

Ação Proteolítica de Bactérias Psicrotróficas nas Caseínas do Leite Bovino**Proteolytic Action of Psychrothrophic Bacteria in Bovine Milk Caseins**

DOI:10.34117/bjdv6n6-528

Recebimento dos originais:10/05/2020

Aceitação para publicação:23/06/2020

Patrícia Rodrigues Condé

Mestre Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG – Campus Rio Pomba, Técnica em Laboratório no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA) do IF Sudeste MG – Campus Rio Pomba

Endereço:Av. Dr. José Sebastião da Paixão, s/n, Bairro Lindo Vale, Rio Pomba, MG, Brasil. CEP: 36180-000

E-mail: patricia.conde@ifsudestemg.edu.br

Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Doutora em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Epamig Sudeste, Viçosa –MG

Endereço:Rua dos Estudantes, 120, apto 202, Centro, Viçosa, MG, Brasil. CEP: 36570-081

E-mail: cluciaop@gmail.com

Scarlet Ohana Gandra

Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo IF Sudeste MG – Campus Rio Pomba, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA)

Endereço:Av. Dr. José Sebastião da Paixão, s/n, Bairro Lindo Vale, Rio Pomba, MG, Brasil. CEP: 36180-000

E-mail: scarlet05jbgandra@gmail.com

Larissa Mattos Trevizano

Doutora em Bioquímica Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Professora do Departamento de Educação (DAE) no IF Sudeste MG – Campus Rio Pomba

Endereço: Av. Dr. José Sebastião da Paixão, s/n, Bairro Lindo Vale, Rio Pomba, MG, Brasil. CEP: 36180-000

E-mail: larissa.trevizano@ifsudestemg.edu.br

André Narvaes da Rocha Campos

Doutor em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Professor do Departamento Acadêmico de Agricultura e Ambiente (DAAA) no IF Sudeste MG – Campus Rio Pomba e Pró-Reitor de Pesquisa e Inovação

Endereço:Rua Luz Interior, 360, 5º andar, Santa Luzia, Juiz de Fora – MG, Brasil. CEP: 36.030-776

E-mail: andre.campos@ifsudestemg.edu.br

Roselir Ribeiro da Silva

Doutor em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Goiás (UFG). Professor no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA)

Endereço: Av. Dr. José Sebastião da Paixão, s/n, Bairro Lindo Vale, Rio Pomba, MG, Brasil. CEP: 36180-000

E-mail: roselir.silva@ifsudestemg.edu.br

Maurilio Lopes Martins

Doutor em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Professor do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA)

Endereço: Av. Dr. José Sebastião da Paixão, s/n, Bairro Lindo Vale, Rio Pomba, MG, Brasil. CEP: 36180-000

E-mail: maurilio.martins@ifsudestemg.edu.br

RESUMO

A refrigeração do leite cru propicia a multiplicação da microbiota psicrotrofica proteolítica contaminante, que é capaz de hidrolisar as caseínas, com consequentes problemas tecnológicos e econômicos para a indústria. Objetivou-se avaliar a ação proteolítica de bactérias psicrotólicas isoladas de leite cru refrigerado nas caseínas. Sete isolados Gram-negativos altamente proteolíticos foram selecionados e cada isolado, entre 6,0 e 7,0 Log UFC/mL, individualmente, foi inoculado em 100 mL de leite pasteurizado e incubado a 7,0 °C. Realizou-se contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios e contagem de bactérias psicrotólicas proteolíticas viáveis, com 0, 48 e 96 horas de estocagem. A estabilidade térmica das amostras de leite foi avaliada utilizando-se o teste do álcool, com graduação de 68 °GL a 80 °GL (v/v) e o perfil proteolítico das caseínas avaliado por SDS-PAGE. Durante a estocagem das amostras, houve aumento da contagem de bactérias psicrotólicas, exceto na amostra inoculada com *Burkholderia cepacia*, que se manteve constante. Observou-se maior instabilidade térmica nas amostras inoculadas com *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas luteola*, *Aeromonas hydrophila/caviae* e *B. cepacia* após 48 horas e, com 96 horas, todas as amostras apresentaram-se instáveis ao etanol 80 °GL. A técnica de SDS-PAGE evidenciou proteólise das caseínas com 48 horas de incubação, nas amostras inoculadas com *Pseudomonas fluorescens*. Após 96 horas, observou-se intensa hidrólise das caseínas do leite nas amostras inoculadas com *P. fluorescens*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* e *B. cepacia*. Menor grau de hidrólise foi observado nas amostras inoculadas com *P. luteola*, *A. junii/johnsonii*, e *A. hydrophila/caviae*. Conclui-se que as diferentes espécies de bactérias psicrotólicas hidrolisaram as caseínas do leite de forma mais ou menos intensa, e que quanto maior o tempo de armazenamento do mesmo sob refrigeração, maior é a presença de peptídeos provenientes da hidrólise. Portanto, a prevenção e controle da contaminação do leite são imprescindíveis para evitar a proteólise da caseína e consequentes perdas de qualidade e rendimento na produção de lácteos.

