

**CAPACIDADE LIPOLÍTICA DE *Pseudomonas fluorescens* ISOLADAS DE LEITE CRU REFRIGERADO.**

Ayumi Kato (Bolsista FUNADESP/UNOPAR), e-mail: [ayumi-kato@hotmail.com](mailto:ayumi-kato@hotmail.com). Elsa Helena Walter de Santana (Orientadora), e-mail: [elsahws@hotmail.com](mailto:elsahws@hotmail.com).

Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) / Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados

**Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos****Introdução**

A refrigeração do leite cru por períodos prolongados pode comprometer a sua qualidade, devido a possibilidade de seleção de bactérias psicotróficas que são capazes de desenvolver-se em temperaturas abaixo de 7°C. Sendo assim, 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. Entre os organismos psicotróficos, o gênero mais frequentemente isolado do leite cru refrigerado é o *Pseudomonas* spp., pois apresenta melhor capacidade de multiplicação e crescimento sob refrigeração quando comparado com outras bactérias Gram-negativas, e em sua maioria produz enzimas extracelulares que resistem às temperaturas comumente utilizadas no processamento térmico do leite e derivados. A síntese de lipases e proteases termorresistentes ocorre quando a população de psicotróficos atinge uma contagem entre  $10^6$  a  $10^7$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL, em que são suficientes para promover alterações sensoriais no leite, resultando na perda de qualidade do produto processado.

*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. Dessa forma, torna-se importante a avaliação da capacidade lipolítica de cepas psicotróficas de *Pseudomonas fluorescens* em diferentes tempos e temperaturas, a fim de determinar melhores condições de estocagem do leite cru refrigerado, aumentando a vida útil dos produtos lácteos processados.

**Material e Métodos**

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. Para identificação da espécie *P. fluorescens*, os isolados bacterianos foram submetidos às reações de PCR (Reação em Cadeia Polimerase) conforme protocolo descrito por Scarpelini, Franzetti e Galli (2004), com modificações.

A avaliação da capacidade lipolítica de *P. fluorescens* foi executada a partir de alíquotas de 200 mL de leite em pó integral (Ninho, Nestlé, Brasil) reconstituído a 12%, esterilizado a 121°C/ 15 minutos. Separadamente, os leites foram inoculados com 2mL das populações 10<sup>2</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> UFC de *P. fluorescens*/mL, armazenados nos tempos 24, 48, 72, 96 horas (M24, M48, M72, M96 respectivamente) e incubados à temperaturas de 2 °C, 4 °C e 8 °C.

Para enumeração de pseudomonas 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 a espécie foram diluídas em solução salina 0,85%, plaqueadas em superfície e incubadas a 30°C por 48 horas. A avaliação da lipólise foi determinada através dos ácidos graxos livres pelo método LipoR (extração, lavagem e titulação) (MAHIEU, 1984).

## Resultados e Discussão

O efeito da temperatura dentro do mesmo tempo e inóculo inicial (Quadro 1) demonstrou que populações iniciais de 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> UFC/mL o aumento do índice de ácidos graxos livres foi verificado somente com 48h de estocagem. Assim, em populações iniciais de 10<sup>5</sup> UFC/mL ocorreu diferença significativa (p<0,05) nas temperaturas 2 °C e 4 °C, onde a quantidade aferida foi de 1,50 mEq/L e 1,86 mEq/L, respectivamente. Já no inóculo 10<sup>6</sup> UFC/mL constatou-se diferença significativa (p<0,05) entre 4 °C e 8 °C, onde o índice de lipólise foi de 1,53 mEq/L e 1,89 mEq/L, respectivamente.

**Quadro 1-** Resultados médios de lipólise em mEq/L das amostras de leite inoculado com diferentes populações de *P. fluorescens* (10<sup>2</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> 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 <sup>2</sup>	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 <sup>5</sup>	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 <sup>6</sup>	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>AB</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>ab</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.

**Fonte:** Pereira (2016).

O efeito do tempo de estocagem sobre lipólise em inóculos 10<sup>2</sup> e 10<sup>5</sup> UFC/mL demonstraram aumento apenas sob refrigeração a 8 °C, onde observou-se diferença significativa (p<0,05) entre 48 e 96h e entre 24 e 96h, respectivamente. Em

concentrações iniciais de  $10^6$  UFC/mL de *P. 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, 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 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.

### **Conclusão**

Nas menores populações ( $10^2$  e  $10^5$  UFC/mL) de *P. fluorescens*, a temperatura mais elevada (8°C) e tempo de estocagem prolongado contribuíram para o aumento da hidrólise de ácidos graxos. 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.

### **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) - UNOPAR, Londrina, 2014.

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

FAGUNDES, C.M. *et al.* Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. *Ciênc. Rural*, v.36, n.2, p.568-572, 2006.

GLORIA, A.B.M. *et al.* Bioactive amine changes in raw and sterilised milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens* stored at different temperatures. *Int. J. Dairy Technol.*, v.64, n.1, p.45-51, 2011.

MAHIEU, H. Méthode rapide de dosage des acides gras libres dans le lait: méthode Lipo R. *Revue Méd. Vét.*, v.135, p.709-716, 1984.

MU, Z.; DU, M.; BAI, Y. Purification and properties of a heat-stable enzyme of *Pseudomonas fluorescens* Rm12 from raw milk. *Euro. Food Res. Technol.*, v.228, p.725-734, 2009.

SANTANA, E.H.W. *et al.* Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotóxicos. *Semina Ciênc. Agrárias*, v.22, n.2, p.145-154, 2001.

SANTOS, P.A. *et al.* Evolução da proteólise do leite inoculado *in vitro* com *Pseudomonas fluorescens*. *B. Ceppa*, v.28, n.2, p.313-320, 2010.

SCARPELLINI, M.; FRANZETTI, L.; GALLI, A. Development of PCR assay to identify

*Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiology Letters*, v.236, p.257-260, 2004.

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