

COMPORTAMENTO PROTEOLÍTICO DE *Pseudomonas* spp. ISOLADA DE LEITE CRU REFRIGERADO

Samera Rafaela Bruzaroski (PIBITI/CNPq-UNOPAR) e-mail: samera.rafaela@hotmail.com. Elsa Helena Walter de Santana e-mail: elsahws@hotmail.com.

Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) / Mestrado em Ciência e Tecnologia do leite e Derivados.

Área do conhecimento: 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 psicotrópicos, refletindo negativamente na qualidade do produto (SANTOS *et al.*, 2009). Os psicotrópicos encontrados no leite são em sua maioria, Gram negativos, provenientes do meio ambiente e equipamentos de ordenha (CATANIO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2011), com aumento na população quando o leite é produzido em más condições higiênicas (GUERREIRO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2011; YAMAZI *et al.*, 2010). Os psicotrópicos, a partir de uma população mínima entre 10^6 e 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL (COSTA *et al.*, 2002; MUIR, 1996), produzem proteases e/ou lipases extracelulares termo resistentes (ARCURI *et al.*, 2008; TEBALDI *et al.*, 2008; VIDAL- MARTINS *et al.*, 2005). Estas enzimas resultam na perda de qualidade e na redução de vida útil do leite e de outros produtos lácteos, pois podem provocar alterações sensoriais, perda de consistência e gelificação (NÖRNBERG, TONDO; BRANDELLI, 2009). Desta maneira neste trabalho objetivou-se avaliar a índice de proteólise primária em leite inoculado com diferentes populações de *Pseudomonas* spp. e incubado sob refrigeração durante 96h.

Material e Métodos

As cepas de *Pseudomonas* spp. utilizadas neste experimento foram isoladas de amostras de leite cru refrigerado de produtores do município de Londrina-PR, (ALMEIDA, 2014) e estocadas em caldo Brain Heart Infusion (B.H. I), (Himedia, Mumbai, Índia) com 40% de glicerol a 0°C. Para recuperação das cepas, realizou-se o inóculo em leite integral reconstituído a 12% (21 °C/48 h) e o plaqueamento em superfície, em ágar base para pseudomonas com suplemento CFC (Himedia, Mumbai, Índia), a 30 °C/48h (FAGUNDES *et al.*, 2006). A partir da definição da população, foram realizadas diluições decimais em solução salina 0,85% até atingir as populações de 10^2 , 10^5 e 10^6 UFC/ ml. Cada diluição selecionada foi imediatamente utilizada como cultura para o experimento.

O estudo foi realizado a partir de alíquotas de 400 mL de leite integral reconstituído a 12%(121 °C/ 15 minutos), inoculado com as três populações determinadas e incubados a 2 °C, 4 °C, 8 °C. A contagem de *Pseudomonas* spp. foi em ágar base para pseudomonas com suplemento CFC (30 °C/ 48 h). A proteólise primária foi determinada através do método de Kjeldahl com Nitrogênio total e Nitrogênio não caseico (NNC). Os resultados obtidos foram

submetidos ao teste de Tukey ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), com auxílio do programa Statistica (STATSOFT, 2008).

Resultados e Discussão

Se considerarmos o efeito da temperatura dentro do mesmo tempo e inóculo, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$, letras maiúsculas) no índice de proteólise primária, exceto no inóculo de 10^2 UFC de *Pseudomonas* spp/mL onde no tempo de 24 horas a proteólise primária à 24 horas foi menor a 2 °C que a 8 °C (Tabela 1)

Tabela 1: Resultados médios de proteólise primária (%) das amostras de leite inoculado com *Pseudomonas* spp. com 3 diferentes populações (10^2 , 10^5 e 10^6 UFC/mL), incubadas a 2 °C, 4 °C e 8 °C durante 96h

População Inicial UFC/mL)	Temperatura °C	Tempo (horas)			
		24	48	72	96
10^2	2	7,65 ^{B,a,α}	7,67 ^{A,a,α}	8,65 ^{A,a,α}	5,41 ^{A,a,α}
	4	9,70 ^{A,B,a,α}	7,71 ^{A,a,α}	8,70 ^{A,a,α}	7,02 ^{A,a,α}
	8	10,64 ^{A,a,α}	10,21 ^{A,a,b,α}	9,58 ^{A,a,b,α}	5,36 ^{A,b,α}
10^5	2	8,48 ^{A,a,α}	8,44 ^{A,a,α}	10,96 ^{A,a,α}	5,20 ^{A,a,α}
	4	9,65 ^{A,a,α}	8,54 ^{A,a,α}	7,72 ^{A,a,b,α}	4,97 ^{A,b,α}
	8	10,14 ^{A,a,α}	9,67 ^{A,a,α}	10,73 ^{A,a,α}	4,71 ^{A,b,α}
10^8	2	8,41 ^{A,a,α}	9,61 ^{A,a,b,c,α}	8,51 ^{A,a,b,α}	5,21 ^{A,c,α}
	4	7,08 ^{A,a,α}	7,21 ^{A,a,α}	8,60 ^{A,a,α}	4,91 ^{A,b,α}
	8	8,42 ^{A,a,α}	9,44 ^{A,a,α}	8,79 ^{A,a,α}	7,07 ^{A,b,α}

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes sobrescritas em uma mesma coluna indicam diferença significativas ($p < 0,05$) na temperatura de incubação, em cada inóculo.

