

IDENTIFICAÇÃO DE ATIVIDADE DETERIORANTE E DO GENE *apr* NA MICROBIOTA ISOLADA DE LEITE CRU EM CAXIAS, MA

Identification of deteriorating activity and the *apr* gene in the microbiota isolated from raw milk in Caxias, MA

Lorena Gonçalves Araújo^{1*}, José Carlos Ribeiro Júnior², Bruno Kaik Alves¹,
Kellyane Karen Ferreira Aguiar Cesar¹, Joyce Bitencourt Athayde Lopes¹

RESUMO

Dentre as bactérias contaminantes, as psicrotróficas destacam-se como as principais responsáveis pela deterioração do leite, pois são capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração. O gene *apr* carrega a informação para a produção da metaloprotease alcalina, uma enzima termoresistente capaz de degradar as proteínas do leite. Objetivou-se investigar, por meio de métodos biomoleculares, a presença do gene *apr* e o potencial deteriorante de bactérias proteolíticas isoladas do leite cru em uma microrregião do Maranhão. Foram selecionadas 112 amostras de leite cru, coletadas de fevereiro a junho de 2018 em propriedades leiteiras das microrregiões de São João do Sóter e Caxias, MA. As análises microbiológicas foram realizadas no Instituto Federal do Maranhão (IFMA), Campus Caxias, e os ensaios biomoleculares no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Foram realizados testes para classificação de proteólise, lipólise e potencial acidificante em temperatura ótima (36 °C/2 dias) e atividade psicrotrófica (7 °C/10 dias). Foram achados 10 (9%) isolados positivos para o gene *apr*, todos pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, corroborando com outras pesquisas no estado que apontam para o grande potencial deteriorante das bactérias encontradas na localidade. Desta forma, assim como em outras regiões do Brasil, o leite cru refrigerado produzido no estado do Maranhão

-
- 1 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Campus Caxias, Rodovia MA-340, km 02, Gleba Buriti do Paraíso, Povoado Lamego, Zona Urbana, 65609-899, Caxias, MA, Brasil. E-mail: araujo.lorenabio@gmail.com
 - 2 Universidade Federal do Tocantins, Campus Araguaína, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Araguaína, TO, Brasil.
- * Autor para correspondência

Recebido / Received: 09/11/2018

Aprovado / Approved: 19/01/2020

precisa ser obtido de forma higiênica evitando contaminação com microrganismos deteriorantes que possam comprometer a integridade e a qualidade do leite fluido e derivados destinados ao comércio.

Palavras-chave: proteolítico; lipolítico; sacarolítico; psicrotrófico.

ABSTRACT

Among milk contaminating bacteria, psychrotrophic ones stand out as the main responsible for deterioration, because they can multiply in refrigeration temperatures. The *apr* gene carries the information to produce alkaline metalloprotease, a heat-resistant enzyme capable of degrading milk proteins. The objective of this work was to investigate, by biomolecular methods, the presence of the *apr* gene and the deteriorating potential of proteolytic bacteria isolated from raw milk in a Maranhão state microregion. A total of 112 raw milk samples were collected from February to June 2018, in dairy farms of São João do Sóter and Caxias, MA. Microbiological analyzes were performed at the Federal Institute of Maranhão (IFMA), Campus Caxias, and the biomolecular assays at the Laboratory of Inspection of Animal Products (LIPOA) in the State University of Londrina (UEL). Tests were performed to classify proteolysis, lipolysis and acidifier potential at the optimal temperature (36 °C/2 days) and psychrotrophic activity (7 °C/10 days). 10 (9%) positive isolates for the *apr* gene were found, all belonging to the genus *Pseudomonas*, corroborating other researches in the state that point to the great deteriorating potential of bacteria found in this locality. Thus, as in other regions of Brazil, refrigerated raw milk produced in the state of Maranhão needs to be obtained hygienically avoiding contamination with spoilage microorganisms that may compromise the integrity and quality of fluid milk and derivatives intended for trade.

