

## DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE REDUCCIÓN DECIMAL “D” DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROBIÓTICAS

Pérez-Chabela, M.L. <sup>a,\*</sup>, Totosaus A <sup>b</sup>, Hernández-Alcántara, A.M. <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Delegación Iztapalapa. C.P.09340, México, D.F., México.

<sup>b</sup> Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Laboratorio de Alimentos, Av. Tecnológico esq. Av. Central s/n, Ecatepec de Morelos, C.P. 55210, Estado de México, México. \* [lpch@xanum.uam.mx](mailto:lpch@xanum.uam.mx)

### RESUMEN:

Las bacterias lácticas se consideran mesófilas, sin embargo, cuando son sometidas a estrés pueden sobreexpresar unas proteínas llamadas proteínas del choque térmico, dando propiedades de termorresistencia a estas bacterias. El objetivo de este estudio fue conocer la capacidad de termorresistencia de bacterias lácticas probióticas para que puedan ser utilizadas en productos cárnicos cocidos. A seis cepas de bacterias lácticas previamente identificadas como probióticas, se determinó su resistencia térmica a diferentes temperaturas durante la fase estacionaria de crecimiento. Se utilizó calorimetría diferencial de barrido para detectar la transición en los componentes celulares. 4 cepas mostraron valores D cercanos a un minuto a una temperatura de 70°C, una cepa a 75°C y otra a 68°C. Estos resultados están relacionados con un alta temperatura de desnaturalización térmica, o bien, con valores altos de entalpía de desnaturalización térmica, indicando un daño celular a nivel de ribosomas, debido a la presencia de una señal exotérmica a una temperatura superior a los 90°C. Las bacterias lácticas termotolerantes probióticas pueden utilizarse como un cultivo iniciador en productos cárnicos cocidos, dándole un valor agregado a estos productos tan consumidos en nuestro país.

### ABSTRACT:

Lactic acid bacteria are mesophilic microorganisms, although, when they are under stress situation, thermal shock proteins are over-expressed giving thermotolerant properties to these bacteria. The aim of this study was to evaluate the thermotolerance capacity of probiotic lactic acid bacteria to be employed in cooked meat products. Thermal resistance at different temperatures during stationary phase of six strains previously identified as probiotic were performed. DSC was employed to detect cellular components transitions. Four strains showed D values close to one minute at 70 °C, one strain at 75 °C and the other one at 68 °C. These results had a relationship with either a higher denaturation temperature, or with a higher thermal denaturation enthalpy, indicating that a cellular damage can be observed at ribosomal level since an exothermic signal was detected above 90 °C. Probiotic thermotolerant lactic acid bacteria can be employed as started culture in cooked meat products, giving an added value to this highly consumed products in Mexico.

### Palabras clave:

Tiempo de Reducción Decimal (valor D), Termotolerancia, Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

### Keyword:

Thermal tolerance (D- value), Thermotolerance, Differential Scanning Calorimetry (DSC).

**Área:** Microbiología y Biotecnología.

### INTRODUCCIÓN

La temperatura es uno de los principales factores que influyen en la viabilidad y desarrollo de los microorganismos, al producir una gran variedad de cambios estructurales y funcionales que pueden conllevar a un descenso progresivo en el número de células viables o su muerte tras una exposición prolongada a temperaturas por encima de la óptima. La termorresistencia de un

microorganismo está determinada por su capacidad para soportar un tratamiento térmico máximo.

Algunos factores que afectan la resistencia térmica de las bacterias son la fase de crecimiento de células en estudio, el pH del medio, la concentración de sales, azúcares, grasas; la disminución del  $A_w$  y la combinación con otros agentes como la presión, congelación, descongelación; entre otros (Stumbo, 1973). Los métodos tradicionales para estudiar los mecanismos de inactivación y muerte térmica, se han enfocado en establecer las alteraciones que el calor produce en componentes celulares como las proteínas, ARN y la irreversible desnaturalización de las membranas y/o ácidos nucleicos, además de ciertas enzimas (Hurst, 1977). Las transiciones en los componentes celulares pueden detectarse mediante la calorimetría diferencia de barrido (DSC), a través de un patrón de picos que muestran el proceso de desnaturalización como una función del tiempo y temperatura (Lepock *et al.*, 1990; Mackey *et al.*, 1991).

El tiempo de reducción decimal (valor D), es el tiempo necesario para destruir el 90% de la población microbiana de un determinado microorganismo a una temperatura dada, y se ha usado como modelo de inactivación bacteriana dado que puede ser extrapolado a un proceso industrial (Lee and Kaletunc, 2002; Vasan *et al.*, 2013). Por ello, el determinar si las bacterias ácido lácticas son capaces de sobrevivir las temperaturas de pasteurización, abre la posibilidad de poder emplearlas en productos que involucren un tratamiento térmico.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Determinación del valor D

Se evaluó la resistencia térmica de seis cepas de bacterias ácido lácticas (BAL), UAM 17, UAM 18, UAM 21A, UAM 21B, UAM 22A y UAM 22B, las cuales fueron crecidas en caldo MRS hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, debido a que se ha reportado una mayor resistencia térmica durante esta etapa (Stumbo, 1973). Se llevó a cabo un escaneo de temperaturas en un rango de 65-80°C, para determinar la temperatura máxima de sobrevivencia bacteriana.