Palavras chaves: Proteínas do leite, estabilidade térmica, SDS-PAGE, proteólise.

ABSTRACT

The raw milk refrigeration allows the multiplication of contaminating proteolytic psychrotrophic microbiota, which is able to hydrolyze caseins, with consequent industry technological and economic problems. This study aimed to evaluate the proteolytic action of psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk on caseins. Seven highly proteolytic Gram-negative isolates were selected. Each isolate, between 6.0 and 7.0 Log CFU/mL, individually, was inoculated in 100 mL of pasteurized milk and incubated at 7.0 °C. Standard counts on plates of aerobic mesophilic microorganisms and viable proteolytic psychrotrophic bacteria with 0, 48 and 96 hours of storage were performed. Milk samples thermal stability was evaluated using the alcohol test, grading from 68 °GL to 80 °GL (v/v). The proteolytic profile in caseins was evaluated by SDS-PAGE. During the

samples storage, there was an increase in the count of psychrotrophic bacteria, except in the sample inoculated with *Burkholderia cepacia*, which remained constant. After 48 hours, greater thermal instability was observed in samples inoculated with *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas luteola*, *Aeromonas hydrophila/caviae* and *B. cepacia*. All samples were unstable to ethanol 80 °GL after 96 hours. SDS-PAGE evidenced casein proteolysis with 48 hours of incubation in samples inoculated with *Pseudomonas fluorescens*. After 96 hours, intense hydrolysis of milk caseins was observed in samples inoculated with *P. fluorescens*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* and *B. cepacia*. Less casein hydrolysis was observed in samples inoculated with *P. luteola*, *A. junii/johnsonii*, and *A. hydrophila/caviae*. It is concluded that the different species of psychrotrophic bacteria hydrolyzed the milk caseins in a more or less intensity. The longer the storage time of cooled milk, the greater the presence of peptides from hydrolysis. Therefore, the prevention and control of milk contamination are essential to avoid casein proteolysis and consequent dairy products quality and yield losses.

Key words: Milk proteins, thermal stability, SDS-PAGE, proteolysis.

1 INTRODUÇÃO

As caseínas e as soro-proteínas são as principais proteínas presentes no leite. A função biológica das caseínas na glândula mamária é o transporte de cálcio, fosfato e proteína para o recém-nascido (BRASIL et al., 2015). Elas representam cerca de 80,0% das proteínas totais do leite e são divididas em frações que apresentam proporções variadas (LIVNEY, 2010).

As caseínas são fosfoproteínas que contêm números variáveis de radicais fosfatos ligados a serina (P-ser), que estão em diferentes regiões das cadeias polipeptídicas (SGARBIERI, 2005). Essas proteínas são classificadas em quatro subgrupos de acordo com sua sequência de aminoácidos: α_{s1} , α_{s2} , β e κ -caseína e constituem o principal substrato das proteases produzidas por bactérias psicrotróficas. Elas são muito susceptíveis à hidrólise por possuírem forma helicoidal e por agregarem-se na forma de micelas. A superfície da micela é constituída, principalmente, por κ -caseína a qual recobre o seu interior, composto pelas demais subunidades (THOMAR; NOCOLAI, 2016).

A refrigeração do leite afeta o equilíbrio salino entre as micelas e a fase solúvel, com consequente aumento da concentração de cálcio, fósforo e β -caseína no soro, que corresponde à fração solúvel do leite, com discreto aumento do pH. Desta forma, ocorrem modificações nas propriedades tecnológicas, como aumento do tempo de coagulação na produção de queijos, modificação da consistência da coalhada e da sinérese (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989).

Deve-se considerar então, a importância da prevenção de contaminações microbianas na matéria-prima, considerando que o armazenamento do leite cru em tanques de granelização e a sua coleta a cada 48 horas aumentam as chances de multiplicação de microrganismos psicrotróficos produtores de proteases termoestáveis que hidrolisam as caseínas, principalmente a κ -caseína por

estar na periferia da micela, com consequente desestabilização do leite (NÖRNBERG; TONDO; BRANDELLI, 2009).

O uso da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) é uma das alternativas para a verificação do grau de hidrólise das caseínas e de outras proteínas (PINTO et al., 2014). Essa técnica é uma das principais ferramentas para a separação e caracterização de macromoléculas e, em condições desnaturantes (com uso de SDS – dodecil sulfato de sódio), confere carga negativa às proteínas que se deslocam sob efeito de um campo elétrico (TISELIUS, 1937; SILVA-JÚNIOR, 2001, OLIVEIRA et al., 2015). Essa metodologia deve ser utilizada para análise de proteínas do leite após a precipitação da caseína em pH 4,6 e separação das frações (VELOSO, 2001).

O teste do álcool é uma forma rápida de verificar a estabilidade térmica do leite a qual pode ser alterada em caso de degradação das caseínas por ação de proteases bacterianas. Essa análise, rotineiramente usada na indústria de laticínios, consiste em avaliar a estabilidade do leite frente a uma solução alcoólica capaz de coagular o mesmo. A agregação das micelas de caseína nas amostras de leite com baixa estabilidade térmica ocorre na presença de etanol devido à redução na constante dielétrica da solução que gera o colapso da κ -caseína e reduz a repulsão estérica das micelas (SILVA, 2004). Os tratamentos térmicos a que são submetidos muitos dos derivados lácteos são possíveis apenas em função da estabilidade das caseínas a altas temperaturas (FOX; MCSWEENEY, 1998).