Keywords: proteolytic; lipolytic, saccharolytic; psychrotrophic.

INTRODUÇÃO

A produção de leite tem um papel de destaque no agronegócio brasileiro. No país, o volume de leite adquirido pelos laticínios no primeiro trimestre de 2019 cresceu 2,8% em relação a igual período de 2018, segundo dados preliminares da Pesquisa Trimestral do Leite do IBGE (CARVALHO *et al.*, 2019). Atualmente o Brasil configura-se como o quarto maior produtor mundial de leite (SANTOS; CARVALHO, 2019).

No estado do Maranhão a produção de leite bovino cresceu a uma taxa de 5,62% ao ano entre 1974 e 2015 e exibiu comportamentos diferenciados ao longo das décadas

sob influência da conjuntura econômica e do mercado consumidor. O estado é o quarto maior produtor de leite bovino da região Nordeste e a atividade se configura como importante fonte de renda, principalmente, para agricultores familiares (BEZERRA *et al.*, 2017).

Há uma grande demanda pelo consumo de leite, isso está associado à sua rica composição de nutrientes, constituindo um excelente meio de cultura de multiplicação microbiana (MARQUES *et al.*, 2016). No entanto, as etapas de produção e comercialização fazem com que o leite esteja em constante contato com diversas superfícies desde a ordenha

até o consumo. Esse contato tem capacidade de influenciar a introdução, a viabilidade e o crescimento de microrganismos no leite (KABLE *et al.*, 2019).

Resultados de estudos anteriores sugerem que a microbiota do leite em tanques a granel com altas contagens bacterianas é dominada por espécies únicas, adaptadas ao frio, com altas taxas de crescimento a baixas temperaturas (HAHNE *et al.*, 2019). Desta forma, a microbiota é basicamente composta por microrganismos mesófilos que adentraram ao leite e desenvolveram capacidade de crescer diante da refrigeração (psicotróficos).

A microbiota mesófila não está sujeita somente a alterações no meio interno, mas podem desenvolver capacidade de continuar crescendo em uma ampla faixa de temperatura. Essa habilidade requer estratégias adaptativas específicas para manter a fluidez da membrana, a continuidade de suas atividades metabólicas e a síntese de proteínas a baixas temperaturas se tornando psicotrófica (HÉBRAUD; POTIER, 1999).

Os microrganismos psicotróficos contribuem para a deterioração do leite da seguinte forma: produzem enzimas proteolíticas (proteases), lipolíticas (lipases) que são excretadas no leite cru durante a estocagem antes do processamento (ZENI *et al.*, 2013). Boa parte destas enzimas são termoestáveis e atuam fora da célula microbiana, tornando as moléculas menores passíveis de alimentação (BELOTI, 2015). Assim, mesmo com a morte da bactéria por meio dos tratamentos de esterilização, as enzimas continuarão a deteriorar o leite.

Microrganismos deteriorantes são aqueles capazes de degradar constituintes dos alimentos com conseqüente alteração das suas características tornando-o impróprio para o consumo. São classificados de acordo com suas preferências nutricionais. Os principais são os sacarolíticos, proteolíticos e lipolíticos, no entanto, alguns geram maior preocupação,

por sua capacidade de adaptação e produção de enzimas termoestáveis (BELOTI, 2015).

As bactérias ácido lácticas (BAL) ou sacarolíticas promovem a acidificação do meio através da fermentação da lactose. Estas criam um meio inóspito para outros microrganismos e modificam as características sensoriais de produtos lácteos (SÁ *et al.*, 2017). Os microrganismos lipolíticos são os que conseguem sintetizar todos os nutrientes de que precisam, tendo como principal fonte de carbono e energia, os lipídeos. Estes destinam-se a degradação de gorduras, produzindo enzimas (lipases). A degradação de lipídeos produz sabor e aroma de ranço, gerando prejuízo para a produção (BELOTI, 2015). As enzimas proteolíticas (proteases) geram desestabilização nas micelas de proteína, e a estabilidade das proteínas do leite é um fator importante para garantir adequadas condições de processamento, aumentar o tempo de prateleira de derivados lácteos e proporcionar maior qualidade ao consumidor final (BRASIL *et al.*, 2015).