Establecida la temperatura de trabajo, se determinó el tiempo necesario para reducir la población microbiana en un ciclo logarítmico, mediante la prueba de tolerancia térmica. Se colocaron 4 mL de cultivo en fase estacionaria en tubos con tapón de rosca, sometidos a calentamiento en baños controlados a la temperatura seleccionada para cada bacteria y monitoreando la sobrevivencia bacteriana mediante cuenta en placa durante el tiempo que duro el tratamiento térmico. Para determinar el valor D, se aplicó el modelo representado en la siguiente relación:

$$D = \frac{x}{\log \frac{N_0}{N_x}}$$

donde: x corresponde al tiempo de tratamiento térmico,  $N_0$  la cuenta inicial de microorganismos, y  $N_x$  la cuenta de microorganismos sobrevivientes.

### Resistencia térmica de las BAL por DSC

Las BAL fueron crecidas en caldo MRS a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta alcanzar una densidad óptica de 1.0 (Lepock *et al.*, 1990), posteriormente se efectuó una dilución 1:10 con agua estéril para poder ser analizada en el calorímetro. Con una microjeringa de 50  $\mu\text{l}$ , se colocaron 20  $\mu\text{l}$  de la dilución bacteria en el portamuestras especial para el calorímetro, posteriormente fue sellado herméticamente con ayuda de la engrapadora y se colocó en el equipo (Calorímetro DSC1 Mettler-Toledo) junto con un portamuestras referencia, comparando los resultados con un portamuestras conteniendo 20  $\mu\text{l}$  de caldo MRS. Se programó el calentamiento, realizando una rampa de temperatura con incrementos de  $10^\circ\text{C}$  cada min. El barrido inició cuando la muestra y la referencia alcanzaron la misma temperatura ( $30^\circ\text{C}$ ), finalizando a una temperatura de  $200^\circ\text{C}$ . Se registraron gráficamente los cambios ocurridos a las cepas durante los incrementos de temperatura mediante el software STAR<sup>e</sup> System, calculando las temperaturas (inicio, máximo y final) de los picos significativos de transición térmica, calculando también el área bajo la curva (entalpía de desnaturalización térmica).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación del valor D

De las bacterias estudiadas, cinco presentaron resistencia térmica a  $70^\circ\text{C}$ ; obteniéndose los máximos valores D para las cepas UAM 17 y UAM 22A, con 1.8 min y 1.19 min respectivamente; tres cepas presentaron valores  $D_{70^\circ\text{C}}$  menores a 1.0 min (UAM 18, UAM 21B y UAM 22B). Por su parte la cepa UAM 21A presentó una resistencia térmica cercana a los  $70^\circ\text{C}$ , con un valor  $D_{68^\circ\text{C}}$  de 0.44 min, mostrando la menor termorresistencia; mientras que la cepa UAM 22B presentó un valor  $D_{75^\circ\text{C}}$  de 0.52 min soportando una mayor temperatura de calentamiento.

Tabla IV. Valores D determinados para las BAL

Cepa BAL	Valor DT( $^\circ\text{C}$ ) (min)
UAM 17	$D_{70^\circ\text{C}} = 1.80$
UAM 18	$D_{70^\circ\text{C}} = 0.50$
UAM 21A	$D_{68^\circ\text{C}} = 0.44$
UAM 21B	$D_{70^\circ\text{C}} = 0.88$
UAM 22A	$D_{70^\circ\text{C}} = 1.19$
UAM 22B	$D_{70^\circ\text{C}} = 0.86$ $D_{75^\circ\text{C}} = 0.52$

Martínez *et al.*, (2003), encontraron que los valores  $D_{70^\circ\text{C}}$  para una cepa de *E. faecium* en fase estacionaria variaba entre 0.53 min y 0.41 min, dependiendo de la temperatura a la cual se realizará el crecimiento; mostrándose una mayor resistencia térmica cuando la temperatura de crecimiento oscilaba entre  $20^\circ\text{C}$  y  $30^\circ\text{C}$ , con valores  $D = 0.83$  min y  $D = 0.79$  min. Estos valores, pueden equipararse con los obtenidos en este trabajo, sin embargo para algunas de las BAL la resistencia térmica fue mayor. Por su parte, algunas cepas de *E. coli* patógenas han mostrado una menor resistencia térmica presentando valores  $D_{58^\circ\text{C}}$  que se encuentran entre los 0.44 min y 1.42 min dependiendo del serotipo estudiado, disminuyendo esta resistencia térmica observada a  $63.5^\circ\text{C}$  (Vasan *et al.*, 2013).