Considerando a importância de metodologias que determinem a hidrólise das caseínas por bactérias proteolíticas, a fim de monitorar seus efeitos deletérios sobre os componentes do leite, objetivou-se avaliar a ação proteolítica de bactérias psicotróficas nessas proteínas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS PROTEOLÍTICAS

Sete isolados bacterianos, fortemente proteolíticos, oriundos de amostras de leite cru granelizado coletadas na região de Rio Pomba, MG foram avaliados. Estes foram identificados pelo sistema API 20 NE (bioMérieux®, França), como *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas luteola*, *Acinetobacter junii/johnsonii*, *Aeromonas hydrophila/caviae* e *Burkholderia cepacia*.

2.2 INOCULAÇÃO DAS BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS PROTEOLÍTICAS EM LEITE CRU E PREPARO DA AMOSTRA CONTROLE

Amostras de leite cru foram coletadas no Departamento de Zootecnia do Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Campus Rio Pomba, de animais ordenhados de acordo com as Boas

Práticas de Produção de Leite. Posteriormente, pasteurizou-se o leite a 65,0 °C, por 30 minutos, em banho-maria (Tecnal TE – 056 MAG, Piracicaba, São Paulo, Brasil) e, inoculou-se, separadamente, entre 6,0 e 7,0 Log UFC/mL de cada isolado proteolítico em 100 mL de leite pasteurizado, sendo as amostras incubadas a 7,0 °C. Cada amostra inoculada foi submetida à contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos aeróbios, em Ágar Padrão para Contagem (PCA - acumédia, Michigan, USA), com incubação, a 32,0 °C, por 48 horas (MORTON, 2001), imediatamente após a inoculação (tempo 0 hora). A contagem de bactérias psicrotróficas proteolíticas viáveis foi feita em Ágar Caseinato para Métodos Padronizados (SMCA - Himedia, Mimbai, Índia), com incubação a 7,0 °C, por 10 dias (MARCY; PAYTON PRUETT, 2001). A avaliação dessa contagem foi realizada com 0, 48 e 96 horas de estocagem das amostras de leite inoculado a 7,0 °C. As amostras do leite pasteurizado não inoculado, controle, foram submetidas às mesmas análises.

2.3 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DAS AMOSTRAS DE LEITE AO TESTE DO ÁLCOOL

Todas as amostras foram avaliadas quanto à estabilidade ao teste do álcool com variação de 68 °GL a 80 °GL (v/v), nos tempos 0, 48 e 96 horas de incubação a 7,0 °C (BRASIL, 2006).

2.4 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA APLICAÇÃO NOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA

O perfil proteolítico dos sete isolados nas caseínas do leite foi avaliado por SDS-PAGE com modificações do método de Laemmli (1970). As amostras do leite foram preparadas como descrito por Adams, Barach, Speck (1976), com adaptações. Alíquotas de 10 mL do leite refrigerado foram acidificadas para pH 4,0, com ácido clorídrico (Êxodo Científica, Sumaré, São Paulo, Brasil) 1,0 mol/L, sob agitação constante para precipitação da caseína. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, por 10 minutos, a 10.000 g, em centrífuga refrigerada (Thermo Scientific™, Heraeus™ Biofuge™ Stratos™, Alemanha). O soro foi eliminado e o volume original foi reconstituído com solução tampão Tris-HCl 100 mM, corrigindo-se o pH para 6,90. As amostras foram congeladas a -20,0 °C para utilização posterior.

2.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA DAS AMOSTRAS

As amostras foram diluídas em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 6,9, na proporção 1:100. As amostras diluídas foram quantificadas quanto à concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976).

2.6 SDS-PAGE

A hidrólise das caseínas por ação dos isolados psicrotróficos proteolíticos foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida segundo Laemmli (1970), com modificações. Empregou-se o sistema vertical de eletroforese (Loccus Biotecnologia, LCV 20x20, Cotia, São Paulo, Brasil).

Géis de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS - Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) em sistema descontínuo foram utilizados. Para a separação das proteínas, utilizou-se gel com 15,0% de acrilamida (Bio-Rad Laboratories, China) e, para o empilhamento, gel a 5,0%. Os géis foram polimerizados quimicamente, por meio da adição de tetrametilenodiamina (TEMED - Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e persulfato de amônio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). O tampão de corrida do catodo colocado entre as placas continha Tris-base (3,0 g/L - Bio-Rad Laboratories, China), glicina (14 g/L - Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e SDS (1,0%). O tampão do anodo, pH 8,6, era constituído de Tris-base (1,5 M). Alíquotas contendo 10 µg de proteína de cada amostra foram adicionadas de tampão de amostra (1:3 v/v) e submetidas à tratamento térmico, por imersão em banho de água fervente, por três minutos e, posteriormente, aplicadas no gel de poliacrilamida.