A deterioração do leite geralmente é causada pela presença de enzimas proteolíticas produzidas por espécies bacterianas; *Pseudomonas* spp se destaca por suas propriedades proteolíticas associadas a baixas temperaturas (MENG *et al.*, 2017). Entre as proteases bacterianas, um papel predominante na deterioração dos produtos lácteos parece ser desempenhado pela metaloprotease termoestável AprX (ANDREANI *et al.*, 2016).

A metaloprotease AprX é uma das enzimas produzidas, conhecidamente, por *Pseudomonas* spp., no entanto isolados de *S. ureilytica*, *E. kobei*, *Yersinia enterocolitica* e outros produzem potencialmente metaloprotease alcalina (AprX) (RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018). Apesar de ser frequentemente associado somente a *Pseudomonas*, em diferentes regiões do Brasil já foram isoladas bactérias proteolíticas do leite, sem a identificação da enzima proteolítica responsável por esta ação.

Pesquisas anteriores no estado do Maranhão demonstraram altas contagens bacterianas, baixa utilização de tecnologias e grupos de microrganismos com potencial deteriorante (SILVA *et al.*, 2012; LEMOS, 2016; LIMA, 2016; LINS NETO *et al.*, 2016). Diante desses estudos, vê-se a necessidade de investigar a presença do gene *apr* que caracteriza a enzima AprX, pois esta indicará se outras espécies bacterianas da microbiota do leite na região, além das já conhecidas, apresentam o gene *apr* em sua herança genética. Assim, objetivamos identificar a atividade deteriorante e o gene *apr* em isolados de leite cru, adquirido em propriedades leiteiras na microrregião de Caxias, MA.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do estudo foram selecionadas quatro propriedades leiteiras da microrregião de Caxias, MA, sendo uma no município de Caxias e três no município de São João do Sóter, que participaram do programa Balde Cheio (EMBRAPA, 2019) e por serem as propriedades leiteiras com produção mais significativa. Foram coletados 500 mL de leite de cada propriedade, logo após a ordenha, em duas coletas distintas com 60 dias de intervalo entre uma e outra, em um total de oito amostras sendo duas amostras por propriedade. As amostras foram retiradas dos tanques com auxílio de concha esterilizada e acondicionadas em frascos esterilizados. Em seguida foram transportadas em caixa isotérmica contendo gelo, ao Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – IFMA, Campus Caxias, MA.

Para verificar a atividade deteriorante das bactérias presentes no leite, primeiro realizou-se a contagem bacteriana total ou contagem de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis no leite, realizada pelo método de semeadura

em superfície em ágar padrão para contagem (*Plate Count Ágar* – PCA), com incubação à 36 °C, por 48 horas (DOWNES; ITO, 2001). Selecionaram-se 112 isolados para avaliação.

Os testes para avaliação da capacidade deteriorante dos isolados bacterianos, foram realizados no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Previamente, procedeu-se a reativação dos isolados bacterianos em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*), a 35 °C, por 48 horas. Após, procedeu-se a semeadura dos isolados, com auxílio de alça de platina, em placas contendo PCA, e incubação a 35 °C, por 48 horas.

Após, foi selecionada, aleatoriamente, uma colônia de cada isolado para replicação em ágar leite (Acumedia, Baltimore, USA), suplementado (9:1) com solução de leite em pó desnatado reconstituído (10%) e incubadas, a 36 °C, por 48 horas para confirmação da atividade proteolítica (BEERENS; LUQUET, 1990). As cepas foram consideradas positivas para proteólise, pela formação de halos translúcidos em torno das colônias, no meio específico.