^{a,b,c} Letras minúsculas sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos de incubação, para cada inóculo.

^{α,β} Letras gregas sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) na mesma temperatura nos diferentes tempo de incubação, entre os três inóculos (10^2 , 10^5 , 10^6).

A porcentagem de proteólise primária indica a hidrólise da caseína do leite, pois é expressa pela relação nitrogênio não caseico em relação ao nitrogênio total da amostra, indicando o percentual de hidrólise da caseína. Para Muir (1996) a fração κ-caseína localizada na superfície da micela de caseína é preferencialmente hidrolisada por proteases de psicotrópicos, e esta hidrólise causa o desenvolvimento de gosto amargo e induz o aumento da viscosidade, com eventual formação de gel do leite UAT/UHT, quando submetido a prolongado período de armazenamento.

Ao avaliarmos o efeito do tempo na proteólise primária para o inóculo inicial de 10^2 UFC/mL, apenas sob refrigeração a 8 °C foi observada diferença significativa ($p < 0,05$, letras minúsculas) com redução neste índice no tempo 96hs, quando comparado com 24

horas de incubação. No inóculo inicial de 10^5 UFC/mL a estocagem a 4 °C com 96 horas promoveu redução no índice de proteólise primária, com diferença significativa ($p < 0,05$) do tempo de 24 e 48 horas de incubação. No inóculo 10^6 UFC/mL, a redução no índice de proteólise primária, quando comparada com as primeiras 24 horas ($p < 0,05$), aconteceu com 96 horas (Tabela 1).

Na proteólise primária, não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$, letras gregas) entre os inóculos testados (10^2 , 10^5 e 10^6 UF/mL) (Tabela 1) quando incubados na mesma temperatura nos diferentes tempos. Assim, tempos menores de estocagem a temperaturas mais baixas não foram efetivas no controle da proteólise primária quando o leite apresenta uma população mais elevada de *Pseudomonas* spp.

Assim, de maneira geral, os índices de proteólise primária observadas neste estudo, caracterizada pela solubilização da caseína por ação das proteases bacteriana, diminuíram somente após 96 horas de estocagem, mantendo-se relativamente estáveis ao longo das 72 horas, independentemente do inóculo inicial e da temperatura de armazenamento. Na proteólise primária, chamada de índice de extensão, grandes micelas de caseína são clivadas em peptídeos, solubilizando a caseína. Quanto maior a proteólise primária, mais peptídeos solúveis serão liberados da caseína, sendo para- κ - caseína e glicomacropéptidos os mais importantes (FOX; McSWEENEY, 1988). Ainda, a temperatura, dentro do mesmo tempo de estocagem, não teve efeito no índice de proteólise primária. Santos *et al.* (2009) avaliando o efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no crescimento de psicotrópicos em leite, encontraram dados, onde leite cru com alta contagem de bactérias psicotrópicas e psicotrópicas proteolíticas não possuem atividade proteolítica mais elevada em comparação com amostras de contagem baixa.

Conclusão

Somente o tempo de estocagem influenciou no índice de proteólise primária, com índices menores após 96 horas de estocagem. Desta forma independente da população inicial de *Pseudomonas* spp e a temperatura de estocagem, serão observados prejuízos à composição proteica do leite, favorecendo defeitos de sabor e redução no rendimento industrial.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela bolsa PIBITI.

Referências

ALMEIDA, K. M. *População de Pseudomonas spp. e P. fluorescens em leite cru refrigerado*. 2014. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) – Universidade Norte do Paraná. Londrina, 2014.

ARCURI, E.F. *et al.* Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotrópicas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciênc. Rural*, v.38, n.8, p.2250-2255, 2008.

CATANIO, S.F. *et al.* Refrigerated raw milk quality of a processing plant in the north of Parana after the implementation of changes imposed by NI 62 of 2011. *Semina Ciênc. Agrár.*, v. 33, p.3171-3180, 2012.

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.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. *Dairy chemistry and biochemistry*. Massachusetts: Kluwer, 1998.

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

MUIR, D.D. The fresh- life of dairy products: 1. factors influencing raw milk and fresh products. *Int. J. Dairy Technol.*, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

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

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. *Ciênc. Animal Bras.*, v.10, n.4, p.1237-1245, 2009

SILVA, L.C.C. *et al.* Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. *Semina Ciênc. Agrár.*, v.32, n.1, p.267-276, 2011.

STATSOFT, Inc. *STATISTICA 8.0 for Windows* [Data analysis software system]. Tulsa: Statsoft, 2008.

TEBALDI, V.M.R. *et al.* Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.28, n.3, p.753-760, 2008.

VIDAL-MARTINS, A.M.C. *et al.* Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.25, n.4, p.698-704, 2005.

YAMAZI, A.K. *et al.* Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. *Biosc. J.*, v.26, n.4, p.610-618, 2010.