A eletroforese foi conduzida a 80 V, por 60 minutos, para empilhamento, e 100 V, por duas horas e trinta minutos, para separação das frações proteicas. Os géis foram fixados e corados, por duas horas, à temperatura ambiente, em solução de azul de Coomassie, composta por metanol (45,5% - Dinâmica[®] Química Contemporânea, São Paulo, Brasil), ácido acético (0,08% - Êxodo Científica, Hortolândia, Brasil), Coomassie (0,0015% - Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e água ultrapura (30,0%). Posteriormente, os géis foram revelados e transparentizados em solução contendo ácido acético (0,06%), metanol (0,05%) e água ultrapura (99,9%). A identificação das frações de caseína foi feita por comparação das amostras com padrões de α , β e κ -caseínas purificados de leite bovino (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e marcador de massa molecular (Jena Bioscience[®], Blue Eye Prestained Protein Marker 10-245 kDa, Alemanha).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONTAGEM BACTERIANA DAS AMOSTRAS

O leite pasteurizado não inoculado, controle, apresentou contagem de microrganismos mesófilos aeróbios de 1,48 Log UFC/mL (Tabela 1), estando, portanto, de acordo com o padrão da legislação (BRASIL, 2018), indicando que o tratamento térmico aplicado foi eficiente.

Para a contagem de microrganismos psicrotróficos, a amostra controle apresentou contagem menor que 1,0 Log UFC/mL no tempo zero e menor que 2,0 Log UFC/mL nos tempos 48 e 96 horas,

respectivamente (Tabela 1). Ainda não existe na legislação vigentes padrões para este grupo de microrganismos, porém, Pinto et al. (2006) e Martins et al. (2015) destacaram que é imprudente o processamento de derivados lácteos a partir de leite cru com contagem de microrganismos psicrotróficos superiores a 6,0 Log UFC/mL, devido ao comprometimento da integridade das proteínas e lipídeos e, conseqüente perda da qualidade e rendimento no processo produtivo.

Tabela 1. Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios e de psicrotróficos em amostras inoculadas de leite pasteurizado nos tempos 0, 48 e 96 horas após incubação a 7,0 °C e no leite pasteurizado não inoculado, controle

Tempo de incubação/amostra	Contagem (Log UFC/mL)			
	Mesófilos		Psicrotróficos proteolíticos	
	0 h	0 h	48 h	96 h
Leite pasteurizado não inoculado (controle)	1.5	< 1.0	< 2.0	< 2.0
<i>P. fluorescens</i>	-	7.3	7.9	8.5
Leite pasteurizado inoculado com				
bactérias				
<i>A. baumannii</i>	-	6.1	6.8	8.1
<i>S. maltophilia</i>	-	7.0	7.8	8.5
<i>P. luteola</i>	-	6.6	6.8	8.9
psicrotróficas				
proteolíticas				
<i>A. junonii/johnsonnii</i>	-	6.7	7.5	8.9
<i>A. hydrophila/caviae</i>	-	5.9	6.8	8.2
<i>B. cepacia</i>	-	6.3	6.6	6.6

(-): não determinado.

Nas amostras de leite pasteurizado inoculadas com bactérias psicrotróficas proteolíticas houve aumento da contagem ao longo do período de incubação, exceto na amostra inoculada com *B. cepacia*, em que a mesma se manteve constante ao longo do tempo (Tabela 1). Maiores valores de contagens de bactérias psicrotróficas proteolíticas foram constatadas com 96 horas de incubação a 7,0 °C, principalmente, quando *P. luteola* e *A. junonii/johnsonnii* foram inoculadas no leite pasteurizado (Tabela 1).

Na amostra de leite pasteurizado inoculada com *P. fluorescens*, constatou-se contagens na faixa de 7,3 a 8,5 Log UFC/mL (Tabela 1). Meng et al. (2017), ao avaliarem a multiplicação de *P. fluorescens* entre 2,0 a 10,0 °C, observaram aumento da atividade proteolítica ao longo do armazenamento. Os autores ressaltaram que proteases secretadas por *P. fluorescens* em leite cru armazenado a baixas temperaturas são estáveis ao tratamento térmico, o que explica seu potencial de deterioração.

Machado et al. (2013) verificaram que bactérias proteolíticas isoladas de leite cru com contagens de psicrotróficos entre 3,0 e 4,0 Log UFC/mL atingem o final da fase logarítmica após 48 horas, com produção de proteases e deterioração do leite.

3.2 ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS DE LEITE AO TESTE DO ÁLCOOL

A prova do álcool é utilizada como método rápido para estimar a estabilidade das proteínas do leite, considerando que simula o efeito do aquecimento ocasionado pelo processamento térmico (O'CONNELL et al., 2001). Entretanto, a pasteurização do leite aumenta a estabilidade ao etanol, principalmente, na faixa de pH entre 6,4 e 6,8, o que se justifica pela alteração no balanço iônico da estrutura micelar em função da redução do cálcio solúvel pela precipitação do fosfato de cálcio induzida pela temperatura (HORNE; PARKER, 1981).

