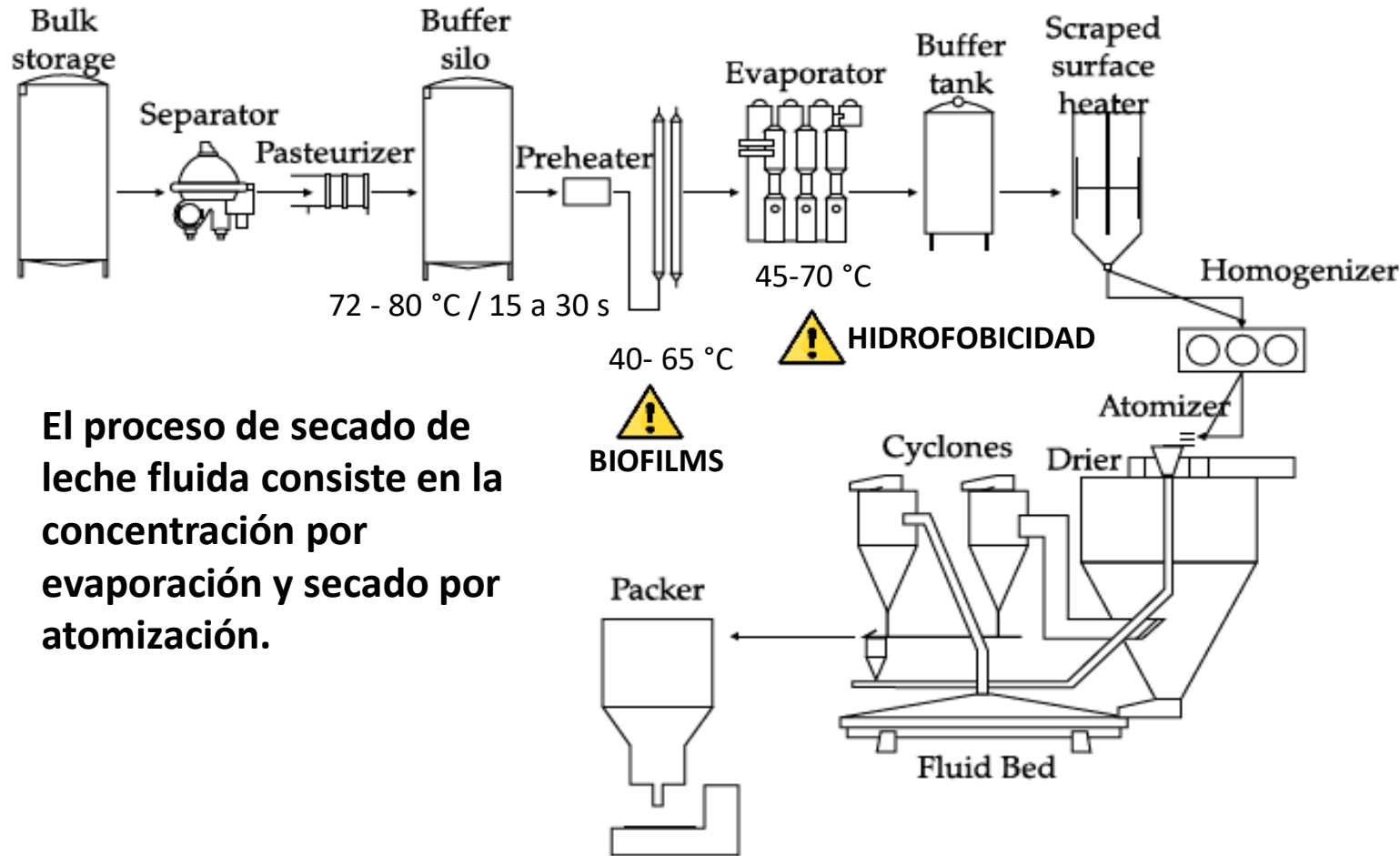


INTRODUCCIÓN

- Las esporas son estructuras latentes de resistencia bacteriana formadas por especies de las familias de Bacillales (aerobios) y Clostridiales (anaerobios).
- Estas especies son ubicuas y se encuentran en los ambientes vinculados a la producción primaria de leche por lo que son contaminantes naturales.



