



unopar

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LEITE E DERIVADOS

FLÁVIA DE ALMEIDA BERGONSE PEREIRA

**CAPACIDADE LIPOLÍTICA DE *Pseudomonas fluorescens* E  
*Pseudomonas putida* ISOLADAS DO LEITE CRU  
REFRIGERADO**

---

Londrina  
2016

FLÁVIA DE ALMEIDA BERGONSE PEREIRA

**CAPACIDADE LIPOLÍTICA DE *Pseudomonas fluorescens* E  
*Pseudomonas putida* ISOLADAS DO LEITE CRU  
REFRIGERADO**

Dissertação apresentada à UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

Orientadora: Profa. Dra. Elsa Helena Walter de Santana

Londrina  
2016

FLÁVIA DE ALMEIDA BERGONSE PEREIRA

**CAPACIDADE LIPOLÍTICA DE *Pseudomonas fluorescens* E  
*Pseudomonas putida* ISOLADAS DO LEITE CRU  
REFRIGERADO**

Dissertação apresentada à UNOPAR, no Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, área de concentração Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

---

Profª Dra. Elsa Helena Walter de Santana  
Universidade Norte do Paraná

---

Profª Dra. Cínthia Hoch Batista de Souza  
Universidade Norte do Paraná

---

Dra. Roberta Claro da Silva  
Universidade de São Paulo

Londrina, 29 de fevereiro de 2016.

Dedico este mestrado à minha família, meu pai, minha mãe e esposo, que sempre me deram apoio em todas as minhas decisões e escolhas. Em especial a meu pai Antônio, que um dia sonhou em me ver mestre, e mesmo longe sempre esteve ao meu lado.

À vocês minha gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por esta oportunidade, pela força e coragem ao longo deste caminho.

Agradeço a minha orientadora Elsa, pelo incentivo, apoio e empenho dedicado a este trabalho.

Aos professores deste programa pelos ensinamentos compartilhados. Em especial, às professoras Joice e Cíntia pelas ideias, conhecimentos e grande ajuda.

À professora Fernanda Gonzales Paião pela importante participação em nosso trabalho.

À amiga Flávia Kawahigashi pela dedicação e esforço durante todos os momentos desta pesquisa.

À amiga Ana Cristina Pinesso pelas incansáveis horas de explicações e imenso carinho.

Aos amigos José Renato e Geyci pela motivação constante e pela amizade construída durante esses anos.

Aos amigos do mestrado: Carol, Ana Lydia, Izaura, Orlando, Fernando e João Paulo pela amizade sincera e companheirismo. Em especial à querida amiga Vanessa Ribeiro França que permanece sempre viva em minha memória.

Aos colaboradores: Sâmera e Ítalo, sempre dispostos em ajudar.

Agradeço especialmente aos meus pais, Antônio e Maria Célia, pelo amor incondicional, carinho e principalmente por sempre se fazerem presentes na minha vida.

Agradeço carinhosamente ao meu esposo João Paulo, por me proporcionar essa oportunidade e por me manter calma quando a angústia parecia tomar conta. Sem você nada disso seria possível.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

PEREIRA, F. A. B. **Capacidade lipolítica de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* isoladas de leite cru refrigerado**. 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) - UNOPAR, Unidade Piza, Londrina, 2016.

## RESUMO

O processo de conservação do leite cru em temperaturas de refrigeração por períodos superiores a 48 horas, favorece o crescimento de micro-organismos psicotróficos, que desenvolvem-se em temperaturas abaixo de 7°C. Essas bactérias geralmente são eliminadas durante o tratamento térmico do leite, porém suas enzimas extracelulares são termorresistentes. *Pseudomonas* spp. é relatado como o gênero mais comum encontrado no leite cru mantido sob refrigeração e *Pseudomonas fluorescens*, a espécie predominante, sendo caracterizada por sua intensa capacidade lipolítica. Embora *Pseudomonas fluorescens* seja mais associada à deterioração do leite, outra espécie como *Pseudomonas putida*, é comum e também promove lipólise neste meio. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade lipolítica destas duas espécies psicotróficas, isoladas de leite cru refrigerado de produtores da região de Londrina-PR. As cepas estudadas tiveram o gênero e a espécie confirmadas pela técnica de Reação em Cadeia Polimerase (PCR). Os dois isolados identificados como *P. fluorescens* e *P. putida* foram recuperados com inoculação em 200 mL de leite em pó desnatado reconstituído a 12% (21°C/48 h). As populações foram determinadas e diluições decimais realizadas até  $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/ mL. O estudo foi realizado a partir de alíquotas de 200 mL de leite em pó integral reconstituído a 12% e esterilizado a 121°C/ 15 minutos, inoculados com as três populações pré-determinadas e incubados a 2°C, 4°C, 8°C por 96 horas. Para contagem das espécies utilizou-se o meio de cultura *Pseudomonas* ágar base com adição de suplemento CFC (Cetrimida 5mg, Fucidina 5mg, Cefaloridina 25mg) (30°C/ 48 h). A avaliação do comportamento lipolítico foi determinada pelo método Lipo R, onde verificou-se que leites inoculados com diferentes populações de *P. putida* ( $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL) podem ser estocados a 2°C, 4°C ou 8°C por um período de até 72 h (3 dias), não ocorrendo dentro desse intervalo de tempo, aumento significativo ( $p > 0,05$ ) na concentração de ácidos graxos livres. Em amostras inoculadas com *P. fluorescens* os maiores índices de lipólise ( $p < 0,05$ ), ocorreram em inóculos  $10^2$  e  $10^5$  UFC/mL a 8°C, onde o tempo de estocagem influenciou no aumento da concentração desse lipídeo. Já em populações iniciais de  $10^6$  UFC/mL de *P. fluorescens* o tempo de incubação teve influência sobre a concentração de ácidos graxos a partir de 4°C. Quando os dois micro-organismos estudados foram comparados, verificou-se que existe diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na produção de ácidos graxos livres entre as duas espécies, em todos os inóculos, temperaturas e momentos testados.

**Palavras-chave:** Lipase. Lácteo. Gram negativo. Atividade enzimática.

PEREIRA, F. A. B. **Lipolytic behavior of *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* isolated from refrigerated raw milk.** 2016. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) - UNOPAR, Unidade Piza, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

The raw milk preservation process at refrigerator temperatures for periods exceeding 48 hours, favors the growth of psychrotrophic micro-organisms, which thrive in temperatures below 7°C. These bacteria are usually eliminated during the thermal treatment of milk, but their extracellular enzymes are heat resistant. *Pseudomonas* spp. is reported as the most common genus found in refrigerated raw milk and *Pseudomonas fluorescens*, the predominant species, characterized by its intense lipolytic capacity. Although *Pseudomonas fluorescens* is more associated with the deterioration of milk, other species such as *Pseudomonas putida*, are common and also promote lipolysis in this medium. The objective of this study was to evaluate the ability of these two lipolytic psychrotrophic species, isolated from refrigerated raw milk producers of Londrina -PR, checking their potential for deterioration. The strains studied had the genus and species confirmed by Reaction technique polymerase chain (PCR). The two strains identified as *P. fluorescens* and *P. putida* were recovered inoculated in 200 mL of skimmed milk powder reconstituted at 12% (21°C / 48 h). Populations were determined and decimal dilutions made up to 10<sup>2</sup>, 10<sup>5</sup> and 10<sup>6</sup> CFU/mL. The study was carried out from 200 mL aliquots of milk powder reconstituted at 12% and sterilized at 121°C/15 minutes, inoculated with three pre-specified populations and incubated at 2°C, 4°C, 8°C for 96 hours. To count the species, we used *Pseudomonas* agar base with CFC supplement (Cetrimida 5mg, Fucidina 5mg, Cefaloridina 25mg) (30°C/48 h). The evaluation of lipolytic performance was measured by Lipo R method, which verified that milk inoculated with different populations of *P. putida* (10<sup>2</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> CFU/mL) can be stored at 2°C, 4°C or 8°C for 72 h (3 days), not occurring within that period of time, significant difference (p > 0.05) in the concentration of free fatty acids. In samples inoculated with *P. fluorescens* higher rates of lipolysis (p < 0.05), occurred at lower inoculum (10<sup>2</sup> and 10<sup>5</sup> CFU / mL) at 8°C, where the storage time influenced the increase of the concentration of this lipid. As in the initial population of 10<sup>6</sup> CFU/mL *P. fluorescens* incubation time had an influence on the concentration of fatty acids from 4°C. Comparing the two micro-organisms studied, we point out that there is significant difference (p < 0.05) in the production of free fatty acids between the two species, in all populations, temperatures and times tested.

**Key words:** Lipase. Milk. Gram negative. Enzymatic activity.





## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
2.1	QUALIDADE E PROCESSO DE REFRIGERAÇÃO DO LEITE CRU.....	12
2.2	PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS PSICROTRÓFICOS NO LEITE ....	14
2.3	CRESCIMENTO DE PSICROTRÓFICOS .....	18
2.4	ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	18
2.5	ATIVIDADE LIPOLÍTICA NO LEITE .....	20
2.5.1	Lipase-Lipoproteica (LLP) .....	21
2.5.2	Lipases Bacterianas .....	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>25</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b> .....	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>55</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>56</b>
	Anexo 1 - Primeira etapa (extração) da dosagem de ácidos graxos livres no leite, determinada pelo método Lipo R (MAHIEU, 1984).....	57
	Anexo 2 - Segunda etapa (lavagem) da dosagem de ácidos graxos livres no leite, determinada pelo método Lipo R (MAHIEU, 1984).....	58
	Anexo 3 - Terceira etapa (titulação) da dosagem de ácidos graxos livres no leite, determinada pelo método Lipo R (MAHIEU, 1984).....	59

## 1 INTRODUÇÃO

Do ponto de vista biológico, o leite é um alimento rico em proteínas, sais minerais, carboidratos, gorduras e vitaminas, sendo considerado um dos alimentos mais completos para dieta humana (BORGES; BRANDÃO; PINHEIRO, 1989; GUERREIRO et al., 2005). Este produto está sujeito a uma série de alterações devido à sua alta perecibilidade, merecendo atenção especial durante sua produção, beneficiamento, comercialização e consumo (FURTADO et al., 2004).

Visando a melhoria da qualidade, a Instrução Normativa n.62, de 29 de dezembro de 2011, estabelece que o leite deve ser resfriado em tanques de refrigeração por expansão direta ou em tanques de imersão, devendo ser recolhido e transportado em caminhões isotérmicos até o laticínio em no máximo 48 horas (BRASIL, 2011). Porém, a refrigeração por períodos prolongados pode comprometer a qualidade do leite cru, devido à possibilidade de seleção de bactérias psicotróficas (DOMARESKI et al., 2010; MU; DU; BAI, 2009; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006) que são capazes de desenvolver-se em temperaturas abaixo de 7°C (ARCURI, 2003; FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992). Dessa forma, a estocagem de leite cru refrigerado por períodos superiores a 48 horas torna-se preocupante, pois a contagem de micro-organismos psicotróficos aumenta com o tempo de armazenamento, refletindo negativamente na qualidade do leite e de seus derivados (SANTOS et al., 2009).

Contagens elevadas de bactérias psicotróficas presentes no leite cru estão diretamente relacionadas às más condições higiênicas na produção, condições precárias de ordenha, ao tempo e temperatura em que o leite é armazenado (ARCURI et al., 2008; GUERREIRO et al., 2005; KUMARESAN; ANNALVILLI; SIVAKUMAR, 2007; SANTANA et al., 2001). Uma contagem baixa de psicotróficos é fundamental para qualidade do produto, pois a atividade metabólica desses micro-organismos causa alterações bioquímicas nos constituintes do leite (ARCURI et al., 2008), como a degradação de gorduras, de proteínas ou de carboidratos (COUSIN, 1982), limitando sua vida de prateleira e de seus derivados lácteos (ARCURI et al., 2008; SANTOS et al., 2009). Assim, como a refrigeração não inibe a multiplicação de psicotróficos, deve-se evitar a contaminação do leite, adotando boas práticas de manejo em todo processo produtivo (SANTANA et al., 2001).

Entre os organismos psicrotróficos, o gênero mais frequentemente isolado do leite cru refrigerado é o *Pseudomonas* spp. (ARCURI et al., 2008; FAGUNDES et al., 2006; JONGHE et al., 2010; KUMARESAN; ANNALVILLI; SIVAKUMAR, 2007; MU; DU; BAI, 2009; MUIR, 1996; SANTOS et al., 2009), pois apresenta melhor capacidade de multiplicação e crescimento sob refrigeração quando comparado com outras bactérias Gram-negativas (KUMARESAN; ANNALVILLI; SIVAKUMAR, 2007).

Este gênero microbiano, além de ser o mais prevalente, produz, em sua maioria, enzimas extracelulares (ARCURI et al., 2008; JONGHE et al., 2010; KUMARESAN; ANNALVILLI; SIVAKUMAR, 2007; MU; DU; BAI, 2009; SORHAUG; STEPANIAK, 1997; TEBALDI et al., 2008; VIDAL-MARTINS et al., 2005) que resistem às temperaturas comumente utilizadas no processamento térmico do leite e derivados (GRIFFITHS, 1990; MAHIEU, 1991; SANTOS et al., 2009), mantendo-se ativas e resultando em perdas econômicas importantes (MAHIEU, 1991; JONGHE et al., 2010). A síntese de lipases e proteases termorresistentes ocorre quando a população de psicrotróficos atinge uma contagem entre  $10^6$  a  $10^7$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL (COSTA et al., 2002; MAHIEU, 1991; MUIR, 1996). Para Santana et al. (2001) contagens de psicrotróficos superiores a  $5 \times 10^6$  UFC/mL são suficientes para promover alterações organolépticas sensíveis no leite e a partir de  $10^6$  UFC/mL já permitem modificações no sabor, odor e consistência, resultando na perda de qualidade do produto processado e diminuição da vida de prateleira (JONGHE et al., 2010; MU; DU; BAI, 2009; NÖRNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009). Os produtos cujas características podem sofrer essas alterações são o leite pasteurizado, leite UHT (Ultra High Temperature), manteigas, queijos e iogurtes (ARCURI, 2003; SORHAUG; STEPANIAK, 1997).

Mu, Du e Bai (2009) afirmam que *Pseudomonas fluorescens* é predominante sobre as demais espécies do gênero e estão especialmente associadas às intensas lipólise e proteólise do leite, tornando-se, muitas vezes, a microbiota dominante durante o armazenamento do leite cru refrigerado. Arcuri et al. (2008), também constataram predomínio desse gênero/espécie em leite cru refrigerado e identificaram dentre outras espécies, três isolados de *Pseudomonas putida* que apresentaram atividades lipolítica/proteolítica, indicando que, embora, *P. fluorescens* seja mais comumente associada a deterioração do leite, outras espécies também são comuns e causam prejuízo neste meio.