A análise da atividade lipolítica foi feita de acordo com o método de Hantsis-Zacharov; Halpern (2007). Amostras foram selecionadas em Ágar PCA e repicadas em meio enriquecido com tributirina (Himedia, Mumbai, Índia). Foram consideradas as colônias que apresentaram formação de halos translúcidos ao redor da mesma em ágar tributirina. As avaliações foram feitas após incubação das amostras à 36 °C, por 48 horas e a 7 °C, por 10 dias, para verificar sua capacidade de degradar lipídios sob refrigeração.

Para o teste atividade de degradação da lactose os isolados foram inoculados em PCA suplementado com extrato de carne, cloreto de sódio, peptona, lactose e solução púrpura de bromocresol (COSTA *et al.*, 2009). Este meio possui coloração roxa escura e, com a

produção de ácido láctico, ocorre a mudança de cor amarelada, modificação indicativa capacidade do microrganismo hidrolisar a lactose. Este teste foi submetido às condições dos testes de lipólise e de proteólise, ou seja, incubação a 36 °C, por 48 horas e, 7 °C, por 10 dias.

De acordo com o crescimento em PCA as amostras foram inoculadas em meio específico para cada teste e incubadas a 6 °C e 35 °C, por 10 dias (DOWNES; ITO, 2001).

A extração do DNA bacteriano foi realizada no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da UEL, PR, a partir de colônias que apresentaram atividade deteriorante a 6 °C e a 35 °C. Foi utilizada a técnica da fervura de acordo com Ribeiro Júnior *et al.* (2016), que consiste em suspender 1 mL do caldo de cultura em tubo de centrifugação descartável de 2 mL livre de DNase e RNase, pirogênico e centrifugados a 14.500 rpm, por 5 min. a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 200 µL de TE (Tris-HCl 10 mM: EDTA 1mM) ao pellet, seguido de agitação em vórtex. Feito isso, os tubos foram incubados em banho de ebulição onde permaneceram por 15 min. Após esse tempo, foram imediatamente imersos em banho de gelo pelo mesmo período, e levados novamente a centrifuga a 14.000 rpm por 5min a 4 °C. Então, o sobrenadante foi recolhido na quantidade de 100 µL e transferido para um microtubo estéril, livre de DNase e RNase, e estocado a -20 °C para posterior identificação do gene.

A partir da extração do DNA bacteriano das cepas estudadas, foi realizada a técnica de PCR para detectar a região específica do gene da protease alcalina (*apr*) que é responsável pela produção da AprX por *Pseudomonas* spp e outras bactérias proteolíticas. Foram utilizados os primers FP *apr* I (TAYGGBTTCAAYTCCAAYAC) e RF *apr* II (VGCGATSGAMACRTRCC), de acordo com o protocolo descrito por Bach *et al.* (2001). Para a amplificação as reações

foram: 12,5 µL de Go Taq Green Master Mix 2× (Promega), 1 µL de DNA (~ 50-100 ng/µL), 10 pmol de cada iniciador, e água ultra-pura (Promega) para levar o volume final a 25 µL. Para a reação em termociclador as condições foram 1 ciclo de 95 °C durante 5 min, 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 53 °C durante 30 s, e 72 °C durante 20 s, e uma etapa de extensão final a 72 °C durante 10 min. Após a PCR os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) em EDIS de Tris-borato 0,5×, corada em banho GelRed (Biotium), e visualizado utilizando um transiluminador LPIX (Locus). Foram considerados produtos de 194 pb.