Representación esquemática de una spora



INTRODUCCIÓN

- Analizando posibles fuentes de contaminación
- Conociendo la dinámica de las poblaciones durante el proceso.
- Identificando las especies esporuladas prevalentes.
- Determinando sus efectos sobre las propiedades tecnológicas y sensoriales del producto final...



MAYOR CALIDAD Y SEGURIDAD PARA EL CONSUMIDOR

INTRODUCCIÓN

35 especies pertenecientes a 15 géneros han sido aisladas de leche en polvo y otros productos deshidratados.

Predominan:

- B. licheniformis***
- G. stearothermophilus***
- A. flavithermus***
- P. flavithermus***
- B. pumilus***
- B. sonorensis***
- B. cereus sensu lato***

Table 1
Aerobic or facultative anaerobic spore forming bacteria reported in milk powders or milk protein concentrates.

Bacterial contaminant	Reference
<i>Aeribacillus pallidus</i>	Sadiq et al. (2016a)
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	Yuan et al. (2012)
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	Reginensi et al. (2011); VanderKelen et al. (2016); Yuan et al. (2012)
<i>Bacillus</i> sp. R-6484 and JM4	Yuan et al. (2012)
<i>Bacillus aerophilus</i>	Sadiq et al. (2016b)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	VanderKelen et al. (2016)
<i>Bacillus altitudinis</i>	Boehner et al. (2015)
<i>Bacillus cereus</i> group	Crielly, Logan, and Anderton (1994); Kumari and Sarkar (2014); Miller et al. (2015); Reyes, Bastias, Gutierrez, and Rodriguez (2007)
<i>Bacillus coagulans</i>	Ronimus et al. (2006)
<i>Bacillus clausii</i>	Miller et al. (2015)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Crielly et al. (1994); Reginensi et al. (2011); Ronimus et al. (2006); Yuan et al. (2012); Zain, Flint, Bennett, and Tay (2016)
<i>Bacillus megaterium</i>	Boehner et al. (2015); Reginensi et al. (2011)
<i>Bacillus pumilus</i>	VanderKelen et al. (2016); Zain et al. (2016)
<i>Bacillus shankletonii</i>	Sadiq et al. (2016a)
<i>Bacillus sonorensis</i>	Sadiq et al. (2016a)
<i>Bacillus sporothermodurans</i>	Hammer, Leubke, Sultren, and Heeschen (1995)
<i>Bacillus subtilis</i>	Reginensi et al. (2011); Ronimus et al. (2006); Zain et al. (2016)
<i>Bacillus thermoantipylovorus</i>	Yuan et al. (2012)
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	Yuan et al. (2012)
<i>Brevibacillus brevis</i>	Sadiq et al. (2016a)
<i>Brevibacillus parabravis</i>	Sadiq et al. (2016a)
<i>Geobacillus</i> spp.	Miller et al. (2015)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Ronimus et al. (2006); Sadiq et al. (2016a); Yuan et al. (2012)
<i>Geobacillus thermooleovorans</i> group	VanderKelen et al. (2016)
<i>Laceyella sacchari</i>	Sadiq et al. (2016a)
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Sadiq et al. (2016a)
<i>Oceanobacillus</i> spp.	Boehner et al. (2015)
<i>Paenibacillus cookii</i>	Sadiq et al. (2016a)
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	Zain et al. (2016)
<i>Paenibacillus macerans</i>	Sadiq et al. (2016a)
<i>Sporosarcina contaminans</i>	Sadiq et al. (2016a)
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Sadiq et al. (2016a); Yuan et al. (2012)
<i>Ureibacillus</i> spp.	Miller et al. (2015)
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	Ronimus et al. (2006)
<i>Virgibacillus groomsii</i>	Sadiq et al. (2016a)

Sadiq, F. A., Flint, S., & He, G. (2018). Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. *International Dairy Journal*, 85, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.003>



INTRODUCCIÓN

SITUACIÓN EN URUGUAY



RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk

Stella M. Reginensi ^{a,*}, Marcela J. González ^a, Jorge A. Olivera ^a, Mariela Sosa ^a, Pablo Juliano ^b, Jorge Bermúdez ^a

^a Unidad de Tecnología de Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Av. Garzón 780, Montevideo, CP 12900, Uruguay
^b CSIRO Food and Nutritional Sciences, Werribee, VIC. 3030, Australia