Portanto, parte dos problemas tecnológicos na indústria de laticínios são decorrentes principalmente da contaminação da matéria-prima por psicrotróficos, que possuem a capacidade de sintetizar enzimas lipolíticas e proteolíticas. Dessa forma, torna-se importante a avaliação da capacidade lipolítica de cepas psicrotróficas de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* em diferentes tempos e temperaturas, a fim de determinar melhores condições de estocagem do leite cru refrigerado, aumentando a vida útil do produto processado e de seus derivados lácteos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 QUALIDADE E PROCESSO DE REFRIGERAÇÃO DO LEITE CRU

A produção leiteira no Brasil é caracterizada, de modo geral, por sua baixa qualidade, sendo identificada por altas contagens microbianas e de células somáticas (CATANIO et al., 2012; LANGONI et al., 2011; MARTINS et al., 2008; NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009), trazendo como consequência produtos de qualidade insatisfatória (NERO et al., 2005). Segundo Walstra, Wouters e Geurts (2006), a total garantia de qualidade envolve toda cadeia de produção do leite cru, e a obtenção de um produto com alta qualidade é uma constante preocupação para os laticínios, pois envolve várias etapas e produtores até chegar à indústria beneficiadora. Desta forma, técnicas profiláticas adotadas por Guerreiro et al. (2005), como lavagem de equipamentos e utensílios, higiene dos ordenhadores, lavagem da sala de ordenha e correto manejo dos animais foram medidas que contribuíram para qualidade microbiológica do leite. Para Fagundes et al. (2006), a qualidade microbiológica do leite é fundamental como indicativo de saúde do rebanho e da higiene praticada nas propriedades, determinando, assim, o potencial nutricional do leite e de segurança alimentar.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituiu em 2002, a refrigeração nas propriedades e o transporte a granel em caminhões isotérmicos, através da Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002). A referida normativa entrou em vigor em 2005, trazendo avanços em termos de qualidade com a regulamentação dos parâmetros de contagem de mesófilos e de células somáticas. Foi substituída posteriormente pela IN 62 de 29 de dezembro de 2011 que renovou esses parâmetros e aprovou o regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado, fixando requisitos mínimos de qualidade, limites físico-químicos e microbiológicos que este produto deve atender.

Baseando-se nas legislações IN 51 e IN 62, a temperatura para tanque de refrigeração por expansão direta deve ser igual ou inferior a 4<sup>o</sup> C, e em tanques de refrigeração por imersão deve ser igual ou inferior a 7<sup>o</sup>C. A temperatura para conservação do leite nas propriedades rurais e tanques comunitários deve ser de 7<sup>o</sup>C, devendo ser transportado por caminhões isotérmicos e chegar à indústria

beneficiadora em até 48 horas a 10°C (BRASIL, 2002, 2011). No entanto, Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009), apontam que, dependendo do tempo de armazenamento, as temperaturas de 4°C para tanques individuais e 7°C para tanques comunitários, permitidas pela legislação (BRASIL, 2002, 2011), não seria suficiente para conter o alto grau de desenvolvimento das bactérias psicrotróficas no leite cru refrigerado.

Antes da adoção do processo de refrigeração a grande preocupação eram as bactérias mesófilas fermentadoras da lactose, que causavam acidificação em leite não refrigerado. O resfriamento pós ordenha visa diminuir a população destes micro-organismos que se multiplicam em temperatura ambiente (30°C) e podem ocasionar a perda da matéria-prima (ARCURI et al., 2006). Com o uso da refrigeração, associado a períodos mais longos de armazenamento, selecionou-se um outro tipo de microbiota deterioradora, denominada psicrotrófica (ARCURI, 2003; COUSIN, 1982; FAGUNDES et al., 2006; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006). Este grupo de bactérias é capaz de se multiplicar a temperaturas de 7°C ou menos, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992), que geralmente está na faixa de 20°C a 30°C (ARCURI, 2003; MUIR, 1996; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Muitas bactérias psicrotróficas produzem enzimas extracelulares (lipases e proteases) termorresistentes (TEBALDI et al., 2008; VIDAL-MARTINS et al., 2005), que degradam os componentes do leite e comprometem a qualidade do produto e de seus derivados lácteos (MUIR, 1996; SHAH, 1994). Estes micro-organismos podem ser provenientes do meio ambiente (solo, água, vegetação), da superfície do úbere/tetos e de equipamentos de ordenha higienizados inadequadamente (ARCURI, 2003; COUSIN, 1982; SUHREN, 1989; SANTANA et al., 2001; SANTOS; FONSECA, 2001; YAMAZI et al., 2010). A água residual presente em latões, tanques de expansão, equipamentos/utensílios de ordenha e mangueiras também são citados como importantes fontes na contaminação do leite cru refrigerado. Os autores quantificaram  $10^6$  UFC de psicrotróficos/cm<sup>2</sup> em superfícies de latões e  $2,6 \times 10^7$  psicrotróficos/mL na água residual dos latões e dos tanques de refrigeração, estimou-se que pelo menos 10% de bactérias presentes no leite são provenientes da água residual dos equipamentos, podendo comprometer sua qualidade (SANTANA et al., 2001).

Santos et al. (2009) e Pinto, Martins e Vanetti (2006) constataram que a população de psicrotróficos no leite cru refrigerado varia com o binômio

tempo/temperatura e sua estocagem por períodos prolongados reflete negativamente na qualidade do produto final.

Nero et al. (2005), destacam ainda, que apenas a refrigeração nas propriedades e transporte não são suficientes para garantir a qualidade da produção leiteira, sendo necessárias também práticas higiênicas durante a ordenha e conservação do leite. Portanto, a adoção conjunta de medidas como a granelização da coleta, refrigeração nas propriedades (NERO et al., 2005; SANTANA et al., 2001), boas práticas de ordenha (GUERREIRO et al., 2005; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006), controle da mastite e boa qualidade da água utilizada nas fazendas são importantes ferramentas para melhorar a qualidade microbiológica do leite (SANTOS; FONSECA, 2001).

## 2.2 PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS PSICOTRÓFICOS NO LEITE

Os micro-organismos psicotróficos no leite são representados por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, pertencentes a uma diversidade de gêneros (Tabela 1), não constituindo um grupo taxonômico específico. Os principais gêneros isolados no leite são: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Listeria* e *Yersinia* (MUIR, 1996; SHAH, 1994; SORHAUG; STEPANIAK, 1997; SUHREN, 1989), essas bactérias têm em comum seu metabolismo, que em temperaturas inferiores a 10°C torna-se predominantemente lipo-proteolítico e é caracterizado pela síntese de enzimas intra e principalmente extracelulares termorresistentes (CELESTINO; IYER; ROGINSKI, 1996; MUIR, 1996; TEBALDI et al., 2008; VIDAL-MARTINS et al., 2005 ).



Tabela 1- Gêneros de bactérias contendo espécies psicotróficas

Gram-positivas	Gram-negativas
<i>Aerobacter</i>	<i>Achromobacter</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Aeromonas</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Alcaligenes</i>
<i>Listeria</i>	<i>Campilobacter</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Chromobacterium</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Citrobacter</i>
<i>Microbacterium</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Sarcina</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Hafnia</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Klebsiella</i>
	<i>Moraxella</i>
	<i>Proteus</i>
	<b><i>Pseudomonas</i></b>
	<i>Serratia</i>
	<i>Xanthomonas</i>
	<i>Yersinia</i>

Fonte: Arcuri (2003).

*Pseudomonas* é citado como dominante (ARCURI et al., 2008; COUSIN, 1982; MUIR, 1996; NIELSEN, 2002; SHAH, 1994; SUHREN, 1989), superando outras bactérias como *Aeromonas*, *Listeria*, *Enterococcus* e gêneros da família *Enterobacteriaceae*, constituindo cerca de 70% a 90% da microbiota psicotrófica do leite cru (JONGHE et al., 2010). Nielsen (2002), estima que, o leite obtido sob condições insatisfatórias apresente cerca de 75% de psicotróficos, porém quando o produto é mantido sob condições higiênico-sanitárias adequadas esse número reduz para menos de 10%. Dentro desse grupo, as espécies de maior relevância são: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas synxantha*. Essas bactérias destacam-se por apresentar um curto tempo de geração (0°C a 7°C) (SORHAUG; STEPANIAK, 1997), mais especificamente a 4°C, tornando-se naturalmente a microbiota predominante em leites armazenados neste intervalo de temperatura (CHANDLER; MCMAEEKIN, 1985). Em meio de cultura apropriado, *Pseudomonas fluorescens*, se destaca das

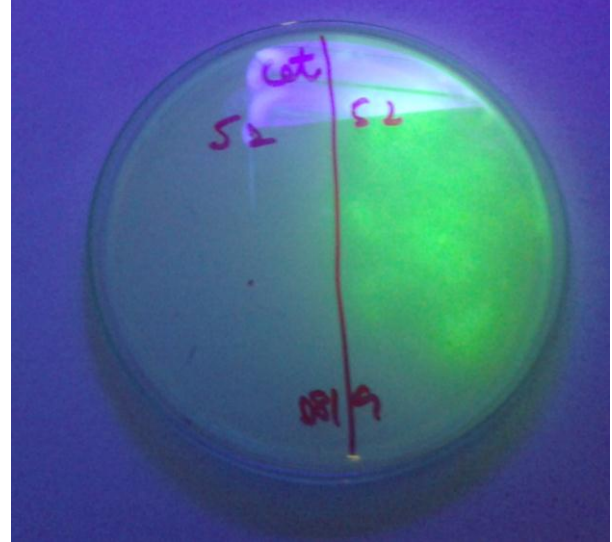
demaís, pela produção de um pigmento fluorescente difusível, característico dessa espécie (MUIR, 1996). Pinto, Martins e Vanetti (2006), encontraram o pigmento fluorescente em 77,4 % dos isolados não fermentadores de glicose (Figuras 1 e 2).

Figura 1 - *P. fluorescens* em ágar Cetrimide, visualizadas sob luz UV (5.7W/380nm).



Fonte: Do Autor (2016).

Figura 2 - *P. fluorescens* em ágar Cetrimide, visualizadas sob luz UV (5.7W/380nm).



Fonte: Do Autor (2016).

Jayarao e Wang (1999), examinaram o leite de 131 rebanhos leiteiros da região da Dakota do Sul e Minnesota (Estados Unidos da América). Coliformes e outras bactérias Gram-negativas (não coliformes) representaram, respectivamente, 32,9 e 67,1% do total pesquisado. Das 234 cepas isoladas neste estudo, 116 eram de *Pseudomonas* spp. e *P. fluorescens* responsável por 29,9% de todas as amostras analisadas. Pesquisa realizada por Stulova et al. (2010), também apontou *Pseudomonas* spp. como principal micro-organismo contaminante de leite cru mantido sob refrigeração e *Pseudomonas fluorescens* a espécie de maior prevalência.

Em contrapartida, estudo recente realizado no Brasil, avaliou a população de *Pseudomonas* spp. e *Pseudomonas fluorescens* em leite cru refrigerado e demonstrou que as bactérias desse gênero/espécie não predominaram nesse meio. As amostras desta pesquisa foram coletadas de 5 produtores da região de Londrina-PR após 48 horas de refrigeração e também do caminhão tanque (leite conjunto) dos mesmos produtores ao chegar na indústria beneficiadora. A autora observou que apenas 28,6% da média do leite do tanque dos produtores e 18% do leite conjunto eram de psicrotóxicos do gênero *Pseudomonas*, já a espécie *P.*

*fluorescens* compreendeu, respectivamente, 3,54% e 2,79% dos psicotróficos encontrados, evidenciando assim, que provavelmente houve outras espécies envolvidas na deterioração do leite cru e derivados (ALMEIDA, 2014).

*Pseudomonas putida* (Figuras 3 e 4) é outra espécie a ser considerada, essa bactéria apresenta-se sob a forma de bastonete, pode ser encontrada em superfícies de solos e água e possui temperatura ótima de crescimento entre 25°C e 30°C (ARCURI, 2003). Dogan e Boor (2003) estudaram a diversidade genética e a produção de enzimas extracelulares (protease, lipase e lecitinase) por *Pseudomonas* spp. em amostras de leite cru e pasteurizado. A maioria dos isolados encontrados foram de *P. fluorescens* e *P. putida*, além disso, das 338 cepas identificadas, 51% foram protease positiva, 47% lecitinase positiva e 67% lipase positiva, as atividades lipolíticas e proteolíticas variaram entre as linhagens de *Pseudomonas*.

Figura 3 - *P. putida* em *Pseudomonas* ágar base.



Fonte: Do Autor (2016).

Figura 4 - *P. putida* em *Pseudomonas* ágar base.



Fonte: Do Autor (2016).

Os bacilos produtores de esporos também são psicotróficos de grande importância, pois além de multiplicarem-se sob refrigeração, sobrevivem a pasteurização. Este grupo de bactérias (*Bacillus* spp.) secretam enzimas extracelulares termorresistentes (proteínases, lipases e fosfolipases) que são comparáveis as enzimas secretadas por *Pseudomonas* spp., entretanto sua fase de latência (lag) de crescimento celular e seu tempo de geração são mais longos, girando em torno de 15 a 20 horas no leite pasteurizado, a 7°C (COUSIN, 1982;

SORHAUG; STEPANIAK, 1997).

Cepas de *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens* foram relacionadas em diversos casos de intoxicação alimentar envolvendo o consumo de leite e seus derivados lácteos, no entanto, apenas as espécies patogênicas *Bacillus cereus* e *Yersinia enterocolitica* são significantes em refrigerados e capazes de desenvolver-se em baixas temperaturas (COUSIN, 1982).

### 2.3 CRESCIMENTO DE PSICROTRÓFICOS

O crescimento da microbiota psicotrófica caracteriza-se por uma fase de adaptação ou latência, denominada fase lag, onde a taxa de crescimento é irrelevante, seguido de uma fase exponencial (log) de intensa multiplicação, também longa e lenta (ARCURI, 2003; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Arcuri (2003), cita que, *Pseudomonas* spp. isoladas de leite cru que demonstraram crescimento mais rápido no leite, apresentaram tempo de geração entre 8 a 12 horas a 3°C. Em temperaturas situadas na faixa de 3°C a 5°C, o tempo de geração ficou entre 5,5 e 10,5 horas, suficiente para causar, num período de cinco dias, a deterioração em leite contendo inicialmente uma UFC/mL.

