

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

Samera Rafaela Bruzaroski (Bolsista PIBITI/CNPq-UNOPAR), e-mail: samera.rafaela@hotmail.com. Elsa Helena Walter de Santana (Orientadora), e-mail: 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 estocagem do leite cru refrigerado por períodos maiores que 48 horas é um problema para a qualidade do leite e, principalmente, de derivados, pois aumenta a contagem de micro-organismos psicrófilos, refletindo negativamente na qualidade do leite cru refrigerado (SANTOS *et al.*, 2009).

Entre os organismos psicrófilos, o gênero mais frequentemente isolado do leite cru refrigerado é *Pseudomonas* spp, pois apresenta melhor capacidade de multiplicação e crescimento sob refrigeração quando comparado com outras bactérias Gram-negativas (SANTOS *et al.*, 2009).

Este gênero microbiano, além de ser o mais prevalente, produz, em sua maioria, enzimas extracelulares (JONGHE *et al.*, 2010) que resistem às temperaturas comumente utilizadas no processamento térmico do leite e derivados (SANTOS *et al.*, 2009), mantendo-se ativas e resultando em perdas econômicas importantes (JONGHE *et al.*, 2010). A síntese de lipases e proteases termorresistentes ocorre quando a população de psicrófilos atinge uma contagem entre 10^6 a 10^7 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL (COSTA *et al.*, 2002), promovendo modificações no sabor, odor e consistência, resultando na perda de qualidade do produto processado e diminuição da vida de prateleira (JONGHE *et al.*, 2010). Dessa forma, a avaliação da capacidade lipolítica de cepas de *P. putida* isoladas de leite cru torna-se importante, a fim de determinar melhores condições de estocagem do leite cru refrigerado, aumentando a vida útil do produto processado e de seus derivados lácteos.

Material e Métodos

As amostras de leite cru refrigerado foram coletadas de cinco produtores do município de Londrina-PR, todos com ordenha mecânica e uso de tanque de refrigeração por expansão (48 horas de estocagem), acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, e enviadas ao laboratório de microbiologia da Universidade Norte do Paraná. Posteriormente, essas cepas foram devidamente identificadas por meio de cultura *Pseudomonas* ágar base com adição de suplemento CFC (Cefalotina, Ácido Fusídico, Ceftriaxona) 30 °C/48 horas (FAGUNDES *et al.*, 2006) e mantidas a 0 °C em caldo Brain Heart Infusion (Himedia,

Mumbai, Índia) e glicerol (40%), sendo utilizadas como cultura para o presente experimento.

As cepas estudadas tiveram o gênero e a espécie confirmada utilizando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, USA), 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. 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* (Yamamoto e Harayama 1995). *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 MgCl₂(25mM), 2,0µL de dNTPs (2,5mM), 0,5µL de cada oligonucleotídeo (P734 e P1455r) e 1,0U (0,2µL) de GoTaq® DNA polimerase. Os produtos de PCR amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5x, e visualizados em transiluminador

Os isolados identificados como *P. putida* 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). A população desses microrganismos foi definida através do plaqueamento em superfície, no meio de cultura ágar base para *Pseudomonas* com suplemento CFC, seguido de incubação a 30°C por 48 h (FAGUNDES *et al.*, 2006), diluições decimais em solução salina foram realizadas até atingir as populações de 10², 10⁵ e 10⁶ UFC/mL, utilizadas como cultura para o experimento.

A pesquisa realizou-se a partir de alíquotas de 200 mL de leite em pó integral (Ninho, Nestlé, São Paulo, Brasil) reconstituído a 12%, esterilizado a 121°C/ 15 minutos (SANTOS *et al.*, 2010). Separadamente, os leites foram inoculados com 2mL das populações 10², 10⁵ e 10⁶ UFC/mL dos micro-organismos, armazenados nos tempos 24, 48, 72, 96 horas (M24, M48, M72, M96) e incubados à temperaturas de 2 °C, 4 °C e 8 °C. Para a enumeração das espécies foi utilizado o meio de cultura *Pseudomonas* ágar base com CFC, diluídas em solução salina 0,85%, plaqueadas e incubadas a 30°C/48 horas (FAGUNDES *et al.*, 2006). Para a 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: extração, lavagem e titulação.

Para a análise estatística, os resultados microbiológicos obtidos referentes a multiplicação bacteriana da espécie, seguiu 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). 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).

Resultados e Discussão

De acordo com a tabela, 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 10² e 10⁶ 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 10⁵ 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.

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 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 desses ácidos graxos livres.

Quadro 1 - Média de ácidos graxos livres 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 (mEq/L)	M48 (mEq/L)	M72 (mEq/L)	M96 (mEq/L)
10 ²	2	0,27 ^{A b}	0,38 ^{A a b}	0,48 ^{A a b}	0,64 ^{B a}
	4	0,32 ^{A b}	0,43 ^{A a b}	0,54 ^{A a b}	0,72 ^{A B a}
	8	0,40 ^{A b}	0,51 ^{A a b}	0,62 ^{A a b}	0,86 ^{A a}
10 ⁵	2	0,29 ^{A b}	0,43 ^{A a b}	0,51 ^{A a b}	0,67 ^{A a}
	4	0,32 ^{A b}	0,46 ^{A a b}	0,54 ^{A a b}	0,67 ^{A a}
	8	0,38 ^{A b}	0,56 ^{A a b}	0,64 ^{A a b}	0,86 ^{A a}
10 ⁶	2	0,27 ^{A b}	0,46 ^{A a b}	0,46 ^{A a b}	0,64 ^{B a}
	4	0,38 ^{A b}	0,46 ^{A a b}	0,62 ^{A a b}	0,72 ^{A B a}
	8	0,40 ^{A b}	0,67 ^{A a b}	0,67 ^{A a b}	0,86 ^{A a}

^{A B} 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. ^{a b} 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).

Conclusão

A capacidade lipolítica de *P. putida* testadas teve o maior índice de ácidos graxos livres no leite refrigerado a partir de 96 horas, destacando o tempo de estocagem prolongada como um fator determinante na qualidade do leite.

Referências

COSTA, L.M. *et al.* Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. *Arch. Latinoam. Nutr.*, v.52, n.2, p.1-13, 2002.

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.

GUERREIRO, P.K. *et al.* Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. *Rev. Ciênc. Agrotecnol. Aliment.*, v.29, n.1, p.216-222, 2005.

JONGHE, V. *et al.* Influence of storage conditions on the growth of pseudomonas species in refrigerated raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.77, n.2, p.460-470, 2010.

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

SANTOS, P.A. *et al.* Efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no desenvolvimento de microrganismos em leite cru refrigerado na macrorregião de Goiânia, GO. *Ciênc. Anim. Bras.*, v.10, n.4, p.1237-1245, 2009.

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

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