En el análisis de 22 muestras comerciales de LPE predominan las siguientes especies:

- B. licheniformis*** (EAM, EAT facultativo)
- A. flavithermus*** (EAT)
- B. subtilis sensu lato*** (EAM, EAT facultativo)
- B. megaterium***
- B. pumilus*** (EAM, EAT facultativo)

INTRODUCCIÓN

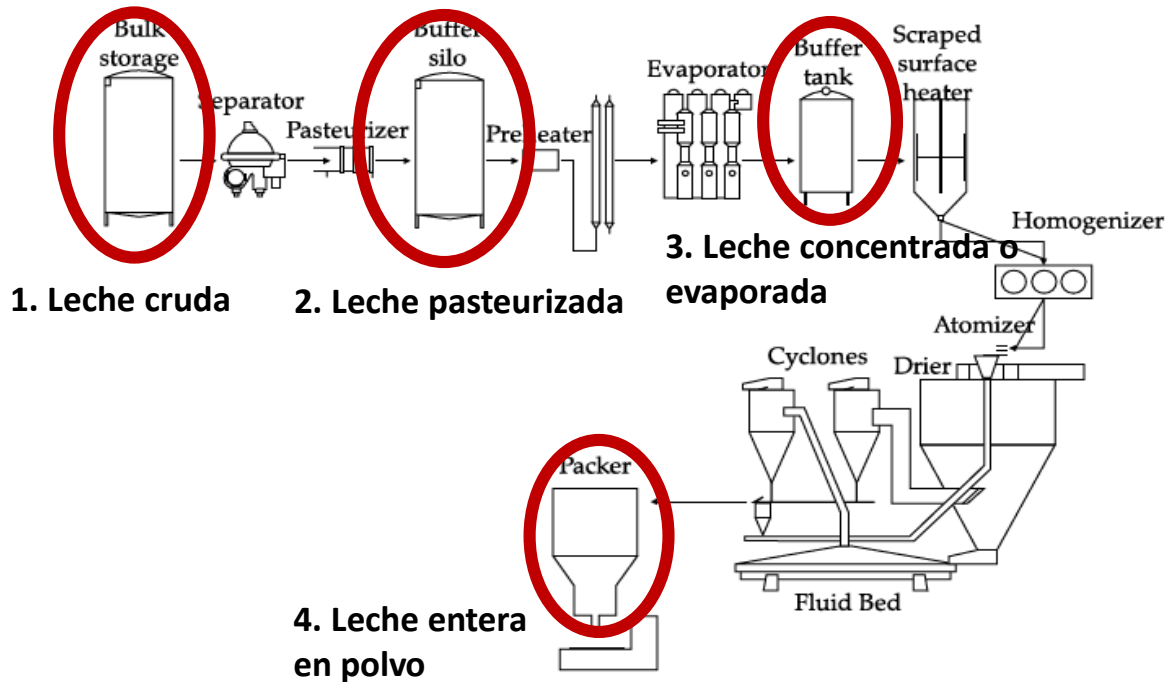
- Las especificaciones microbiológicas para LPE normalmente son definidas por el importador.
- En Uruguay aún no hay exigencia solicitada en el RBN al respecto.
- Algunos países presentan exigencia para recuento de microorganismos esporulados⁽¹⁾:
 - Rango aceptable de esporas mesófilas: <2000 /g y termófilas: <500/g (US Dairy Export Council).
 - Rango aceptable de *B.cereus* (FSANZ) <100 UFC/g en 4 muestras (n=5) o <1000 UFC/g en 1 muestras (n=5).
 - Rango aceptable de *B.cereus* (EC) <50 UFC/g en 4 muestras (n=5) o <500 UFC/g en 1 muestras (n=5).

(1) McHugh, A.J.; Feehily, C.; Hill, C.; Cotter, P.D. (2017). Detection and enumeration of spore-forming bacteria in powdered dairy products. *Front. Microbiol. Sec. Food Microbiology. Vol.8* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00109>

OBJETIVO

Caracterizar la población de esporas presentes en diferentes etapas del proceso de secado de leche entera en polvo.