Para Holm et al. (2004), aproximadamente uma em cada dez bactérias presentes no leite cru refrigerado pertence ao gênero *Pseudomonas*, destas, *Pseudomonas fluorescens* caracteriza-se pela capacidade de dobrar sua população em um período inferior a 7 horas, a 4°C.

### 2.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

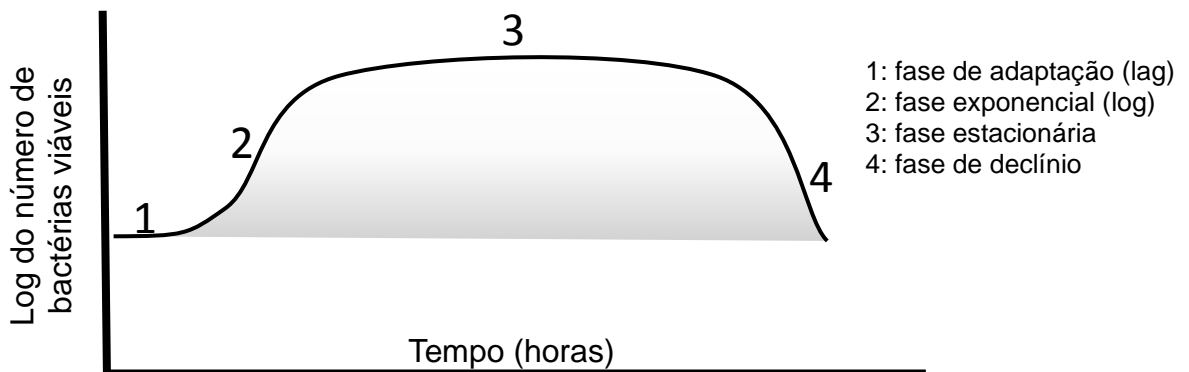
O leite bovino é um produto biologicamente ativo e cerca de 50 diferentes atividades enzimáticas foram relatadas neste alimento logo após sua ordenha. Desta maneira, enzimas bacterianas não são as únicas presentes no leite cru, estão presentes também enzimas naturais do produto. Destas últimas, segundo Muir (1996), apenas um número modesto tem impacto significativo sobre a qualidade ou a vida de prateleira do leite e de seus derivados.

Muitas bactérias psicotróficas são capazes de produzir enzimas extracelulares, sendo as lipases e proteases as mais importantes em relação à

deterioração do leite e produtos lácteos (ARCURI, 2003; COUSIN, 1982; TEBALDI et al., 2008; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). O papel das enzimas, particularmente, vem sendo destacado, pois mesmo após o tratamento térmico do leite, um número expressivo mantém-se ativas e íntegras, tornando-se um problema para a manutenção da qualidade durante a estocagem do produto (MUIR, 1996; SANTOS; FONSECA, 2001).

A produção destas enzimas está relacionada com a temperatura, fase de crescimento do micro-organismo, composição do meio e disponibilidade de oxigênio em que ele se encontra e sua atividade dependente de pH, concentração de substrato e temperatura (NUÑEZ; NUÑEZ, 1983). Sua síntese é maior em temperatura inferior à temperatura ótima de crescimento do micro-organismo (ARCURI, 2003) e ocorre predominantemente no final da fase exponencial (log) de crescimento celular (MAHIEU, 1991; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006) e também na fase estacionária (Figura 5).

Figura 5 - Fases de crescimento celular.



Fonte: Adaptado de Walstra, Wouters e Geuters (2006).

As enzimas extracelulares produzidas por psicrotróficos causam alterações no leite e derivados quando atingem uma população entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/mL (ARCURI, 2003; COSTA et al., 2002; MAHIEU, 1991; MUIR, 1996). Walstra, Wouters e Geurts (2006) afirmam que uma quantidade superior a  $5 \times 10^5$  UFC de psicrotróficos por mililitro de leite pode ser prejudicial e os defeitos de sabor começam a aparecer quando a população atinge  $10^7$  UFC/mL. Lipases e proteases secretadas por esses organismos são conhecidas por provocar alterações sensoriais no leite e derivados lácteos (NÖRNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009), causando

rancidez, sabor de sabão e, ocasionalmente, sabores amargos indesejáveis (ARCURI et al., 2008; COUSIN, 1982; JONGUE et al., 2010), estas alterações ocorrem devido à degradação da gordura e proteínas do leite, respectivamente (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Outros defeitos de sabor também atribuídos a alta contagem de psicotróficos são descritos como: odor de peixe, sabor frutado, pútrido, caseoso e sujo (COUSIN, 1982).

Arcuri et al. (2008) isolaram, quantificaram e caracterizaram bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. As contagens desses micro-organismos nas amostras coletadas variaram entre  $10^2$  e  $10^7$  UFC/mL, sendo verificada a predominância de bactérias psicotróficas Gram-negativas em 81,2% das amostras, já as bactérias Gram-positivas foram encontradas em 18,8% do total analisado. *Pseudomonas fluorescens* foi a espécie dominante e todas as cepas dessa espécie foram lipolíticas a 4°C, 7°C, 10°C e 21°C, sendo que a atividade proteolítica a estas temperaturas foi verificada, respectivamente, em 66%, 74,5%, 88,3% e 95,7% das estirpes. Os resultados deste estudo demonstraram que a maioria dos isolados bacterianos apresentou atividade lipolítica e/ou proteolítica em temperaturas de refrigeração, deixando evidente que estas enzimas possuem um alto potencial de deterioração sobre leite e produtos lácteos.

## 2.5 ATIVIDADE LIPOLÍTICA NO LEITE

Estima-se que aproximadamente 96% a 98% da fração de gordura do leite está presente na forma de triglicerídeos, o restante dos componentes são diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfolípidos e algumas vitaminas lipossolúveis (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A lipase é uma glicoproteína com peso molecular variando de 62.000 a 66.000 kDa, embora seu intervalo de atuação seja bastante amplo, esta enzima atinge sua maior atividade em pH 7 a 8, podendo hidrolisar triglicerídeos de cadeia curta e longa, ésteres sintéticos, monoglicerídeos e fosfolípidos (ORDÓÑEZ-PEREDA et al., 2005). Desta forma, a lipólise ocorre pela hidrólise enzimática de lípidos do leite, liberando moléculas de ácidos graxos e glicerol. Embora o produto contenha naturalmente ácidos graxos livres que resultaram da síntese incompleta da glândula mamária, o grande número desses compostos são provenientes da quebra de triglicerídeos por lipases.

Esta ruptura dos glóbulos de gordura provoca um aumento na fração de ácidos graxos de cadeia curta (C-4 a C-8), conferindo sabor e odor de ranço aos produtos lácteos. O sabor e odor de sabão são produzidos pela hidrólise de ácidos graxos com peso molecular maior (C-10 a C-12), já o sabor metálico ou oxidado é resultante da ação de ácidos graxos insaturados oxidados a cetonas e aldeídos (ARCURI, 2003; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003).

As lipases podem ser de origem endógena (natural do leite), cuja maioria está associada às estruturas das micelas de caseína ou de origem exógena, secretadas como resultado da ação metabólica bacteriana (DEETH; FITZ-GERALD, 2006). Essas enzimas apresentam atividade ótima numa ampla faixa de temperatura, entre 22°C e 70°C e indicam maior perda de sua atividade na faixa de 60°C a 80°C (ARCURI, 2003). De acordo com Mahieu (1991), sua produção ocorre em maior quantidade entre 20°C e 21°C, podendo manter sua atividade em 50% a 0°C.

Segundo Walstra, Wouters e Geurts (2006) a atividade lipolítica é, usualmente, o principal problema que ocorre no leite cru, embora outras enzimas lácteas, como proteases e fosfolipases também podem causar alterações físico-químicas no produto. Os autores, afirmam que, variações extensas de temperatura e danos aos glóbulos de gordura devem ser evitados. Outros fatores como estágio de lactação, nutrição inadequada, ciclo hormonal, mastite e agitação mecânica também podem contribuir para ocorrência de lipólise no leite (MUIR, 1996).

### 2.5.1 Lipase-Lipoproteica (LLP)

A Lipase-lipoproteica (natural do leite) é sintetizada nas células secretoras da glândula mamária (DEETH; FITZ-GERALD, 2006; MUIR, 1996) onde catalisam a quebra de triglicérido do leite, produzindo ácidos graxos livres que são responsáveis por defeitos de sabor e odor (MUIR, 1996). As lipases endógenas apresentam atividade ótima de funcionamento à 37°C e pH 8 (ORDÓÑEZ-PEREDA et al., 2005). São consideradas termosensíveis, facilmente destruídas durante a pasteurização, não causando prejuízos à porção graxa de um leite processado e manuseado adequadamente (GOMES, 1988).

São reconhecidos dois tipos distintos de lipólise por Lipase-lipoproteica. A primeira é descrita como lipólise espontânea, que confere ao leite

recém ordenhado aspecto rançoso e é influenciada por uma série de fatores que incluem: estágio de lactação, nutrição inadequada e estação do ano. A segunda é conhecida como lipólise induzida e ocorre quando danos à membrana do glóbulo de gordura conduzem a deterioração de produtos que não tenham sido tratados termicamente. Danos a estrutura do glóbulo podem acontecer por meios físicos, tais como a agitação, formação de espuma ou homogeneização (MUIR, 1996).

Entretanto, como já descrito, se em condições naturais uma lipase endógena não é capaz de degradar a gordura do leite, quando uma fosfolipase produzida por *Pseudomonas fluorescens* cliva a membrana do glóbulo de gordura ou se a estrutura da membrana do glóbulo é destruída por um processo de intensa agitação/movimentação, haverá condições que permitam a quebra da molécula de triglicerídeo por uma lipase endógena (DEETH; FITZ-GERALD, 2006).

Embora as enzimas naturais do leite possam afetar a vida de prateleira do produto e de seus derivados, as lipases oriundas de micro-organismos psicotróficos são mais prejudiciais, podendo resistir a temperaturas de pasteurização HTST (High Temperature Short Time) e mesmo ao processo de ultrapasteurização (ARCURI, 2003).

### 2.5.2 Lipases Bacterianas

As lipases microbianas têm uma atuação ótima em pH alcalino e temperaturas entre 40°C a 50°C (ORDÓÑEZ-PEREDA et al., 2005) que diferentemente das lipases endógenas, causam alterações na gordura do leite pós tratamento término, permanecendo ativas em temperaturas muito baixas (GOMES, 1988). De acordo com Izidoro et al. (2013), a membrana dos glóbulos de gordura pode ser clivada através da desnaturação espontânea a temperaturas muito baixas, devido à perda de cobre e fosfolípidos, facilitando a ação de uma lipase bacteriana.

Os tratamentos térmicos do leite, como a pasteurização e UHT, reduzem a atividade lipolítica em 75% e 91,6% respectivamente, porém lipases extracelulares produzidas por psicotróficos resistem à esterilização a 130°C por 15 segundos (SHAH, 1994). A maioria das lipases bacterianas tem especificidade para as posições sn-1 sn-3 do triacilglicerol (ARCURI, 2003; SORHAUG; STEPANIAK, 1997), e algumas hidrolisam mais rapidamente monoacilgliceróis e diacilgliceróis que os triacilgliceróis (ARCURI, 2003).



Uma das mais importantes lipases produzidas por psicotróficos é a lecitinase que tem a capacidade de hidrolisar a membrana dos glóbulos de gordura, resultando em defeitos de sabor e textura conhecidos como “leite/creme gorduroso”. No leite cru, bactérias Gram-negativas do gênero *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* produzem lecitinase (SHAH, 1994), já no leite pasteurizado, bactérias Gram-positivas como *Bacillus mycoides* e *Bacillus cereus* elaboram essa enzima e estão associadas a produção “leite gorduroso” (SHAH, 1994; STONE; ROWLANDS, 2009).

Além das enzimas lipolíticas e proteolíticas envolvidas na deterioração do leite, destaca-se ainda, a fosfolipase C que degrada as membranas dos glóbulos de gordura facilitando a ação das lipases (COUSIN, 1982; SHAH, 1994). Alguns isolados como *Pseudomonas fluorescens*, espécies de *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Citrobacter*, *Bacillus* e *Enterobacter* sintetizam essa enzima (COUSIN, 1982).

Kumaresan, Annalvilli e Sivakumar (2007) avaliaram a deterioração do leite cru por psicotróficos em diferentes temperaturas de armazenamento (2°C, 4°C e 7°C), bem como as atividades lipolítica e proteolítica destes micro-organismos ao longo de 14 dias, com o objetivo de detectar a temperatura adequada para seu armazenamento. À temperatura de 2°C, houve menor crescimento bacteriano e, conseqüentemente, menores atividades lipolítica e proteolítica de psicotróficos, além disso, observou-se melhor qualidade sensorial quando comparado às outras temperaturas estudadas, visto que, 50% dos provadores foram capazes de identificar o sabor de ranço causado pela lipólise quando os níveis de ácidos graxos livres estavam entre 0,18 e 0,20 mEq/kg. Quando os níveis de ácidos graxos estavam na faixa de 0,25 mEq/kg, todos os entrevistados detectaram a rancidez. Neste estudo, o limiar sensorial de 0,25 mEq/kg não foi atingido até 14 dias quando o leite foi armazenado a temperatura de 2°C. Desta maneira, concluiu-se que o leite cru conservado a 2°C antes do processamento, mantém suas qualidades nutricionais e sensoriais, dando origem a produtos com maior valor agregado.

Portanto, além de rancidez e sabor amargo, outros problemas ou defeitos tecnológicos são atribuídos à ação e acúmulo de enzimas extracelulares e estão correlacionados com a deterioração da qualidade do leite e de seus derivados (Quadro 1) (SORHAUG; STEPANIAK, 1997).

Quadro 1- Efeito do crescimento de psicotróficos no leite cru antes do tratamento térmico sobre a qualidade dos produtos lácteos

<b>Produto</b>	<b>Psicotrófico em leite cru (Log UFC/mL)</b>	<b>Efeito sobre a qualidade</b>
Leite UHT	5,9	Geleificação após 20 semanas.
Leite UHT	6,9-7,2	Geleificação após 2-10 semanas.
Leite em pó	6,3-7,0	Estabilidade térmica reduzida, aumento da capacidade espumante em leite reconstituído.
Leite pasteurizado	5,5	Sabor inferior quando comparado com leite pasteurizado produzido com leite fresco.
Queijos duros	6,5-7,5	Rancidez
Queijos duros	7,5-8,3	Defeitos de sabor, especialmente rancidez e gosto de sabão; redução no rendimento do queijo.
Queijo cottage	5,0-7,8	Correlação significativa entre a contagem de psicotróficos no leite cru e sabor amargo no produto final.
Manteiga	Não determinado	Desenvolvimento rápido de rancidez em manteiga proveniente de leite refrigerado comparado a manteiga fabricada com leite fresco.
logurte	7,6-7,8	Gosto amargo, sujo ou de fruta, em função da microbiota específica.