As amostras de leite cru e de leite pasteurizado não inoculado, controle, foram estáveis a todas as graduações alcoólicas (Tabela 2), portanto estavam de acordo com o padrão recomendado por Brasil (2018), que preconiza ser a concentração mínima do álcool para avaliação de qualidade do leite cru refrigerado na propriedade rural e do leite pasteurizado, no mínimo, 72 °GL (v/v).

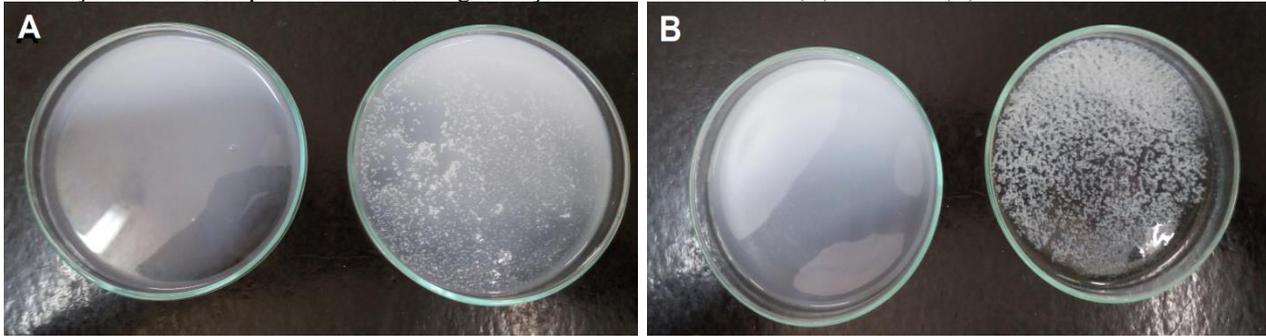
Tabela 2. Resistência ao teste do álcool das amostras de leite cru, pasteurizado não inoculado, controle, e pasteurizado inoculado com bactérias psicrotróficas ao longo do tempo de incubação.

Tempo de incubação (h)	Tempo 0 h								Tempo 48 h								Tempo 96 h							
	Graduação alcoólica (°GL)																							
	68	70	72	74	76	78	80	68	70	72	74	76	78	80	68	70	72	74	76	78	80			
Leite cru	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Leite pasteurizado não inoculado (controle)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Leite pasteurizado inoculado com bactérias psicrotróficas proteolíticas	<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+		
	<i>A. baumannii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+			
	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+			
	<i>P. luteola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+			
	<i>A. junonii/ johnsonii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+			
	<i>A. hydrophila/ caviae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+			
	<i>B. cepacia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+			

(-): negativo; (+): positivo.

Apesar da contagem de *P. fluorescens* na amostra inoculada estar acima de 7,0 Log UFC/mL, constatou-se instabilidade ao teste do álcool somente no tempo 96 horas de incubação e nas graduações alcólicas de 76 °GL, 78 °GL e 80 °GL (Tabela 2). A intensidade de precipitação das proteínas foi proporcional à graduação alcóolica utilizada (Figura 1).

Figura 1. Estabilidade ao teste do álcool avaliada no leite controle e inoculado com *P. fluorescens* com 96 horas de incubação a 7,0 °C, respectivamente, com graduação alcóolica de 78 °GL (A) e 80 °GL (B).



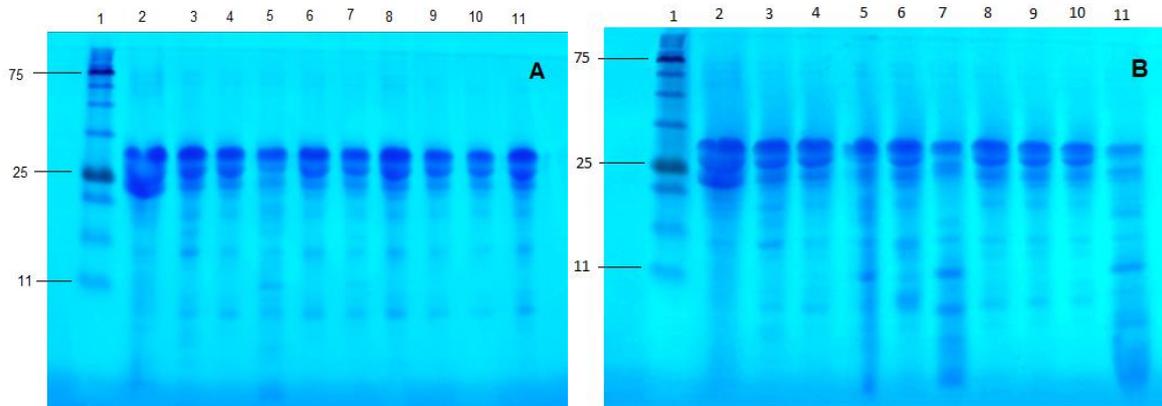
Maior Instabilidade proteica, avaliada pelo teste do álcool com maiores graduações, foi verificada nas amostras de leite pasteurizado inoculadas com *A. baumannii*, *S. maltophilia*, *P. luteola*, *A. hydrophila/caviae* e *B. cepacia* com 48 horas de incubação (Tabela 2). Verificou-se também que após 96 horas de incubação das amostras inoculadas, todas as espécies bacterianas induziram a instabilidade proteica do leite, destacando-se as *P. luteola* e *A. junni/johnsonii*, por terem ocasionado a instabilidade das amostras a partir da menor graduação alcóolica avaliada, 68 °GL (Tabela 2).