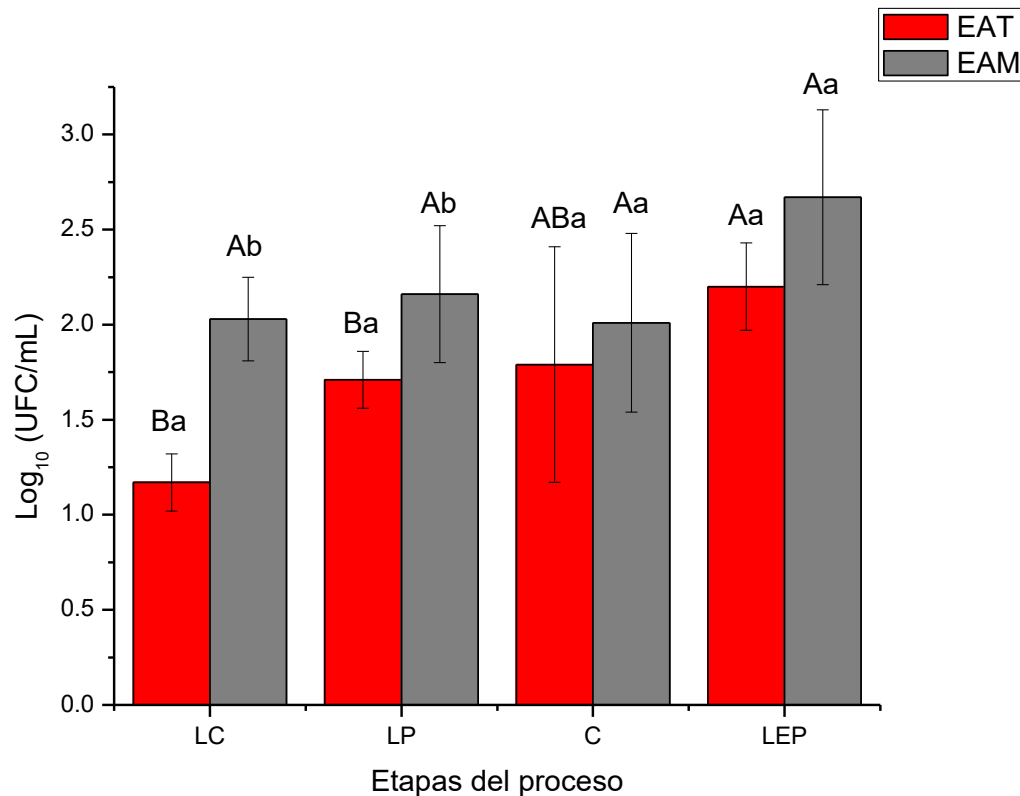


METODOLOGÍA

- 1) Cuantificación y aislamiento de poblaciones de esporas aerobias y termófilas.
- 2) Determinación cualitativa de actividades enzimáticas proteolítica, lipolítica, lecitinasa y β -galactosidasa en todos los aislamientos.
- 3) Identificación mediante selección por RAPD-PCR, secuenciación parcial de gen 16S (fragmento 1500 pb) y comparación utilizando base de datos de BLAST (NIH).

RESULTADOS

- Se obtuvieron 323 aislamientos de microorganismos esporulados aerobios mesófilos y termófilos Gram +/catalasa +.