Fonte: Sorhaug e Stepaniak (1997).

### 3 OBJETIVO

Avaliar o efeito do tempo de estocagem e da temperatura de refrigeração sobre a capacidade lipolítica de diferentes populações de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* isoladas do leite cru refrigerado.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, K. M. **População de *Pseudomonas* spp. e *P. fluorescens* em leite cru refrigerado**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) - Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, UNOPAR, Londrina, 2014.
- ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: \_\_\_\_\_. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Templo, 2003. p. 105-115.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p. 440-446, jun. 2006.
- ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, nov. 2008.
- BORGES, M. F.; BRANDÃO, S. C. C.; PINHEIRO, A. J. R. Efeito bactericida do peróxido de hidrogênio sobre *Salmonella* em leite destinado a fabricação de queijos. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 145-149, set. 1989.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002**. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 29 set. 2002. Seção 1, p.13.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 62, de 29 de Dezembro de 2011**. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Seção 1, 30 de Dezembro de 2011.
- CATANIO, S. F.; INAY, M. O.; SILVA, S. A.; PEREIRA, R. J.; TAMANINI, R.; BELOTI, V.; COSTA, R. M.; SOUZA, B. H. C.; ALEGRO-ARAGON, C. L.; SANTANA, W. H. E. Refrigerated raw milk quality of a processing plant in the north of Paraná after the implementation of changes imposed by NI 62 of 2011. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, supl. 2, p. 3171-3180, dez. 2012.
- CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Australie, v. 51, n. 2, p. 59-63, fev. 1996.
- CHANDLER, R. E.; MCMEEKIN, T. A. Temperature function integration and its relationship the spoilage of pasteurized, homogenized milk. **Journal of Dairy**

**Technology**, Huntingdon, v. 40, n. 1, p. 37-41, Mar. 1985.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 4, p. 255-275, Feb. 2003.

COSTA, L. M.; GÓMEZ, F. S.; MOLINA, L. H. C.; SIMPSON, R. R.; ROMERO, A. M. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 52, n. 2, p. 1-13, jun. 2002.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, n. 2, p. 172-207, Feb. 1982.

DEETH, H. C.; FITZ-GERALD, C.H. Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). **Advanced dairy chemistry: lipids**. 3. rd. New York: Springer, 2006. p. 481-556.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 130-138, jan. 2003.

DOMARESKI J. L.; BANDIERA N. S.; SATO R. T.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 60, n. 3, p. 261-262, ago. 2010.

FAGUNDES, C. M.; FISCHER, V.; SILVA, W. P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M. R. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 568-572, mar./abr. 2006.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R. T. (Ed.). **Standard methods for the examination of dairy products**. 16. ed. New York: American Public Health Association, 1992. p. 837-856.

FURTADO, M. A. M.; VILELA, M. A. P.; MEURER, V. M.; BARBOSA, F. A. Padrões físico-químicos de identidade e qualidade do leite UHT comercializado na cidade de Juiz De Fora, MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 22., 2004, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora, 2004. p. 130-131.

GOMES, M. I. F. V. **Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana**. 1988. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - ESALQ, Piracicaba, 1988.

GRIFFITHS, M. W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n. 9, p. 790-792, set. 1990.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENERI, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas

profiláticas no manejo de produção. **Revista Ciência e Agrotecnologia de Alimentos**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, jan./fev. 2005.

HOLM, C.; JEPSEN, L.; LARSEN, M.; JESPERSEN, L. Predominant microflora of downgraded danish bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, Minnesota, v. 87, n. 5, p. 1151-1157, May. 2004.

IZIDORO, T. B.; PEREIRA, J. G.; SOARES, V. M.; PINTO, J. P. A. N. Effect of psychrotrophic growth on the milk fat fraction at different temperatures of storage. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 78, n. 4, p. 615-618, abr. 2013.

JAYARAO, B. M.; WANG, L. A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, Minnesota, v. 82, n. 12, p. 2620-2624, dez. 1999.

JONGHE, V.; COOREVITS, A.; HOORDE, K. V.; MESSENS, W.; LANDSCHOOT, A. V.; VOS, P.; HEYNDRIKX, M. Influence of storage conditions on the growth of pseudomonas species in refrigerated raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 2, p. 460-470, Nov. 2010.

KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. **Journal of Applied Sciences Research**, Newtown, v. 3, n. 11, p. 1383-1387, Sept./Dec. 2007.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, dez. 2011.

MAHIEU, H. Modificaciones de la leche después de su recogida. In: LUQUET, F. M. **Leche y productos lácteos: la leche de la mama a la lechería**. Zaragoza: Acribia, 1991. p. 181-226.

MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; ARRUDA, M. T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, out./dez. 2008.

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**, Berlin, v. 228, p. 725-734, nov. 2009.

MUIR, D. D. The shelf - life of dairy products: 1. factors influencing raw and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, England, v. 49, n. 1, p. 24-32, Feb. 1996.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 191-195, jan./mar. 2005.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinado por característica de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 386-390, abr./jun. 2009.

NIELSEN, S. S. Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 22, p. 6628-6624, May 2002.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 2, p. 157-163, dez. 2009.

NUÑEZ, M.; NUÑEZ, J. A. Proteasas de psicrotrofos gram negativos: efectos sobre la leche y los productos lácteos. **Revista Espanola de Lecheria**, Madrid, n. 130, p. 251-260, dez.1983.

ORDÓÑEZ-PEREDA, J. A.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ALVAREZ, L. F.; GARCIA-SANZ, M. L.; MINGUILLÓN, G. G. F.; HOZ-PERALES, L.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, v. 1, 2005. p. 33-48.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 645-651, jul./set. 2006.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 145-154, jul./dez. 2001.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, mar. 2001.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; SOUZA, C. M.; ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos em leite cru refrigerado na macrorregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 4, p. 1237-1245, out./dez. 2009.

SHAH, N. P. Psychrotrophs in milk: a Review. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 49, n.8, p. 432-437, mar. 1994.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trend in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, p. 35-37, fev. 1997.

STONE, M. J.; ROWLANDS, A. 'Broken' or 'bitty' cream in raw and pasteurized milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 19, n. 1, p. 51-62, June 2009.

STULOVA, I.; ADAMBERG, S.; KRISCIUNAITE, T.; KAMPURA, M.; BLANK, L.; LAHT, T-M. Microbiological quality of raw milk produced in Estonia. **Letters in**

**Applied Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 683-690, dez. 2010.

SUHREN, G. Producer microorganism. In: MCKELLER, R. C. **Enzymes of psychrotrophs in raw food**. Boca Raton: CRC, 1989. p. 4-34.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 753-760, jul./set. 2008.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JUNIOR, O. R.; PENNA, A. L. B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 698-704, out./dez. 2005.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2<sup>rd</sup>. Boca Raton: CRC Press, 2006.

YAMAZI, A. K.; MORAES, P. M.; VIÇOSA, G. N.; ORTOLANI, M. B. T.; NERO, L. A. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 610-618, jul./ago. 2010.



## 4 ARTIGO

**Capacidade lipolítica de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*  
isoladas do leite cru refrigerado**

Flávia de Almeida Bergonse PEREIRA<sup>1</sup>, Cíntia Hoch Batista de SOUZA<sup>2</sup>, Joice Sifuentes dos SANTOS<sup>3</sup>, Fernanda Gonzales PAIÃO<sup>4</sup>, Elsa Helena Walter de SANTANA<sup>5</sup>

**RESUMO**

O processo de conservação do leite cru pelo frio, isolado de medidas higiênic-sanitárias adequadas, favorece o crescimento de micro-organismos psicrotróficos, que apresentam comportamento altamente lipo-proteolítico. *Pseudomonas* spp. é relatado como o gênero mais frequente e *Pseudomonas fluorescens*, a espécie predominante, sendo caracterizada por sua intensa capacidade lipolítica. Embora *Pseudomonas fluorescens* seja reconhecida pelo alto grau de deterioração do leite cru refrigerado, outra espécie como *Pseudomonas putida*, é comum e também promove lipólise neste meio. Objetivou-se analisar a capacidade lipolítica de cepas de *P. fluorescens* e *P. putida*, isoladas de leite cru refrigerado, incubadas a 2°C, 4°C e 8°C, durante 96 horas de estocagem. As cepas estudadas tiveram o gênero e a espécie confirmadas pela técnica de Reação em Cadeia Polimerase (PCR). Os dois isolados identificados como *P. fluorescens* e *P. putida* foram recuperados com inoculação em 200 mL de leite em pó desnatado reconstituído a 12% (21°C/48 h). As populações foram determinadas e diluições decimais realizadas até 10<sup>2</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> UFC/ mL. O estudo foi realizado a partir de alíquotas de 200 mL de leite em pó integral reconstituído a 12% e esterilizado a 121°C/ 15 minutos, inoculados com as três populações pré-determinadas e incubados a 2°C, 4°C, 8°C. Para contagem das espécies utilizou-se o meio de cultura *Pseudomonas* ágar base com adição de suplemento CFC (Cetrimida 5mg, Fucidina 5mg, Cefaloridina 25mg) (30°C/ 48 h). A avaliação do comportamento lipolítico foi determinada pelo método Lipo R, onde verificou-se que leites inoculados com diferentes populações de *P. putida* (10<sup>2</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> UFC/mL) podem ser estocados a 2°C, 4°C ou 8°C por um período de até 72 h (3

<sup>1</sup> Mestranda em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, UNOPAR. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: flaviabergonse@hotmail.com.

<sup>2</sup> Bióloga, doutora em Tecnologia de Alimentos pela Universidade de São Paulo, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, UNOPAR. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: cinthiahoch@yahoo.com.br.

<sup>3</sup> Farmacêutica, doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, UNOPAR. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: joice.sifuentes@gmail.com.

<sup>4</sup> Bióloga, doutora em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo, colaboradora na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR. Av. dos Pioneiros, 3131, 86073-310, Londrina, PR, Brasil. E-mail: fergonzalesp@hotmail.com.

<sup>5</sup> Médica veterinária, doutora em Ciência Animal pela Universidade Estadual de Londrina, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, UNOPAR. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: elsahws@hotmail.com (autora para correspondência).

dias), não ocorrendo dentro desse intervalo de tempo, aumento significativo ( $p > 0,05$ ) na concentração de ácidos graxos livres. Em amostras inoculadas com *P. fluorescens* os maiores índices de lipólise ( $p < 0,05$ ), ocorreram em inóculos  $10^2$  e  $10^5$  UFC/mL a  $8^\circ\text{C}$ , onde o tempo de estocagem influenciou no aumento da concentração desse lipídeo. Já em populações iniciais de  $10^6$  UFC/mL de *P. fluorescens* o tempo de incubação teve influência sobre a concentração de ácidos graxos a partir de  $4^\circ\text{C}$ . Comparando-se os dois micro-organismos estudados (Teste Mann-Whitney), destaca-se que existe diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na produção de ácidos graxos livres entre as duas espécies, em todos os inóculos, temperaturas e momentos testados.

**Palavras-chave:** Lipase. Lácteo. Gram negativo. Atividade enzimática.

## 1 INTRODUÇÃO

O leite, naturalmente, é um alimento rico em proteínas, sais minerais, carboidratos, gorduras e vitaminas, sendo considerado um dos alimentos mais completos para dieta humana (BORGES; BRANDÃO; PINHEIRO, 1989; GUERREIRO et al., 2005). Sua produção no Brasil é caracterizada, de modo geral, pela baixa qualidade, sendo identificada por altas contagens microbianas e de células somáticas (MARTINS et al., 2008; NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009), trazendo como consequência produtos de qualidade insatisfatória (NERO et al., 2005).

Visando a melhoria da qualidade, a Resolução IN 62/2011, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2011), estabelece que o leite deve ser resfriado em tanques de refrigeração por expansão direta (temperatura igual ou inferior a  $4^\circ\text{C}$ ) ou tanques de imersão (temperatura igual ou inferior a  $7^\circ\text{C}$ ), devendo ser recolhido e transportado por caminhões isotérmicos para o laticínio em até 48 horas. Porém, o processo de conservação do leite cru pelo frio, isolado de medidas higiênico-sanitárias adequadas e superiores a 48 horas pode comprometer suas propriedades, possibilitando o crescimento de bactérias psicrófilas (DOMARESKI et al., 2010; MU; DU; BAI, 2009; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006) que são capazes de desenvolver-se em temperaturas abaixo de  $7^\circ\text{C}$  (ARCURI, 2003; FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992), tornando-se os principais agentes de deterioração do produto e derivados lácteos (ARCURI et al., 2008).

O grupo de micro-organismos psicrófilos são representados por uma diversidade de gêneros, não constituindo um grupo taxonômico específico

(SORHAUG; STEPANIAK, 1997; SUHREN, 1989). Por apresentar melhor capacidade de crescimento e adaptação em ambiente refrigerado, *Pseudomonas* spp. é considerado predominante (ARCURI et al., 2008; FAGUNDES et al., 2006; JONGHE et al., 2010; KUMARESAN; ANNALVILLI; SIVAKUMAR, 2007; MU; DU; BAI, 2009; MUIR, 1996) e produz sob refrigeração lípases, proteases e fosfolípases termorresistentes (ARCURI et al., 2008; JONGHE et al., 2010; KUMARESAN; ANNALVILLI; SIVAKUMAR, 2007; MU; DU; BAI, 2009; SORHAUG; STEPANIAK, 1997), que hidrolisam, respectivamente, a gordura e as proteínas do leite (COUSIN, 1982; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006), causando defeitos de sabor e resultando em perdas econômicas importantes (MAHIEU, 1991; JONGHE et al., 2010). *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* são citadas como espécies de grande relevância dentro desse grupo e destacam-se por apresentar um curto tempo de geração (0<sup>o</sup> C a 7<sup>o</sup> C) (SORHAUG; STEPANIAK, 1997), mais especificamente a 4<sup>o</sup> C, tornando-se naturalmente a microbiota predominante em leites armazenados neste intervalo de temperatura (CHANDLER; MCMAEEKIN, 1985).

A produção de enzimas por psicotróficos está relacionada com a temperatura, fase de crescimento do micro-organismo, composição do meio e disponibilidade de oxigênio em que ele se encontra e sua atividade dependente de pH, concentração de substrato e temperatura (NUÑEZ; NUÑEZ, 1983). Sua importância vem sendo destacada, pois mesmo após o tratamento térmico do leite, um número expressivo mantém-se ativas e íntegras, tornando-se um problema para a manutenção da qualidade durante a estocagem do produto (MUIR, 1996; SANTOS; FONSECA, 2001).