### Resistencia térmica de las BAL por DSC

La Tabla II muestra los resultados de calorimetría diferencial de barrido para las diferentes cepas. El rango de inicio de la desnaturalización de componentes celulares fue de 95-98 °C, excepto la cepa UAM18 que tuvo una temperatura inicial de 140.37 °C. Sin embargo, a pesar de la mayor temperatura de inicio de esta cepa, el rango de temperaturas fue el menor (141.37 como máximo, 145.93 final). Esto podría estar relacionado con el valor  $D_{70^{\circ}\text{C}}$  de 0.5 min. Cambios térmicos en los componentes celulares son detectados por DSC, donde las temperaturas de inicio, máximo y final forman un pico que al ser integrado da la entalpia de desnaturalización térmica, o bien, el 'trabajo' necesario durante la desnaturalización. Bacterias con mayores valores  $D_{70^{\circ}\text{C}}$ , como UAM17 y UAM 21B, presentan los valores mayores de entalpia, significando que la mayor resistencia térmica está relacionada con la mayor energía que se necesita para desnaturalizar los componentes celulares. Los valores D están también en relación con la máxima temperatura de desnaturalización. Por ejemplo, la cepa UAM22A tuvo un valor  $D_{70^{\circ}\text{C}}$  de 1.19, y aunque la entalpia es menor a otras, el pico de desnaturalización tuvo la mayor temperatura (121.06 °C). De este modo, el valor D está relacionado ya sea con un alta temperatura de desnaturalización térmica, o bien, con valores altos de entalpia de desnaturalización térmica.

Tabla II. Temperaturas de transición y entalpias de desnaturalización térmicas para las cepas de bacterias ácido lácticas.

Cepa	Temperatura de transición térmica (°C)			Entalpia de desnaturalización térmica (mW °C)
	Inicio	Máximo	Final	
UAM 17	95.00	103.70	119.85	-6135.68
UAM 18	140.37	141.37	145.93	-0.10000
UAM 21 <sup>a</sup>	96.71	108.03	124.32	-6736.85
UAM 21B	95.71	104.86	120.92	-5816.26
UAM 22 <sup>a</sup>	97.72	121.06	133.06	-4626.35
UAM 22B	98.07	121.06	132.88	-4671.26

Se ha reportado que en los microorganismos el daño celular varía con respecto al tipo estrés a que sean sometidos, de esta manera, el calor, la congelación o un shock osmótico se encuentran relacionados con un daño a nivel de membrana, la pérdida de iones como el potasio y otros organelos celulares que ocasionan una disminución en la viabilidad. Particularmente para las bacterias Gram (+), se ha reportado daño en los ribosomas y la inactivación de enzimas específicas o de transporte, como consecuencia de un daño por calor o congelación (Anderson *et al.*, 1991). Para todas las BAL estudiadas, las energías asociadas a un cambio de transición los 100°C, por lo cual se podría establecer el efecto que tiene el calor en la desnaturalización de componentes celulares como el DNA, los ribosomas y posiblemente un daño en membrana (Lepock *et al.*, 1991).

### CONCLUSIONES

Los resultados demostraron que las bacterias ácido lácticas estudiadas poseen la capacidad de ser termotolerantes, debido a que la temperatura requerida para reducir la población microbiana fue entre los 68-70°C, relativamente alta, esto relacionado ya sea con un alta temperatura de

desnaturalización térmica, o bien, con valores altos de entalpia de desnaturalización térmica. Los resultados indican la posibilidad de que puedan ser empleadas como cultivos iniciadores en productos cárnicos que lleven un tratamiento térmico.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Anderson W, Hedges N, Jones M, Cole M. 1991. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* studied by Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Gut Microbiology* 137: 1419-1424.
- Hurst A. 1977. Bacterial injury: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 23:935-944.
- Lee J, Kaletunc G. 2002. Calorimetric determination of inactivation parameters of microorganisms. *Journal of Applied Microbiology* 93:178-189.
- Lepock J, Frey H, Inniss W. 1990. Thermal analysis of bacteria by differential scanning calorimetry: relationship of protein denaturation in situ to maximum growth temperature. *Biochimica et Biophysica Acta* 1055:19-26.
- Mackey BM, Miles CA, Parsons SE, Seymour DA. 1991. Thermal denaturation of whole cells and cell components of *Escherichia coli* examined by Differential Scanning Calorimetry. *Journal of General Microbiology* 137:2361-2374.
- Martínez S, López M, Bernardo A. 2003. Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Letters in Applied Microbiology* 37: 475-481.
- Stumbo CR. 1973. Thermobacteriology as Applied to Food Processing. In *Thermobacteriology in Food Processing*, Stumbo CR (ed). Academic Press: New York, pp.47-115.
- Vasan A, Mei Leong W, Ingham SC, Ingham BH. 2013. Thermal Tolerance Characteristics of Non-O157 Shiga Toxigenic Strains of *Escherichia coli* (STEC) in a Beef Broth Model System are similar to those of O157:H7 STEC. *Journal of Food Protection* 76:1120-1128