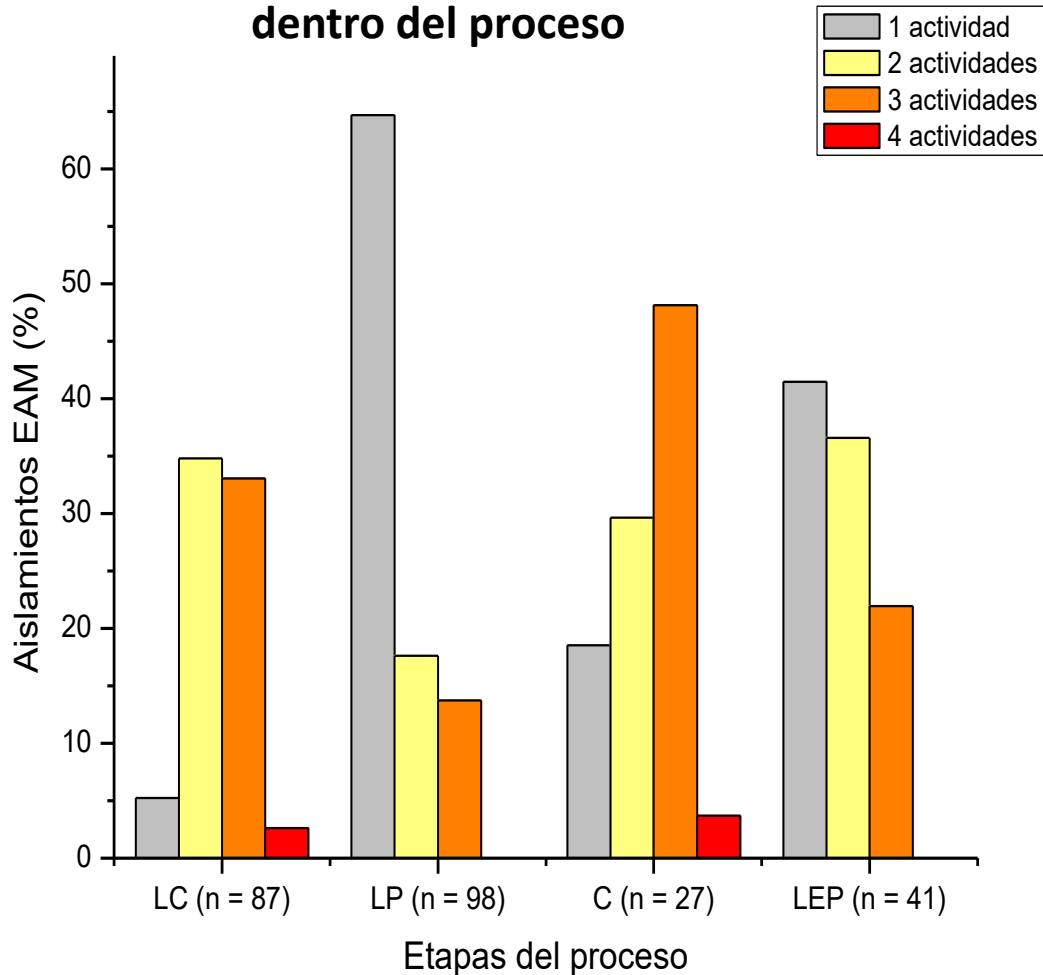
- El recuento de esporas mesófilas se mantuvo constante durante todo el proceso.
- El recuento de esporas termófilas (EAT) aumentó hacia el final del proceso alcanzando recuentos similares al de mesófilas.

Las diferencias significativas ($p < 0.05$) se expresan con letras mayúsculas para

los diferentes puntos del proceso y con minúsculas dentro de cada punto.

RESULTADOS

Actividades enzimáticas de esporas mesófilas dentro del proceso



Las actividades se expresan como porcentaje del total de aislamientos que presentan 1,2 3 o 4 actividades