Portanto, alguns dos problemas tecnológicos na indústria de laticínios são decorrentes principalmente da contaminação da matéria-prima por psicotróficos, que possuem a capacidade de sintetizar enzimas lipolíticas e proteolíticas. Com base neste cenário, objetivou-se avaliar a capacidade lipolítica de três diferentes populações de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*, incubadas em temperaturas de refrigeração, durante 96 horas de estocagem, a fim de determinar melhores condições de estocagem do leite cru refrigerado.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de leite cru refrigerado utilizadas para pesquisa foram coletadas de cinco produtores do município de Londrina-PR, acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, e imediatamente transportadas ao laboratório de microbiologia da Universidade Norte do Paraná. As coletas foram realizadas entre os períodos de 11 de junho de 2013 a 24 de fevereiro de 2014 (ALMEIDA, 2014). Posteriormente, essas cepas foram devidamente identificadas e mantidas a 0°C em caldo Brain Heart Infusion (Himedia, Mumbai, Índia) e glicerol (40%), sendo utilizadas como cultura para o presente experimento.

### 2.2 CONFIRMAÇÃO DO GÊNERO *Pseudomonas* spp.

Para confirmação do gênero *Pseudomonas* spp. foi utilizado o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, USA), onde foi possível identificar através do método de extração de DNA total (ácido desoxirribonucleico) e técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) cepas desse micro-organismo, que posteriormente, foram utilizadas como material genético para o experimento.

#### 2.2.1 Extração de DNA

Culturas bacterianas incubadas por 48 h a 30°C foram pipetadas (1mL) em microtubos de 1,5mL estéreis e centrifugadas a 13.000 rpm por 2 minutos, desprezando-se o sobrenadante obtido. Em seguida, foi adicionado ao pellet 600µL de solução de lise e este foi ressuspenso, incubado em banho-maria a 80<sup>o</sup> C por 5 minutos e resfriado a temperatura ambiente. Após, foi adicionado 3µL de solução de RNase e 200µL de solução de precipitação e cada amostra foi agitada vigorosamente por 20 segundos. As mesmas foram incubadas em gelo por 5 minutos e centrifugadas a 13.000 rpm por 3 minutos. Foi transferido 700µL do sobrenadante para novo tubo estéril, adicionado 600µL de isopropanol, homogeneizado por inversão lentamente e centrifugado a 13.000 rpm por mais 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tubo mantido invertido sobre papel

absorvente por 15 minutos para secagem do DNA. Foi adicionado 100µL de solução de hidratação e incubado a 4<sup>o</sup> C *Over night*.

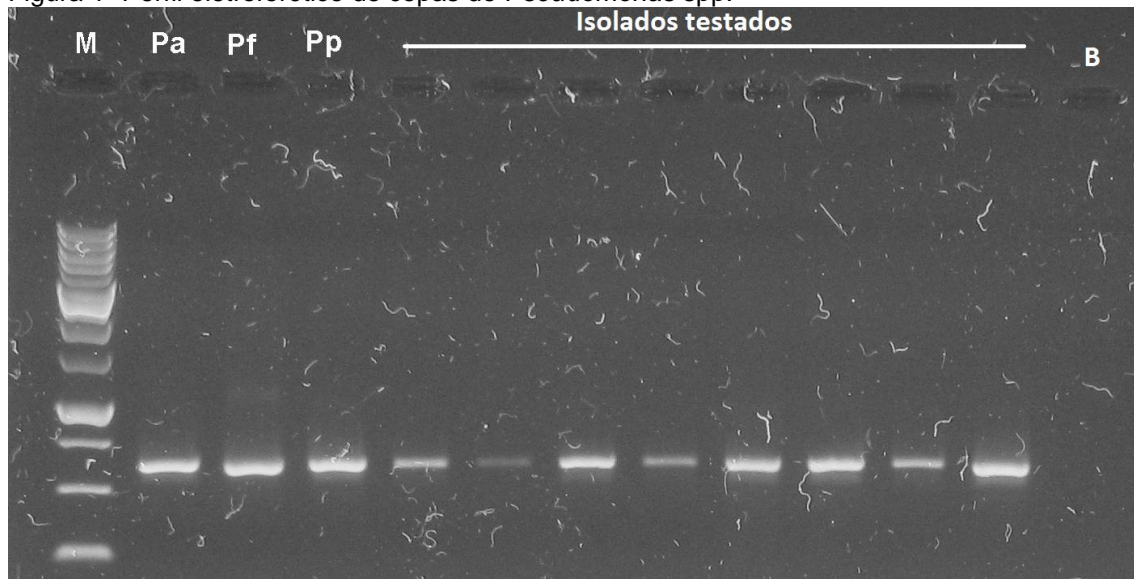
O protocolo seguido baseou-se nas instruções descritas pelo fabricante do Kit Wizard® Genomic DNA Purification e a qualidade do DNA extraído foi analisada através da eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) em tampão Tris-Borato/EDTA (TBE-5x) (Tris-HCl 89mM, EDTA pH 8,0, 2,5 mM, borato 89mM), visualizados sob luz ultravioleta (Trans-iluminador).

### 2.2.2 Reação PCR para Gênero *Pseudomonas* spp.

Os materiais genéticos extraídos no subitem 2.2.1 foram submetidos às reações de PCR utilizando-se o protocolo descrito por Spilker et al. (2004), com modificações. Os oligonucleotídeos PA-GS-F (5'-GACGGGTGAGTAATGCCTA-3') e PA-GS-R (5'-CACTGGTGTTTCCTTCCTATA-3') são específicos deste gênero e amplificaram um fragmento de 618 pares de base (pb), característico de *Pseudomonas* spp. As reações foram compostas por um total de 25µL, constituídas de 15,8µL de água, 2µL de DNA, 2,5µL do tampão 10x, 1,5µL de MgCl<sub>2</sub>(25mM), 2,0µL de dNTPs (2,5mM), 0,5µL de cada oligonucleotídeo (PA-GS-F e PA-GS-R) e 1,0U (0,2µL) de GoTaq® DNA polimerase.

As reações foram levadas ao termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.; Watertown, EUA), obedecendo as seguintes condições: 1 ciclo inicial de 95°C por 2 minutos, seguidos por 39 ciclos de 95°C por 40 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos; a extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos. Concluído os ciclos, os produtos de PCR foram separados e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x a 2V/cm por aproximadamente 4 horas. Após, a imagem do gel foi visualizada sob luz ultravioleta em trans-iluminador, gravada pelo sistema de foto-documentação L-PIX (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil) e analisada com parâmetros de similaridade, onde verificou-se a presença dos fragmentos amplificados (Figura 1).

Figura 1- Perfil eletroforético de cepas de *Pseudomonas* spp.



M: Marcador padrão molecular 1kb DNA.

Pa, Pf, Pp: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), *Pseudomonas putida* (ATCC 31483) (controles positivos).

B: Branco (controle negativo).

Fonte: Do Autor (2016).

### 2.3 CONFIRMAÇÃO DAS ESPÉCIES *Pseudomonas fluorescens* E *Pseudomonas putida*

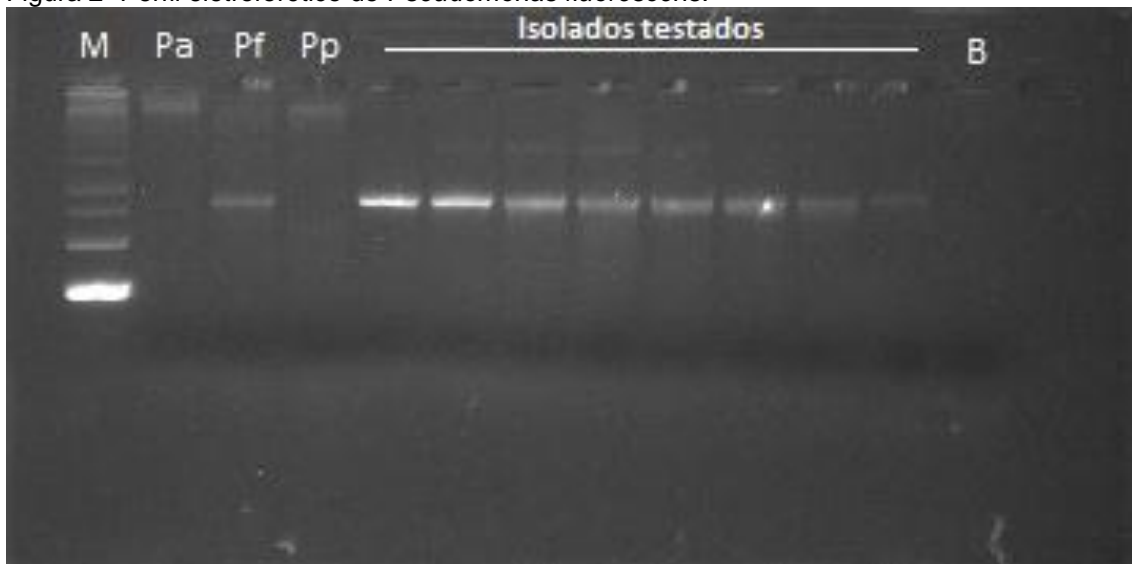
Para confirmação das espécies foi utilizado o Kit Wizard® Genomic DNA Purification, onde através do método de extração de DNA total (ácido desoxirribonucleico) e técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) identificou-se cepas dessas estirpes, que posteriormente, foram utilizadas como material genético para o experimento.

#### 2.3.1 Identificação das espécies *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* pela técnica de PCR

Para identificação da espécie *P. fluorescens*, os isolados bacterianos foram submetidos à reações de PCR conforme protocolo descrito por Scarpelini, Franzetti e Galli (2004), com modificações. Os oligonucleotídeos 16SPSEfluF (5'-TGCATTCAAAGACTGACTG-3') e 16SPSER (5'-AATCACACCGTGGTAACCG-3') utilizados nas reações são espécie específicos e amplificaram um fragmento de 800 pb do gene 16S rDNA, típica de *P. fluorescens*. *P. fluorescens* ATCC 13525 foi empregado como controle positivo e cada uma das reações foram compostas por

um total de 25µL, contendo: 12,9µL de água, 2µL de DNA, 5,0µL do tampão 5x, 2,0µL de MgCl<sub>2</sub>(25mM), 2,0µL de dNTPs (2,5mM), 0,5µL de cada oligonucleotídeo (16SPSER e 16SPSEfluF) e 0,5U (0,1µL) de GoTaq® DNA polimerase. Todas as reações foram conduzidas nas seguintes condições: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão 72°C por 2 minutos; e extensão simples final de 72°C por 2 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5x, e visualizados em trans-iluminador (Figura 2).

Figura 2- Perfil eletroforético de *Pseudomonas fluorescens*.



M: Marcador padrão molecular 1kb DNA.

Pa, Pf, Pp: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), *Pseudomonas putida* (ATCC 31483) (controles positivos).

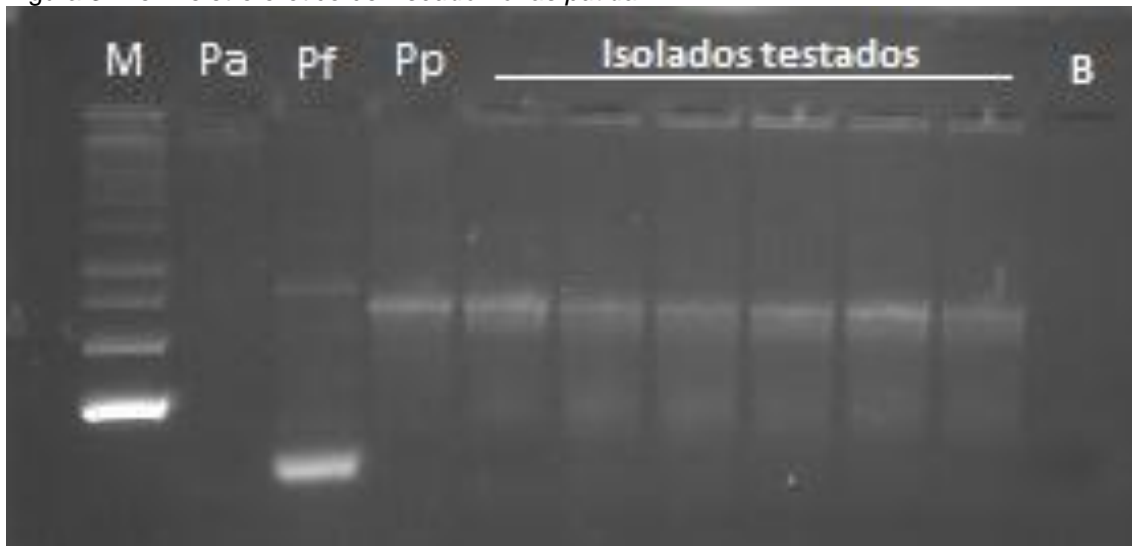
B: Branco (controle negativo).

Fonte: Do Autor (2016).

Já para identificação de *P. putida*, seguiu-se protocolo descrito por Yamamoto e Harayama (1995), com modificações. Os oligonucleotídeos usados foram: P734 (5'-CAACTCGGGCGTTGGCATTCTGCT-3') e P1455r (5'-CAAGATCGCCTGGGTACGACGGTT-3'), visando amplificação de um fragmento de 744 pb do gene *gyrB*, típico de *P. putida*. *P. putida* ATCC 31483 foi empregado como controle positivo e as reações foram compostas por um total de 25µL, constituídas de 15,8µL de água, 2µL de DNA, 2,5µL do tampão 10x, 1,5µL de MgCl<sub>2</sub>(25mM), 2,0µL de dNTPs (2,5mM), 0,5µL de cada oligonucleotídeo (P734 e P1455r) e 1,0U (0,2µL) de GoTaq® DNA polimerase. O programa empregado contou com 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de

94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos; e extensão simples final de 72°C por mais 2 minutos. Os produtos de PCR amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5x, e visualizados em transiluminador (Figura 3).

Figura 3- Perfil eletroforético de *Pseudomonas putida*.



M: Marcador padrão molecular 1kb DNA.

Pa, Pf, Pp: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), *Pseudomonas putida* (ATCC 31483) (controles positivos).

B: Branco (controle negativo).

Fonte: Do Autor (2016).