Embora seja rápido e prático, o teste do álcool possui limitações. Silva; Almeida (1998) citaram as principais variáveis que influenciam na estabilidade térmica do leite, realizada pelo teste do álcool: pH do leite, equilíbrio salino, enzimas proteolíticas, teor natural de ureia, estabilidade das micelas de caseína, período de lactação, alimentação deficiente do gado e saúde animal (mamite).

3.3 SDS-PAGE

Em condições iguais de multiplicação, os isolados bacterianos fortemente proteolíticos, apresentaram perfis diferentes de hidrólise das caseínas (Figura 2). Não foi observada hidrólise dessas proteínas nas amostras de leite pasteurizado não inoculado, controle, nos tempos 0, 48 e 96 horas de incubação a 7,0 °C (Figura 2A e 2B – Canaletas 3 e 4), o que demonstra a estabilidade proteica detectada no teste do álcool (Tabela 2), além da baixa contagem de microrganismos psicrotróficos (Tabela 1).

Figura 2. SDS-PAGE (15.0%) das caseínas provenientes de amostra do leite controle e de amostras de leite inoculadas, intencionalmente, e incubadas a 7,0 °C, por 48 horas (A) e 96 horas (B). Canaletas: 1- Marcador de massa molecular (kDa), 2- Padrões de α , β e κ -caseína, respectivamente, 3- Controle tempo zero, 4- Controle tempo 48 horas em (A) e Controle tempo 96 horas em (B), 5- *P. fluorescens*, 6- *A. baumannii*, 7- *S. maltophilia*, 8- *P. luteola*, 9- *A. junii/johnsonii*, 10- *A. hydrophila/caviae* e 11- *B. cepacia*.



Com apenas 48 horas de incubação, constatou-se degradação de frações proteicas por ação de *P. fluorescens* (Figura 2A – Canaleta 5). Entretanto, a instabilidade térmica dessa amostra frente ao teste do álcool ocorreu somente nas graduações alcoólicas 76 °GL, 78 °GL e 80 °GL no tempo 96 horas (Tabela 2).

Pinto et al. (2014) avaliaram a taxa de crescimento e a atividade proteolítica de estirpes de *P. fluorescens* isoladas de leite cru refrigerado, após incubação em diferentes temperaturas de refrigeração. Os autores constataram, por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), o alto potencial das estirpes em degradar a caseína durante o armazenamento do leite a 2,0; 4,0; 7,0 e 10,0 °C, temperaturas essas, recomendadas na legislação para conservação do leite cru. Os autores observaram que a hidrólise da caseína resultou na perda da estabilidade térmica do leite e na formação de fragmentos de baixa e média massa molecular. Observaram ainda que, mesmo a baixas temperaturas, como 2,0 °C houve degradação proteica e, em consequência, perda de estabilidade térmica.

Após 96 horas de incubação, observou-se hidrólise das frações proteicas de caseína por *P. fluorescens*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* e *B. cepacia* (Figura 2B – Canaletas 5, 6, 7 e 11). Menor hidrólise das caseínas foi observada nas amostras inoculadas com *P. luteola*, *A. junii/johnsonii* e *A. hydrophila/caviae* (Figura 2B – Canaletas 8, 9 e 10). Esses resultados são semelhantes aos de outros estudos em que também foi observada a capacidade de *P. fluorescens* em hidrolisar, de forma rápida, a κ -caseína (COSTA et al., 2002; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003; PINTO et al., 2014). Desta forma, pode-se afirmar que a estocagem do leite cru sobre refrigeração, antes do processamento, pode resultar na perda de qualidade da matéria-prima em consequência da atividade de enzimas

termoestáveis de bactérias psicrotróficas, com consequente comprometimento da qualidade dos produtos lácteos.

O potencial deteriorador de bactérias psicrotróficas é variável de acordo com o gênero e espécie bacteriana (PINTO et al., 2006). Constatou-se, na amostra inoculada com *B. cepacia*, maior degradação das caseínas no tempo 96 horas (Figura 2B – canaleta 11). Entretanto, a amostra de leite pasteurizado inoculada com essa bactéria apresentou menores valores de contagens de microrganismos psicrotróficos (Tabela 1) e instabilidade ao teste do álcool somente na graduação de 80 °GL nos tempos 48 e 96 horas (Tabela 2).