Actividad proteolítica



Actividad lipolítica



Actividad lecitinasa

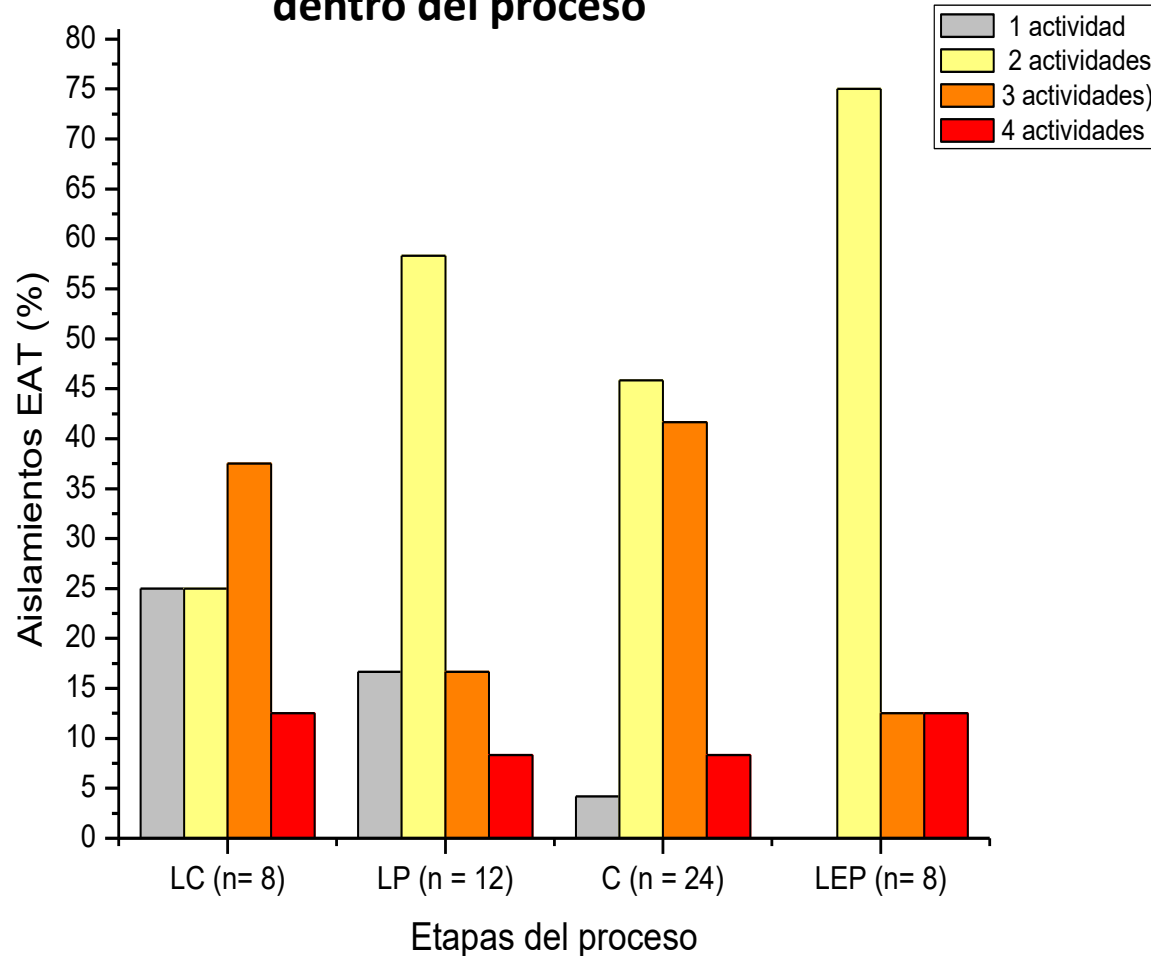


Actividad β -galactosidasa

En la etapa de concentración ocurre una selección de aislamientos con capacidad de deterioro aumentada (2 y 3 actividades).

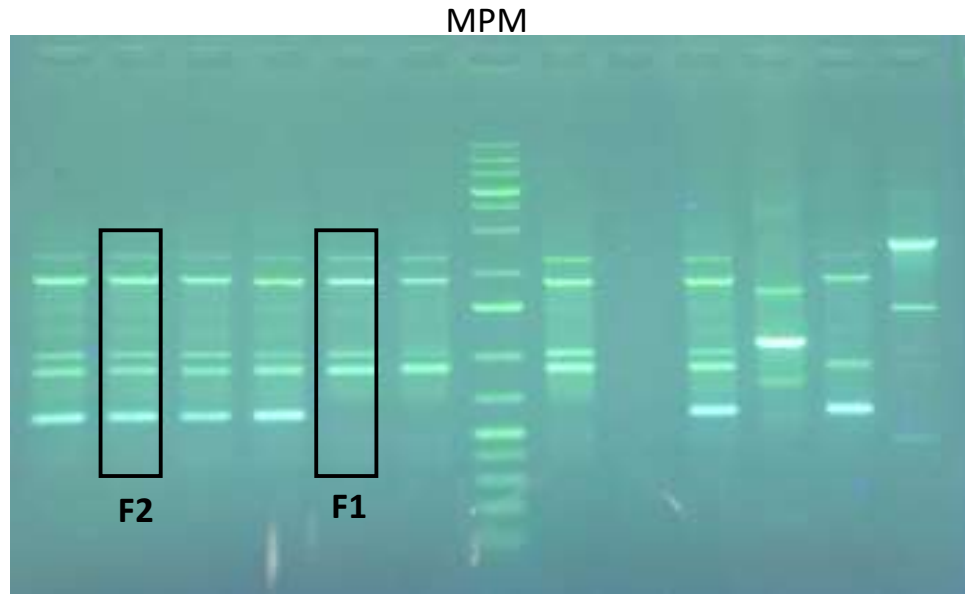
RESULTADOS

Actividades enzimáticas de esporas termófilas dentro del proceso



- Se observan aislamientos con 3 y 4 actividades que permanecen a lo largo de todo el proceso.
- Aumentan los aislamientos con 2 actividades enzimáticas luego del pasaje por el concentrado.