### 2.3.2 Recuperação das cepas e determinação da população de *P. fluorescens* e *P. putida*

Das cepas confirmadas para espécie pela técnica de PCR, duas foram utilizadas para o experimento. As cepas de *P. fluorescens* e *P. putida* estocadas em caldo BHI e glicerol (0°C) foram recuperadas a partir da inoculação em 200 ml de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) reconstituído a 12% (SANTOS et al., 2010), incubado a 21°C/48 horas (GUERREIRO et al., 2005). Posteriormente, determinou-se a população desses micro-organismos através do plaqueamento em superfície, a ágar base para *Pseudomonas* com suplemento CFC (Himedia, Mumbai, India), seguido de incubação a 30°C por 48 h (FAGUNDES et al., 2006).

Definida a população do inóculo, foram realizadas diluições decimais em solução salina 0,85% (NERO et al., 2005; NERO; VIÇOSA; PEREIRA, 2009) até atingir as populações de  $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL. As diluições selecionadas foram



divididas em microtubos estéreis de 2 mL e utilizadas como cultura para o experimento.

## 2.4 CAPACIDADE DE MULTIPLICAÇÃO E DE LIPÓLISE

Foram executados dois experimentos diferentes, um com *P. fluorescens*, outro com *P. putida* (duplicata). A pesquisa realizou-se a partir de alíquotas de 200 mL de leite em pó integral (Ninho, Nestlé, Brasil) reconstituído a 12%, esterilizado a 121°C/ 15 minutos (GLORIA et al., 2011; SANTOS et al., 2010). Separadamente, os leites foram inoculados com 2mL das populações  $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL dos microorganismos, armazenados nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 horas (M0, M24, M48, M72, M96 respectivamente) e incubados à temperaturas de 2°C, 4°C e 8°C, programadas em B.O.D (Biochemistry Oxygen Demand) (Tecnal, Piracicaba, Brasil).

### 2.4.1 Contagem de *P. fluorescens* e *P. putida*

Para enumeração das espécies foi utilizado o meio de cultura *Pseudomonas* ágar base com adição de suplemento CFC (Cetrimida 5mg, fucidina 5mg, Cefaloridina 25mg). As amostras de leite inoculadas com as respectivas espécies foram diluídas em solução salina 0,85%, plaqueadas em superfície e incubadas a 30°C por 48 horas (FAGUNDES et al., 2006). Ao fim desse período, a leitura e interpretação dos resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL da amostra.

### 2.4.2 Avaliação da lipólise

A dosagem de ácidos graxos livres no leite foi realizada em duplicata e determinada pelo método Lipo R (MAHIEU, 1984), sendo executada em três etapas, descritas à seguir e ilustradas nos anexos 1, 2 e 3.

#### 2.4.2.1 Primeira etapa: extração

Transferiu-se, com o auxílio de uma pipeta volumétrica 4 mL dos leites, 16ml do reagente Lipo R (composição: 441 mL de isopropanol, 447,75 mL de éter de

petróleo, 11,25 mL de ácido sulfúrico-4N) e 5 mL de água destilada para tubos de ensaio com rosca. Os tubos foram fechados e agitados (por viragem) 15 vezes. Após, as amostras permaneceram em repouso durante 5 minutos, ocorrendo então, decantação e conseqüente formação de um líquido sobrenadante (sobrenadante 1).

#### 2.4.2.2 Segunda etapa: lavagem

Com o auxílio de uma pipeta automática, 8 mL dos sobrenadantes 1 foram transferidos para novos tubos de ensaio com rosca, acrescido de 4 mL de líquido de lavagem (composição: ácido sulfúrico a 0,05 % em meio aquoso). Os tubos foram fechados e agitados (por viragem) 15 vezes. As amostras permaneceram em repouso por mais 5 minutos e, em seguida, ocorreu nova decantação, com a formação de um novo sobrenadante (sobrenadante 2).

#### 2.4.2.3 Terceira etapa: titulação

Com o auxílio de uma pipeta automática, transferiu-se 4 mL dos sobrenadantes 2 para béquers, acrescentou-se 5 gotas do indicador Azul de Timol (composição: 1g de azul de timol em 1,6 L de Butanol-2) e titulou-se as reações com solução KOH (hidróxido de potássio em solução etanólica 0,002N) e auxílio de bureta graduada. O mesmo procedimento foi repetido substituindo-se o leite por água destilada, de modo a obter-se o “controle”.

Os resultados finais foram expressos em **mEq/L** da amostra e obtidos através da fórmula:

$$\frac{AGLmEq}{L} = (X - B) \cdot Fc$$

Sendo **X**, o volume necessário de base para neutralizar o sobrenadante 2 oriundo do leite; **B** o volume do sobrenadante 2, oriundo do procedimento com água destilada e **Fc**, o fator de correção do próprio KOH (MAHIEU, 1984).

## 2.5 DETERMINAÇÃO DE pH E ACIDEZ TITULÁVEL

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica foram transferidos 10 mL dos leites, inoculados com as espécies *P. fluorescens* e *P. putida*, estocados em diferentes tempos, temperaturas e populações para erlenmeyers, onde determinou-se o potencial hidrogeniônico das amostras com o auxílio do pHmetro Tecnal/Tec-5 (São Paulo, Brasil). Em seguida, concluído as análises de pH, adicionou-se 3-4 gotas da solução alcoólica de fenolftaleína a 1% e titulou-se com solução Dornic até o aparecimento da coloração rósea. As análises físico-químicas foram executadas em duplicata e, posteriormente, os cálculos para determinação da acidez titulável se deu através da seguinte fórmula:

$$V(\text{mL}) \cdot 10 = \text{Acidez}^\circ D$$

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados microbiológicos obtidos referentes a multiplicação bacteriana de cada espécie, seguiram distribuição normal, desta maneira, foram submetidos ao Teste paramétrico de Tukey ( $p < 0,05$ ), ao nível de 5% de significância, com auxílio do programa Statistica (STATSOFT, 2008).

Para as análises físico-químicas, a normalidade dos dados foi submetida ao teste de Kolmogorov-Smirnov e Lilliefors. Como os dados referentes a produção de ácidos graxos livres não seguiram distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

Para comparação da capacidade lipolítica entre *P. fluorescens* e *P. putida* e verificação do micro-organismo mais lipolítico foi utilizado o teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E TEMPO DE INCUBAÇÃO NA MULTIPLICAÇÃO DE DIFERENTES INÓCULOS DE *P. putida*

De acordo com a tabela 1, durante a análise da influência da temperatura de estocagem sobre a multiplicação bacteriana, dentro do mesmo inóculo e momento de incubação, pode-se observar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na população dessa espécie à 8°C, no tempo 96 h (M96) e inóculo  $10^2$  UFC/mL.

Para população inicial  $10^6$  UFC/mL e tempo de estocagem (M24), a temperatura 4°C, diferiu de 2°C e 8°C ( $p < 0,05$ ). Já nos momentos M48 e M96 verificou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as três temperaturas estudadas, onde as maiores populações foram encontradas a 4°C e 8°C, respectivamente. Portanto, pontua-se que um leite com carga microbiana mais baixa ( $10^2$  UFC/mL), a temperatura de incubação influenciou a multiplicação bacteriana somente a partir de 96 h de estocagem e um leite com maior contagem de psicotróficos ( $10^6$  UFC/mL), a temperatura de armazenamento influenciou diretamente na multiplicação bacteriana com 24, 48 e 96 h de estocagem. Santana et al. (2001) relatam que o número inicial de micro-organismos no substrato é tão importante quanto interação tempo/temperatura para crescimento bacteriano, reforçando a ideia de que a qualidade microbiológica do leite e suas propriedades organolépticas estão intrinsicamente relacionadas com boas práticas de ordenha.

Tabela 1 - Populações médias de *Pseudomonas putida* (log UFC/mL) em leite integral a partir de diferentes inóculos iniciais ( $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL) incubado à (2°C, 4°C e 8°C) durante 96h.

População Inicial (UFC/mL)	T°C	Tempo (horas)				
		M0	M24	M48	M72	M96
$10^2$	2	2,10 <sup>A b</sup>	5,93 <sup>A a</sup>	5,83 <sup>A a</sup>	5,89 <sup>A a</sup>	5,83 <sup>B a</sup>
	4	2,10 <sup>A b</sup>	5,41 <sup>A a</sup>	5,98 <sup>A a</sup>	5,99 <sup>A a</sup>	6,16 <sup>B a</sup>
	8	2,10 <sup>A c</sup>	5,88 <sup>A b</sup>	6,20 <sup>A b</sup>	6,62 <sup>A b</sup>	7,69 <sup>A a</sup>
$10^5$	2	5,68 <sup>A a</sup>	6,23 <sup>A a</sup>	6,22 <sup>A a</sup>	6,19 <sup>A a</sup>	6,28 <sup>A a</sup>
	4	5,68 <sup>A a</sup>	6,37 <sup>A a</sup>	6,26 <sup>A a</sup>	6,26 <sup>A a</sup>	6,67 <sup>A a</sup>
	8	5,68 <sup>A c</sup>	6,29 <sup>A b c</sup>	6,95 <sup>A a b c</sup>	7,48 <sup>A a b</sup>	8,35 <sup>A a</sup>
$10^6$	2	6,42 <sup>A a</sup>	6,00 <sup>B a</sup>	6,18 <sup>C a</sup>	6,78 <sup>A a</sup>	6,00 <sup>C a</sup>
	4	6,42 <sup>A d</sup>	8,00 <sup>A b</sup>	8,11 <sup>A a</sup>	8,00 <sup>A b</sup>	7,64 <sup>B c</sup>
	8	6,42 <sup>A b</sup>	6,48 <sup>B b</sup>	6,85 <sup>B b</sup>	7,81 <sup>A a b</sup>	8,94 <sup>A a</sup>

<sup>A B C</sup> Letras maiúsculas diferentes sobrescritas em uma mesma coluna indicam diferença significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) na temperatura de incubação, no mesmo tempo, e mesmo inóculo inicial.

<sup>a b c d</sup> Letras minúsculas diferentes sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de incubação.

Analisando a influência dos tempos de incubação, em cada inóculo, nas temperaturas (2°C, 4°C e 8°C) ao longo de 96 h, verificou-se (Tabela 1) que a população inicial ( $10^2$  UFC/mL) de *P. putida*, quando estocada a 2°C e 4°C, apresentou-se constante a partir de 24 h ( $p > 0,05$ ). A 8°C foi observado aumento populacional com 24 h ( $p < 0,05$ ) de incubação, aumentando após 96 h de armazenamento. Assim, a menor velocidade de multiplicação do inóculo de  $10^2$  UFC/mL de *P. putida* foi observado a 2°C e 4°C e o tempo máximo ideal de estocagem para não ocorrer aumento na população a 8°C foi de 72 h.

Quando o inóculo  $10^5$  UFC/mL de *P. putida* foi incubado em diferentes temperaturas, observou-se aumento na contagem da população ( $p < 0,05$ ), somente a 8°C a partir de 72 h (M72) de armazenamento, em relação ao momento inicial (M0) de estocagem do micro-organismo. Já para o inóculo  $10^6$  UFC/mL o aumento populacional ( $p < 0,05$ ) foi detectado a 4°C a partir do M24 e a 8°C a partir do M96.

Durr (1975) retrata uma velocidade de multiplicação bem parecida ao obtida neste trabalho, ao demonstrar, que leites com carga inicial de  $10^5$  UFC/mL, submetidos a 4°C em dois dias de estocagem, avançaram uma casa logarítmica.

Assim, de maneira geral, as melhores condições de estocagem de um leite com  $10^2$  e  $10^5$  UFC/mL de *P. putida* foram observadas a 2°C e 4°C, onde os tempos de estocagem não favoreceram a multiplicação do micro-organismo. Já leites com carga microbiana  $10^6$  UFC/mL, podem ser estocados a 2°C por até 96 h, não ocorrendo dentro desse intervalo de tempo, aumento significativo ( $p>0,05$ ) da população.

### 3.2 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E TEMPO DE INCUBAÇÃO NA MULTIPLICAÇÃO DE DIFERENTES INÓCULOS DE *P. fluorescens*

De acordo com a tabela 2, analisando a influência da temperatura de estocagem sobre a multiplicação de *P. fluorescens*, dentro do mesmo inóculo e momento de incubação, pode-se observar diferença significativa ( $p<0,05$ ) na população inicial ( $10^2$  UFC/mL) dessa espécie à 8°C nos momentos (M48, M72 e M96).

Para população inicial  $10^5$  UFC/mL houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) também a partir de 48 h de armazenamento a 8°C em (M48 e M72), já para M96 a multiplicação do micro-organismo iniciou-se a 2°C, aumentando com o aumento da temperatura.

A temperatura de incubação também influenciou na multiplicação de *P. fluorescens* no inóculo  $10^6$  UFC/mL (Tabela 2). Houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) a partir do M48 estendendo-se até 96 h de armazenamento, onde a 8°C obteve-se maior multiplicação bacteriana. Desta forma, independente da população inicial, as temperaturas 2°C, 4°C e 8°C influenciaram na multiplicação bacteriana somente a partir de 48 horas de estocagem do leite. Para Nörnberg, Tondo e Brandelli (2009), um leite com reduzida carga bacteriana inicial não é suficiente para garantir a qualidade do produto. A temperatura e o período de armazenamento são determinantes, especialmente em relação aos micro-organismos psicrotóxicos, com aumento das contagens sob refrigeração ao longo do tempo.

Tabela 2 - Populações médias de *Pseudomonas fluorescens* (log UFC/mL) em leite integral a partir de diferentes inóculos iniciais ( $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL) incubado à (2°C, 4°C e 8°C) durante 96h.

População Inicial (UFC/mL)	T°C	Tempo (horas)				
		M0	M24	M48	M72	M96
$10^2$	2	2,18 <sup>A b</sup>	6,06 <sup>A a</sup>	6,15 <sup>B a</sup>	6,15 <sup>B a</sup>	6,66 <sup>B a</sup>
	4	2,18 <sup>A c</sup>	6,11 <sup>A b</sup>	6,36 <sup>B b</sup>	7,15 <sup>B a b</sup>	7,95 <sup>A B a</sup>
	8	2,18 <sup>A e</sup>	6,08 <sup>A d</sup>	7,48 <sup>A c</sup>	8,30 <sup>A b</sup>	9,09 <sup>A a</sup>
$10^5$	2	5,08 <sup>A b</sup>	6,08 <sup>A a</sup>	6,28 <sup>B a</sup>	6,51 <sup>B a</sup>	6,73 <sup>C a</sup>
	4	5,08 <sup>A c</sup>	6,18 <sup>A b</sup>	6,51 <sup>B b</sup>	7,10 <sup>B a b</sup>	7,72 <sup>B a</sup>
	8	5,08 <sup>A e</sup>	6,49 <sup>A d</sup>	7,72 <sup>A c</sup>	8,73 <sup>A b</sup>	10,11 <sup>A a</sup>
$10^6$	2	6,15 <sup>A a</sup>	6,00 <sup>A a</sup>	6,18 <sup>B a</sup>	6,48 <sup>B a</sup>	6,70 <sup>B a</sup>
	4	6,15 <sup>A b</sup>	6,18 <sup>A b</sup>	6,18 <sup>B b</sup>	7,19 <sup>A B a b</sup>	7,93 <sup>B a</sup>
	8	6,15 <sup>A d</sup>	6,48 <sup>A d</sup>	7,84 <sup>A c</sup>	8,98 <sup>A b</sup>	10,30 <sup>A a</sup>

<sup>A B C</sup> Letras maiúsculas diferentes sobrescritas em uma mesma coluna indicam diferença significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) na temperatura de incubação, no mesmo tempo, e mesmo inóculo inicial.