Os resultados observados podem estar relacionados à variação da síntese de proteases, que pode ser associada à heterogeneidade na expressão gênica ou à atividade enzimática das proteases bacterianas. Além disso, a variabilidade na regulação gênica pode ser dependente da temperatura (NICODÈME et al., 2005), ou seja, uma determinada temperatura pode ser ótima para síntese de proteases para uma espécie e um fator limitante para outra (BUCHON et al., 2000; BAUR et al., 2015; PINTO et al., 2015). Apesar da heterogeneidade na regulação e expressão gênica, a síntese máxima de enzimas extracelulares ocorre no final da fase log e na fase estacionária (MACHADO et al., 2016).

A especificidade de proteases produzidas por bactérias psicrotróficas Gram-positivas e Gram-negativas difere-se em relação às caseínas. Essas enzimas são inespecíficas quanto ao sítio de clivagem e, atuam, preferencialmente, sobre a k-caseína, localizada na superfície da micela (MATÉOS et al., 2015; GLÜCK et al., 2016; STUKNYTÈ et al., 2016). A inespecificidade dessas enzimas é uma das limitações das técnicas utilizadas para detecção de proteólise considerando que diferentes peptídeos são produzidos após a proteólise.

Matéos et al. (2015), ao avaliarem a sedimentação de leite UHT contaminado com *Pseudomonas* LBSA1, constataram redução do potencial zeta das micelas de caseína e aumento dos teores de nitrogênio não caseínico e não proteico. Além disso, verificaram que *Pseudomonas* LBSA1 produziu uma protease extracelular com atividade hidrolítica sobre as caseínas e não hidrolítica sobre as proteínas do soro. Tal enzima foi identificada como AprX, uma protease termoresistente da família da serralisina, com ampla atividade entre pH 6,0 a 10,0 e a 40,0 °C. Os peptídeos liberados foram purificados e determinados por espectrometria de massa em tandem. Segundo os autores, os locais de clivagem identificados não revelaram forte especificidade desta protease extracelular, porém, a presença de resíduos de aminoácidos básicos ou aromáticos na posição P1 teve influência positiva na clivagem, em comparação aos resíduos de aminoácidos ácidos ou prolina.

Stuknytè et al. (2016), ao estudarem a atividade proteolítica termoestável de *P. fluorescens* PS19 isolada de leite cru em sobrenadante livre de células, tratado termicamente, constataram uma protease termoestável de, aproximadamente, 45 kDa por meio da análise de zimograma. Os autores observaram que também se tratava de uma metaloprotease denominada AprX. Após concentração por ultrafiltração, outras duas bandas proteolíticas termoestáveis foram detectadas por zimograma, com massas moleculares de, aproximadamente, 15 e 25 kDa. A primeira resultou em um fragmento da protease AprX, porém, a protease de 25 kDa não era homóloga a qualquer proteína conhecida de *Pseudomonas* sp. Em seguida, os mesmos autores avaliaram sua atividade proteolítica sobre α_{s1} , β e k-caseína durante incubação *in vitro* nas temperaturas de 7,0 e 22,0 °C, através de espectrometria de massa em tandem com cromatografia líquida de ultra-performance. Os autores identificaram os peptídeos liberados (n=591), e alegaram que alguns deles resistiram à proteólise durante todo o período de incubação em ambas as temperaturas, e que poderiam ser considerados como indicadores da ação proteolítica de *P. fluorescens* PS19 nas caseínas do leite.

4 CONCLUSÕES

Por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, foi possível demonstrar o efeito deletério de enzimas produzidas por bactérias proteolíticas sobre as proteínas do leite, além de diferenciar o potencial deteriorante de diferentes espécies bacterianas psicrotróficas submetidas a temperaturas de refrigeração, recomendadas pelo Ministério da Agricultura para a conservação do leite.

A refrigeração de leite de baixa qualidade microbiológica implica prejuízos consideráveis à qualidade da matéria-prima e de seus derivados, além de prejuízos econômicos associados à degradação das caseínas por atividade de bactérias psicrotróficas, em especial, aquelas fortemente proteolíticas, a exemplo de *P. fluorescens*.

Os valores de contagem bacteriana, o teste do álcool e a análise de SDS-PAGE apresentaram resultados discrepantes. Porém, o teste do álcool pode ser utilizado de forma complementar às outras análises. A heterogeneidade observada na hidrólise das caseínas por SDS-PAGE pode ser explicada pela diversidade na expressão das proteases ou por modificações pós-traducionais das mesmas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gérias - FAPEMIG - Processo CAG - APQ-03644-14, ao Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, campus Rio Pomba e ao grupo PET Ciências Agrárias (Edital n.º 09/2010), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 823-827, 1976.
- BAUR, C.; KREWINKEL, M.; KUTZLI, I.; KRANZ, B.; NEUBECK, M.; WENNING, M.; SCHERER, S.; STOECKEL, M.; HINRICHS, J.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 23-29, 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRASIL, R. B.; NICOLAU, E. D.; CABRAL, J. F.; SILVA, A. P. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência animal**, v. 25, n. 2, p. 71-80, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa n.º 76, de 26 de Novembro de 2018. Resolve Art. 1º Ficam aprovados os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A, na forma desta Instrução Normativa e do Anexo Único, alterada pela Instrução Normativa n.º 76, de 03 de Maio de 2016. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 30 de Novembro de 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 14 de dezembro de 2006.
- BUCHON, L.; LAURENT, P.; GOUNOT, A. M.; GUESPIN-MICHEL, J. F. Temperature dependence of extracellular enzymes production by psychrotrophic and psychrophilic bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 19, p. 1577-1581, 2000.
- CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Bioquímica – Propriedades funcionales – valor nutricional – Modificaciones químicas. Traducido del original francés por el Dr. Francisco López Capont. Zaragoza – Espanha: Editorial ACRIBIA SA, 1989.
- CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v. 13, p.255-275, 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 Latino americanos de Nutrición, v. 52, p.1-13, 2002.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry.** 1.ed. London: Thomson Science, 1998.