RESULTADOS



Ejemplo ilustrativo de perfiles de amplificación RAPD-PCR para *B.licheniformis*. Los perfiles se obtuvieron utilizando el primer OPR13.

Se obtuvieron 75 perfiles de OPR 13 diferentes a partir de 190 aislamientos del 2° y 4° muestreo que se enviaron a secuenciar mediante 16S.

Se identificó el 83 % (111) de los aislamientos correspondientes al 1° y 3° muestreo, de los cuales el 59 % (77) fueron identificados como *B.licheniformis*.

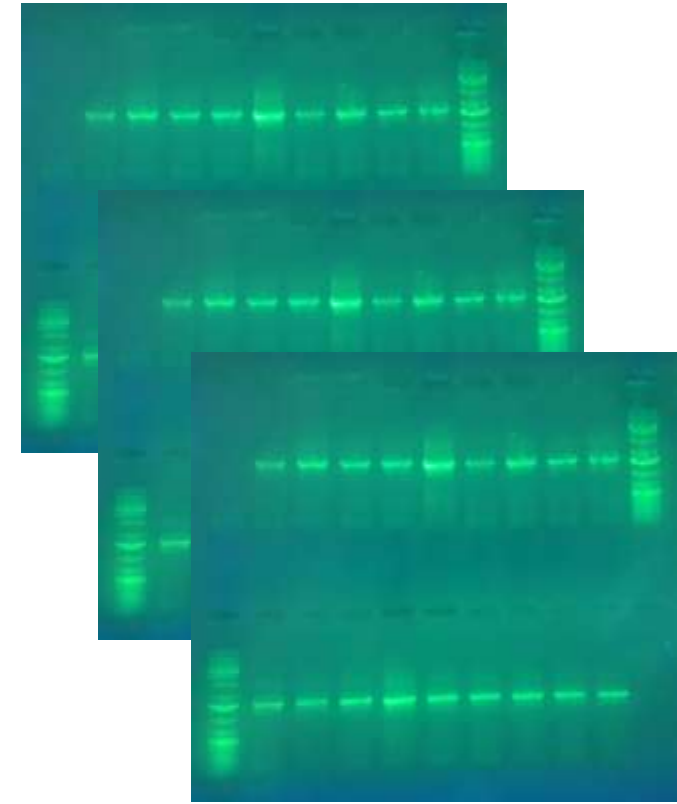
El perfil de cepas de *B.licheniformis* mostró un amplio predominio de la cepa F2 (76 % del total).

CONCLUSIONES

- La población de esporas de aerobios termófilos aumenta hacia el final del proceso e iguala a la de aerobios mesófilos.
- Se observa una selección de aislamientos con mayor capacidad de deterioro de esporulados mesófilos y termófilos hacia el final del proceso.
- La zona del evaporador muestra un aumento en la diversidad de especies lo que supone un punto potencial de contaminación acompañado de una mayor liberación de enzimas hacia el producto final.
- La cepa F2 de *B. licheniformis* se aisló en todas las etapas y muestreos realizados por lo que se perfila como una buena candidata para futuros estudios.

PERSPECTIVAS

Estudiar el efecto de diferentes concentraciones de esporas seleccionadas sobre propiedades tecnológicas de la leche entera en polvo reconstituida y simulando procesamiento UAT.



MICRO TEAM UTEC

Dra. Nora Techeira
Lic. Inés Infante
Dra. Andrea Garay
Dr. Tomás López

APOYO FINANCIERO



LICENCIATURA EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE LÁCTEOS



AGRADECIMIENTOS

Dra. Stella Reginensi
Dra. Marcela González
Mag. Jorge Olivera



Unidad de Tecnología de Alimentos. Facultad de Agronomía
UdelaR- Montevideo



**MUCHAS
GRACIAS**