<sup>a b c d e</sup> Letras minúsculas diferentes sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de incubação.

Pesquisando a influência dos tempos de incubação, em cada inóculo, nas temperaturas (2°C, 4°C e 8°C) ao longo de 96 h, verificou-se (Tabela 2) que as populações iniciais de *P. fluorescens* ( $10^2$  e  $10^5$  UFC/mL), quando estocadas a 2°C apresentaram-se constantes a partir de 24 h de armazenamento. A 4°C a multiplicação bacteriana nestes inóculos mantiveram-se estáveis no M24, M48 e M72, seguido de aumento populacional no M96. Já a 8°C houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da população do micro-organismo até 96 h de estocagem.

Analisando o comportamento do inóculo  $10^6$  UFC/mL, constatou-se que a 2°C não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre momentos pesquisados. A 4°C o crescimento bacteriano instalou-se a partir de 96 h de incubação, já a 8°C foi observado aumento populacional com 48 h ( $p < 0,05$ ), aumentando ao longo de 96 h estudadas.

Izidoro et al. (2013) relataram uma contagem estatisticamente maior de bactérias psicrotróficas em leites incubados a 12°C, quando comparado com amostras estocadas a 8°C e 4°C. À medida que transcorria-se o tempo de armazenamento, observaram (M48) um aumento do número de colônias

psicrotróficas e de outras bactérias adaptadas ao frio. Santos et al. (2009) também observaram um aumento crescente da microbiota psicrotrófica à medida que aumentava-se o tempo de armazenamento. Constataram que a estocagem do leite cru refrigerado por períodos maiores que 48 horas são um problema para a qualidade do leite, pois aumenta a contagem desses micro-organismos, afetando principalmente o rendimento final dos derivados lácteos.

Portanto, de maneira geral, as melhores condições de armazenamento de um leite com diferentes populações de *P. fluorescens* ( $10^2$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  UFC/mL) podem ser observadas a 2°C, onde os tempos de estocagem (M24, M48, M72 e M96) não favoreceram a multiplicação do micro-organismo.

### 3.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A CAPACIDADE LIPOLÍTICA DE DIFERENTES INÓCULOS DE *P. putida*

De acordo com a tabela 3, analisando a influência da temperatura sobre a concentração de ácidos graxos livres, dentro do mesmo inóculo e momento de estocagem, observou-se que em populações iniciais  $10^2$  e  $10^6$  UFC/mL a temperatura de incubação influenciou na concentração de ácidos graxos a partir de 96 h, quando comparadas as temperaturas de 2°C e 8°C ( $p < 0,05$ ). Analisando o comportamento do inóculo  $10^5$  UFC/mL, constatou-se que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as temperaturas pesquisadas. Assim, a temperatura de incubação, para as três populações testadas, não influenciou no índice de lipólise em 24, 48 e 72 h de estocagem. Exceções foram observadas somente com 96 h de armazenamento.



Tabela 3 - Resultados médios de lipólise em mEq/L das amostras de leite inoculado com diferentes populações de *P. putida* ( $10^2$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  UFC/mL), incubadas à 2°C, 4°C e 8°C, durante 96 h de estocagem.

População Inicial (UFC/mL)	T°C	Tempo (horas)			
		M24	M48	M72	M96
$10^2$	2	0,27 <sup>A b</sup>	0,38 <sup>A a b</sup>	0,48 <sup>A a b</sup>	0,64 <sup>B a</sup>
	4	0,32 <sup>A b</sup>	0,43 <sup>A a b</sup>	0,54 <sup>A a b</sup>	0,72 <sup>A B a</sup>
	8	0,40 <sup>A b</sup>	0,51 <sup>A a b</sup>	0,62 <sup>A a b</sup>	0,86 <sup>A a</sup>
$10^5$	2	0,29 <sup>A b</sup>	0,43 <sup>A a b</sup>	0,51 <sup>A a b</sup>	0,67 <sup>A a</sup>
	4	0,32 <sup>A b</sup>	0,46 <sup>A a b</sup>	0,54 <sup>A a b</sup>	0,67 <sup>A a</sup>
	8	0,38 <sup>A b</sup>	0,56 <sup>A a b</sup>	0,64 <sup>A a b</sup>	0,86 <sup>A a</sup>
$10^6$	2	0,27 <sup>A b</sup>	0,46 <sup>A a b</sup>	0,46 <sup>A a b</sup>	0,64 <sup>B a</sup>
	4	0,38 <sup>A b</sup>	0,46 <sup>A a b</sup>	0,62 <sup>A a b</sup>	0,72 <sup>A B a</sup>
	8	0,40 <sup>A b</sup>	0,67 <sup>A a b</sup>	0,67 <sup>A a b</sup>	0,86 <sup>A a</sup>

<sup>A B</sup> Letras maiúsculas diferentes sobrescritas em uma mesma coluna indicam diferença significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) na temperatura de incubação, no mesmo tempo, e mesmo inóculo inicial.

<sup>a b</sup> Letras minúsculas diferentes sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de incubação.

Analisando a influência dos tempos de incubação, em cada inóculo, nas temperaturas (2°C, 4°C e 8°C) ao longo de 96 h, verificou-se (Tabela 3) que independente do inóculo e temperatura testados, a concentração de ácidos graxos livres apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) somente entre os momentos 24 e 96 h de estocagem.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos, verificou-se que um leite com diferentes populações de *P. putida* ( $10^2$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  UFC/mL) pode ser estocado a 2°C, 4°C ou 8°C por um período de até 72 h (3 dias), não ocorrendo dentro desse intervalo de tempo (M24, M48, M72), aumento significativo ( $p > 0,05$ ) na concentração desse lipídeo.

De maneira geral, à medida que aumentou-se o tempo de estocagem e a temperatura de incubação, intensificou-se a multiplicação do micro-organismo testado e a concentração de ácidos graxos livres presentes nas amostras.

### 3.4 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A CAPACIDADE LIPOLÍTICA DE DIFERENTES INÓCULOS DE *P. fluorescens*

Considerando o efeito da temperatura dentro do mesmo tempo e inóculo inicial (Tabela 4), observou-se que para população  $10^2$  UFC/mL não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) no índice de lipólise à medida que aumentou-se a temperatura de incubação.

Para os inóculos  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL de *Pseudomonas fluorescens* o aumento do índice de ácidos graxos livres foi verificado somente no (M48). Assim, em populações iniciais de  $10^5$  UFC/mL ocorreu diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas temperaturas  $2^\circ\text{C}$  e  $4^\circ\text{C}$ , onde a quantidade aferida foi de 1,50 mEq/L e 1,86 mEq/L, respectivamente. Já no inóculo  $10^6$  UFC/mL constatou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre  $4^\circ\text{C}$  e  $8^\circ\text{C}$ , onde o índice de lipólise foi de 1,53 mEq/L e 1,89 mEq/L, respectivamente.

Izidoro et al. (2003), pesquisando o teor de ácidos graxos livres em leites incubados a  $4^\circ\text{C}$ ,  $8^\circ\text{C}$  e  $12^\circ\text{C}$  e estocados por 0, 12, 24 e 48 horas, reportaram média de 1,89 mEq/L ( $4^\circ\text{C}$ ) e 1,18 mEq/L ( $8^\circ\text{C}$ ) com 24 h de estocagem. Resultados mais destoantes foram verificados a  $4^\circ\text{C}$  com 48 h de armazenamento, onde relataram valores médios de 2,65 mEq/L.

Tabela 4 - Resultados médios de lipólise em mEq/L das amostras de leite inoculado com diferentes populações de *P. fluorescens* ( $10^2$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  UFC/mL), incubadas à 2°C, 4°C e 8°C, durante 96 h de estocagem.

População Inicial (UFC/mL)	T°C	Tempo (horas)			
		M24	M48	M72	M96
$10^2$	2	1,23 <sup>A a</sup>	1,26 <sup>A a</sup>	1,61 <sup>A a</sup>	1,75 <sup>A a</sup>
	4	1,54 <sup>A a</sup>	1,57 <sup>A a</sup>	1,89 <sup>A a</sup>	1,93 <sup>A a</sup>
	8	1,55 <sup>A a b</sup>	1,47 <sup>A b</sup>	1,72 <sup>A a b</sup>	2,72 <sup>A a</sup>
$10^5$	2	1,37 <sup>A a</sup>	1,50 <sup>B a</sup>	1,66 <sup>A a</sup>	1,79 <sup>A a</sup>
	4	1,63 <sup>A a</sup>	1,86 <sup>A a</sup>	1,89 <sup>A a</sup>	2,00 <sup>A a</sup>
	8	1,58 <sup>A b</sup>	1,63 <sup>A B a b</sup>	1,77 <sup>A a b</sup>	2,57 <sup>A a</sup>
$10^6$	2	1,63 <sup>A a</sup>	1,72 <sup>A B a</sup>	1,74 <sup>A a</sup>	1,85 <sup>A a</sup>
	4	1,61 <sup>A a b</sup>	1,53 <sup>B b</sup>	1,75 <sup>A a b</sup>	1,93 <sup>A a</sup>
	8	1,72 <sup>A b</sup>	1,89 <sup>A a b</sup>	1,89 <sup>A a b</sup>	2,39 <sup>A a</sup>

<sup>A B</sup> Letras maiúsculas diferentes sobrescritas em uma mesma coluna indicam diferença significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) na temperatura de incubação, no mesmo tempo, e mesmo inóculo inicial.

<sup>a b</sup> Letras minúsculas diferentes sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de incubação.

Avaliando o efeito do tempo de estocagem sobre lipólise (Tabela 4), observou-se que para populações iniciais ( $10^2$  e  $10^5$  UFC/mL) nas temperaturas 2°C e 4°C os níveis de ácidos graxos permaneceram estáveis durante as 96 h de armazenamento. Esses inóculos ( $10^2$  e  $10^5$  UFC/mL) apresentaram aumento apenas sob refrigeração a 8°C, onde observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre M48 e M96 e entre M24 e M96, respectivamente. Em concentrações iniciais de  $10^6$  UFC/mL de *Pseudomonas fluorescens* a incubação a 4°C promoveu aumento no índice de lipólise, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tempos 48 e 96 horas de estocagem. A 8°C o aumento ( $p < 0,05$ ) ocorreu em 24 e 96 h de armazenamento.

Assim, de modo geral, os maiores índices de lipólise (Tabela 4), caracterizada pela hidrólise dos glóbulos de gordura através da ação das lipases bacterianas, ocorreram em inóculos  $10^2$  e  $10^5$  UFC/mL a partir de 8°C, onde o tempo de estocagem influenciou no aumento da concentração de ácidos graxos livres. Com inóculos  $10^6$  UFC/mL, o tempo de incubação teve influência sobre a lipólise a partir

de 4°C.

Fazendo uma breve comparação entre a multiplicação de *P. fluorescens* e a lipólise por ela produzida, foi verificado que, de maneira geral, à medida que aumentou-se o tempo de estocagem e a temperatura de incubação, intensificou-se a multiplicação do micro-organismo testado e a concentração de ácidos graxos livres presentes nas amostras.

A comparação entre os dois micro-organismos estudados através do Teste Mann-Whitney, destacou que existe diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na produção de ácidos graxos livres entre as duas espécies, em todos os inóculos, temperaturas e momentos testados. Desta forma, baseando-se nos dados obtidos pode-se afirmar que *P. fluorescens* é mais lipolítica que *P. putida*. Pesquisa realizada para observar a diversidade genética e a produção de enzimas extracelulares (protease, lipase e lecitinase) por *Pseudomonas* spp. em amostras de leite cru e pasteurizado, demonstrou que a maioria dos isolados encontrados foram de *P. fluorescens* e *P. putida*, além disso, 69% das estirpes de *P. fluorescens* foram positivas para todas as atividades enzimáticas, enquanto a maioria das cepas de *P. putida* (87,5%) foram negativas para todas as atividades testadas (DOGAN; BOOR, 2003).

Deste modo, as condições ideais para não ocorrer aumento no índice de lipólise em leites contendo populações  $10^2$  e  $10^5$  UFC/mL do micro-organismo foram observadas a 2°C e 4°C, onde tempo de armazenamento (M24, M48, M72, M96) não intensificou a concentração de ácidos graxos livres das amostras. Em leites com carga microbiana maior ( $10^6$  UFC/mL) condições favoráveis foram verificadas somente a 2°C, onde o índice de ácidos graxos permaneceu estável durante as 96 h de estocagem (Tabela 4).

### 3.4 INFLUÊNCIA DO pH E ACIDEZ TITULÁVEL EM LEITES COM DIFERENTES INÓCULOS DE *P. putida* E *P. fluorescens*

Os valores obtidos para pH e acidez das amostras inoculadas com diferentes populações de *P. putida* variaram entre 6,2 a 6,4 e 19°D a 21°D, respectivamente. Já para amostras inoculadas com *P. fluorescens* os valores foram similares e variaram entre 6,4 a 6,5 (pH) e 19°D a 21°D (acidez).

Izidoro et al. (2013) observaram que leites incubados a 12°C com 48 h de

estocagem apresentaram valores médios para acidez de 21°D. Para leites incubados a 4°C e 8°C não constatarão diferença significativa na acidez entre as duas temperaturas e entre os tempos de armazenamento (12h, 24h e 48h).

À medida que elevou-se a temperatura e os tempos de incubação não houve alteração dos valores de pH e acidez das amostras. Também não houve correlação entre as populações iniciais ( $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL) de *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens* com o aumento ou diminuição destas duas variáveis.