GLÜCK, C.; RENTSCHLER, E.; KREWINKEL, M.; MERZ, M.; NEUBECK, M.; WENNING, M.; SCHERER, S.; STOECKEL, M.; HINRICHS, J.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Thermostability of peptidases secreted by microorganisms associated with raw milk. **International Dairy Journal**, v. 56, p. 186-197, 2016.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk: IV. Effect of concentration. **Journal of Dairy Research**, v. 48, p. 405-415, 1981.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-684, 1970.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interfaces Science**, v. 15, p. 73-83, 2010.

MACHADO, S. G.; HEYNDRIKX, M.; BLOCK, J.; DEVREE, B.; VANDENBERGHE, I.; VANETTI, M. C. D.; COILLE, E. V. Identification and characterization of a heat-resistant protease from *Serratia liquefaciens* isolated from Brazilian cold raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 222, p. 65-71, 2016.

MACHADO, S. G.; BAZZOLLI, D. M. S.; VANETTI, M. C. D. Development of a PCR method for detecting proteolytic psychrotrophic bacteria in raw milk. **International Dairy Journal**, v. 29, n. 1, p. 8-14, 2013.

MARCY, J. A.; PAYTON PRUETT, W. Jr. Proteolytic microorganisms. In: DOWNES, F. P., ITO, K., (Ed). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** 4th ed. Washington: American Public Health Association – APHA, Chapter 16, 2001. p. 183-183.

MARTINS, M. L.; PINTO, U. M.; RIEDEL, K.; VANETTI, M. C. D. Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 207-217, 2015.

MATÉOS, A.; GUYARD-NICODÈME, M.; BAGLINIÈRE, F.; JARDIN, J.; GAUCHERON, F.; DARY, A.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 78-88, 2015.

MENG, L.; ZHANG, Y.; LIU, H.; ZHAO, S.; WANG, J.; ZHENG, N. Characterization of *Pseudomonas* spp. and associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-7, 2017.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P., ITO, K., (Ed) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association – APHA, Chapter 7, 2001, p. 63-67.

NICODÈME, M.; GRILL, J. P.; HUMBERT, G.; GAILLARD, J. L. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 641-648, 2005.

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

O'CONNELL, J. E.; KELLY, A. L.; FOX, P. F.; KRUIF, K. G. Mechanism for the ethanol dependent heat-induced dissociation of casein micelles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4424-4428, 2001.

OLIVEIRA, E.; TRENTIN, T. C.; CAMARGO, F.; PINTO, Y. D. P.; MARTINS, B. Eletroforese: conceitos e aplicações. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 11, n. 22, p. 1129, 2015.

PINTO, C. L. O.; MACHADO, G. S.; CARDOSO, R. R.; ALVES, R. M.; VANETTI, M. C. D.; Proteolytic potential of *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated raw milk. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 4, n. 2, p. 16-25, 2014.

PINTO, C. L. O.; MACHADO, G. S.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Identificação de bactérias psicotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 105-116, Juiz de Fora, 2015.

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, p. 645-651, 2006.

SGARBIERI, V. C. Review: Structural and physicochemical properties of milk proteins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, p. 43-56, 2005.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 1. ed., 2004, Juiz de Fora: Templo.

SILVA, P. H. F.; ALMEIDA, M. C. F. Estabilidade térmica do leite. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v. 304, n. 53, p. 157-163, 1998.

SILVA-JÚNIOR, J. G. **Eletroforese de proteínas**: Guia teórico - prático. Rio de Janeiro: Interciência, 2001, 125 p.

STUKNYTÈ, M.; DECIMO, M.; COLZANI, M.; SILVETTI, T.; BRASCA, M.; CATTANEO, S.; ALDINI, G.; DE NONI, I. Extracellular thermostable proteolytic activity of the milk spoilage bacterium *Pseudomonas fluorescens* PS19 on bovine caseins. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 4188-4195, 2016.

THOMAR, P.; NICOLAI, T. Heat-induced gelation of casein micelles in aqueous suspensions at different pH. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 801-807, 2016.

TISELIUS, S. A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. **Transactions of the Faraday Society**, v. 33, p. 524-531, 1937.

VELOSO, A. C. A. Análise das caseínas de leite e queijos por HPLC/UV e por Ureia-PAGE. 2001. 126f. **Dissertação** (Mestrado em controle de qualidade), Universidade de Porto, Porto-Portugal, 2001.