#### 4 CONCLUSÃO

Leites com diferentes populações de *P. putida* ( $10^2$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  UFC/mL) podem ser estocados a 2°C, 4°C ou 8°C por um período de até 72 h (3 dias), não ocorrendo dentro desse intervalo de tempo (24, 48 e 72 horas), aumento significativo ( $p > 0,05$ ) na concentração de ácidos graxos livres. Assim, o tempo 96 horas foi determinante para aumento da concentração desse lipídeo.

Os maiores índices de lipólise, em amostras contendo *P. fluorescens* foram observados nos inóculos  $10^2$  e  $10^5$  UFC/mL a partir de 8°C, onde o tempo de estocagem influenciou no aumento da concentração de ácidos graxos livres. Para inóculos  $10^6$  UFC/mL, o tempo de incubação teve influência sobre a lipólise a partir de 4°C, sendo então mais importante o controle da refrigeração.

À medida que elevamos a temperatura de incubação e o tempo de estocagem intensificou-se a multiplicação dos micro-organismos testados e conseqüentemente, a concentração de ácidos graxos livres tornaram-se mais proeminentes.

#### REFERÊNCIAS

ALMEIDA, K. M. **População de *Pseudomonas* spp. e *P. fluorescens* em leite cru refrigerado**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, UNOPAR, Londrina, 2014.

ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicrófilas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: \_\_\_\_\_. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Templo, 2003. p. 105-115.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias

psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, nov. 2008.

BORGES, M. F.; BRANDÃO, S. C. C.; PINHEIRO, A. J. R. Efeito bactericida do peróxido de hidrogênio sobre *Salmonella* em leite destinado a fabricação de queijos. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 145-149, set. 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 62, de 29 de Dezembro de 2011**. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Seção 1, 30 de Dezembro de 2011.

CHANDLER, R. E.; MCMEEKIN, T. A. Temperature function integration and its relationship the spoilage of pasteurized, homogenized milk. **Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 40, n. 1, p. 37-41, mar. 1985.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, n. 2, p. 172-207, Feb. 1982.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 130-138, jan. 2003.

DOMARESKI J. L.; BANDIERA N. S.; SATO R. T.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 60, n. 3, p. 261-262, ago. 2010.

DURR, R. Development of psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk at French dairy farms. **Dairy Science Abstract**, [S. l.], v. 326, p. 913-919, 1975.

FAGUNDES, C. M.; FISCHER, V.; SILVA, W. P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M. R. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 568-572, mar./abr. 2006.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R. T. (Ed.). **Standard methods for the examination of dairy products**. 16. ed. New York: American Public Health Association, 1992. p. 837-856.

GLORIA, A. B. M.; SARAIVA, L. R. P.; RIGUEIRA, S. C. J.; BRANDÃO, C. C. S. Bioactive amines changes in raw and sterilised milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens* stored at different temperatures. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 64, n. 1, p. 45-51, fev. 2011.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENERI, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas

profiláticas no manejo de produção. **Revista Ciência e Agrotecnologia de Alimentos**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, jan./fev. 2005.

IZIDORO, T. B.; PEREIRA, J. G.; SOARES, V. M.; PINTO, J. P. A. N. Effect of psychrotrophic growth on the milk fat fraction at different temperatures of storage. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 78, n. 4, p. 615-618, abr. 2013.

JONGHE, V.; COOREVITS, A.; HOORDE, K. V.; MESSENS, W.; LANDSCHOOT, A. V.; VOS, P.; HEYNDRIKX, M. Influence of storage conditions on the growth of pseudomonas species in refrigerated raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 2, p. 460-470, Nov. 2010.

KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. **Journal of Applied Sciences Research**, Newtown, v. 3, n. 11, p. 1383-1387, Sept./Dec. 2007.

MAHIEU, H. Methode rapide de dosage des acides gras libres dans le lait: methode Lipo R. **Revue Médecine Vétérinaire**, [S. l.], v. 135, p. 709-716, jun. 1984.

MAHIEU, H. Modificaciones de la leche después de su recogida. In: LUQUET, F. M. **Leche y productos lácteos: la leche de la mama a la lechería**. Zaragoza: Acribia, 1991. p. 181-226.

MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; ARRUDA, M. T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, out./dez. 2008.

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**, Berlin, v. 228, p. 725-734, Nov. 2009.

MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: 1. factors influencing raw and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, England, v. 49, n. 1, p. 24-32, fev. 1996.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 191-195, jan./mar. 2005.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinado por característica de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 386-390, abr./jun. 2009.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrótróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

NUÑEZ, M.; NUÑEZ, J. A. Proteasas de psicrotrofos gram negativos: efectos sobre la leche y los productos lácteos. **Revista Espanola de Lecheria**, Madrid, n. 130, p.

251-260, dez.1983.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 645-651, jul./set. 2006.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 145-154, jul./dez. 2001.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, mar. 2001.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; SOUZA, C. M.; ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos em leite cru refrigerado na macrorregião de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 4, p. 1237-1245, out./dez. 2009.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; MOREIRA, N. G.; BARROS, C. J.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Evolução da proteólise do leite inoculado *in vitro* com *Pseudomonas fluorescens*. **B. Ceppa**, Curitiba, v. 28, n. 2, p. 313-320, jul./ dez. 2010.

SCARPELLINI, M.; FRANZETTI, L.; GALLI, A. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 236, p. 257-260, jun. 2004.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trend in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, p. 35-37, Fevb 1997.

SPIPKER, T.; COENYE, T.; VANDAME, P.; LIPUMA, J. J. PCR-Based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Belgium, v. 42, n. 5, p. 2074-2079, May 2004.

STATSOFT, Inc. **Statistica 8.0 for windows** [Data analysis software system]. Tulsa: Statsof, 2008.

SUHREN, G. Producer microorganism. In: MCKELLER, R. C. **Enzymes of psychrotrophs in raw food**. Boca Raton: CRC, 1989. p. 4-34.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2<sup>rd</sup>. Boca Raton: CRC Press, 2006.

YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. PCR amplification and direct sequencing of gyrB genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Japão, v. 61, n. 3, p. 1104-1109, mar. 1995.



## 5 CONCLUSÃO GERAL

Leites com diferentes populações de *P. putida* ( $10^2$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  UFC/mL) podem ser estocados a 2°C, 4°C ou 8°C por um período de até 72 h (3 dias), não ocorrendo dentro desse intervalo de tempo (M24, M48, M72), aumento significativo ( $p > 0,05$ ) na concentração de ácidos graxos livres.

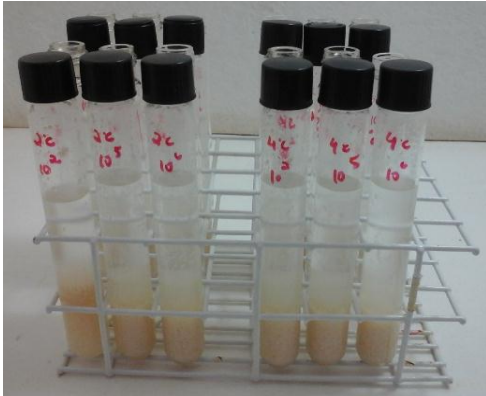
Os maiores índices de lipólise, em amostras contendo *P. fluorescens* foram observados nos inóculos  $10^2$  e  $10^5$  UFC/mL a partir de 8°C, onde o tempo de estocagem influenciou no aumento da concentração de ácidos graxos livres. Para inóculos  $10^6$  UFC/mL, o tempo de incubação teve influência sobre a lipólise a partir de 4°C, sendo então mais importante o controle da refrigeração.

À medida que elevamos a temperatura de incubação e o tempo de estocagem intensificou-se a multiplicação dos micro-organismos testados e conseqüentemente, a concentração de ácidos graxos livres tornaram-se mais proeminentes.

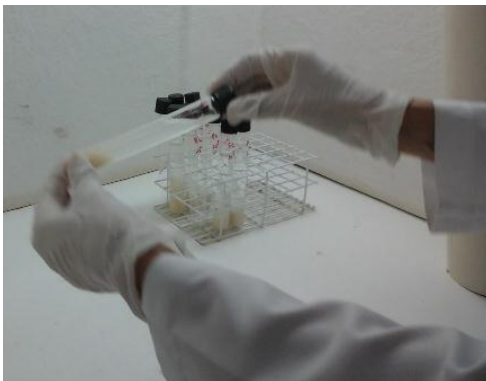
Assim, ação de lipases bacterianas é influenciada pela temperatura e tempo de armazenamento do leite. A contaminação da matéria-prima com *P. putida* e *P. fluorescens* acarreta prejuízos à porção graxa do leite, comprometendo sua qualidade.

**ANEXOS**

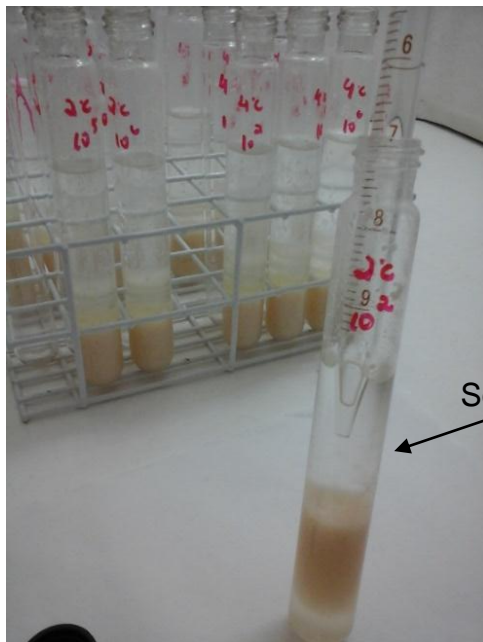
Anexo 1 - Primeira etapa (extração) da dosagem de ácidos graxos livres no leite, determinada pelo método Lipo R (MAHIEU, 1984).



1. Transferiu-se 4 mL de leite, 16ml do reagente Lipo R e 5 mL de água destilada para tubos de ensaio com rosca.



2. Os tubos foram fechados e agitados (por viragem) 15 vezes.



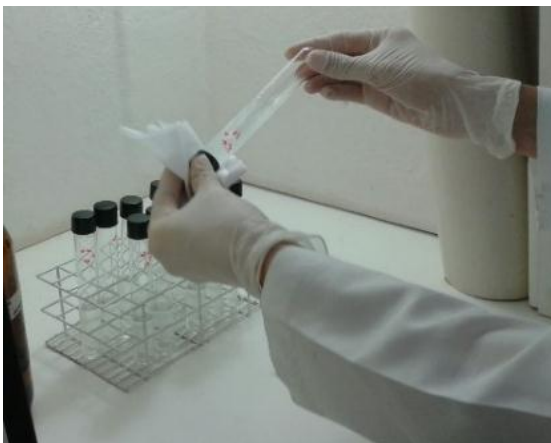
3. As amostras permaneceram em repouso por 5 minutos, ocorrendo decantação e formação de um líquido sobrenadante.

Fonte: Do Autor (2016).

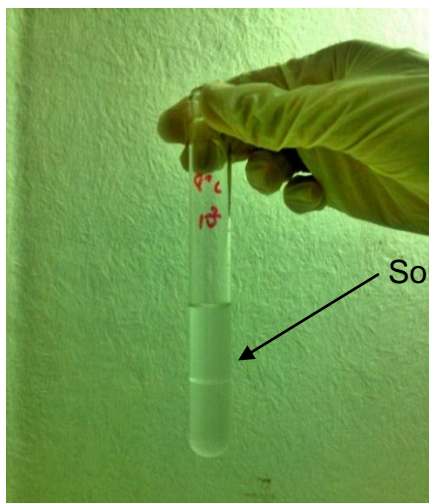
Anexo 2 - Segunda etapa (lavagem) da dosagem de ácidos graxos livres no leite, determinada pelo método Lipo R (MAHIEU, 1984).



4. Transferiu-se 8 mL do sobrenadante 1 para novos tubos de ensaio com rosca, acrescido de 4 mL de líquido de lavagem.



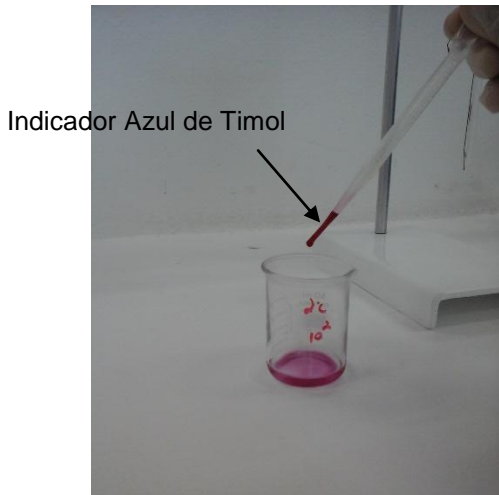
5. O tubo foi fechado e agitado (por viragem) 15 vezes.



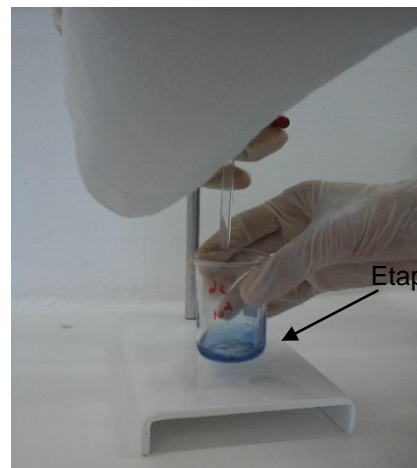
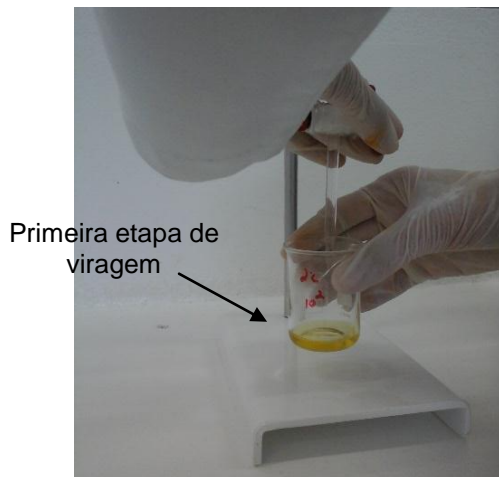
6. As amostras permaneceram em repouso por 5 minutos, ocorrendo nova decantação e formação de um novo sobrenadante.

Fonte: Do Autor (2016).

Anexo 3 - Terceira etapa (titulação) da dosagem de ácidos graxos livres no leite, determinada pelo método Lipo R (MAHIEU, 1984).



7. Transferiu-se 4 mL dos sobrenadantes 2 para béquers, acrescentou-se 5 gotas do indicador Azul de Timol e titulou-se as reações com solução KOH e auxílio de bureta graduada.



Fonte: Do Autor (2016).