Os isolados com confirmação para o gene *apr* foram submetidos a PCR para amplificação da região do gene 16S rRNA do gênero *Pseudomonas*. O protocolo utilizado foi de acordo com Scatamburlo *et al.* (2015). Foram usados os primers PA-GS-F (GACGGGTGAGTAATGCCTA) e PA-GS-R (CACTGGTGTTCCTTCCTATA). A reação consistiu em: 12,5 µL de Go Taq Green Master Mix 2× (Promega), 1 µL de DNA (~ 50-100 ng/µL), 10 pmol de cada iniciador, e água ultra-pura (Promega) para levar o volume final a 25 µL. Para amplificação as condições foram: 1 ciclo de 95 °C por 2 min, 25 ciclos de 94 °C por 20 s, 54 °C por 20 s, e 72 °C por 40 s, ao final, 72 °C por 1 min. Após a PCR os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) em EDIS de Tris-borato 0,5×, corada em banho GelRed (Biotium), e visualizado utilizando um transiluminador LPIX (Locus). Foram considerados produtos de 618 pb.

Os dados levantados no presente trabalho foram inseridos em planilha eletrônica (Microsoft Excel® versão 2013) e submetidos ao teste Qui-Quadrado para avaliar a associação entre duas variáveis categóricas. As análises estatísticas foram realizadas no ambiente estatístico R 3.2.2 (R Development Core Team, 2012), considerando intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 112 isolados bacterianos os quais foram avaliados quanto às suas atividades de degradação de proteínas, lipídios e de lactose, a 35 °C (mesófilos) e a 7 °C (psicrotróficos). Um percentual de 91% dos isolados apresentaram atividades proteolítica, lipolítica e sacarolítica a 35 °C, enquanto a 7 °C, 50% dos isolados apresentaram as atividades. Quando observada a razão entre as quantidades, pôde-se inferir que 41% das bactérias deteriorantes do leite eram somente mesófilas e não se adaptaram a temperatura de refrigeração. Acredita-se que a redução esteja relacionada a refrigeração do leite que é um determinante na redução a multiplicação dos microrganismos aeróbios mesófilos, principais responsáveis pela acidificação e instabilidade do leite cru (SILVA *et al.*, 2016).

Diante disto, é possível inferir que existe uma associação entre a diminuição na atividade deteriorante a medida em que se aumenta a refrigeração. O teste Qui-Quadrado corroborou com a hipótese, demonstrando que a atividade deteriorante, sacarolítica ($X\text{-squared} = 33,152$, $df=1$ $p\text{-value} < 0,05$), proteolítica ($X\text{-squared} = 24,096$, $df = 1$, $p\text{-value} < 0,05$) e lipolítica ($X\text{-squared} = 54,035$, $df = 1$, $p\text{-value} < 0,05$) foram predominante a 35 °C. No entanto, mesmo com a diminuição da atividade, a refrigeração à 7 °C não foi o suficiente para impedir o crescimento de todos os microrganismos, bem como a atividade enzimática dos mesmos.

À 35 °C apenas 2 (1,9%) apresentaram capacidade de metabolizar unicamente proteínas, 9 (8,8%) apresentaram capacidade de produzir exclusivamente enzimas que degradam lipídeos e 8 (7,8%) capacidade restrita a degradação da lactose. No entanto, há grande diferença quando são considerados os grupos de maneira simultânea, podendo ser observado no diagrama de Venn (Figura 1).

Ao avaliar os isolados a 7 °C quanto a sua capacidade deteriorante, 57 (50%) demonstraram atividade à baixa temperatura. Das atividades sem associações obteve-se respectivamente, 15 lipolíticas (27%), 13 (23%) proteolíticas e 12 (21%) sacarolíticas. Houve redução da quantidade de relações simultâneas (Figura 2), comparado com a deterioração a 35 °C. Não houve casos de três atividades enzimáticas concomitantemente. Acredita-se que este comportamento esteja ligado a influência da refrigeração, outra possibilidade é que como poucos microrganismos multiplicam-se a baixas temperaturas, não há tanta necessidade de competir por alimento e, conseqüentemente, desenvolver outros metabólitos (BELOTI, 2015).

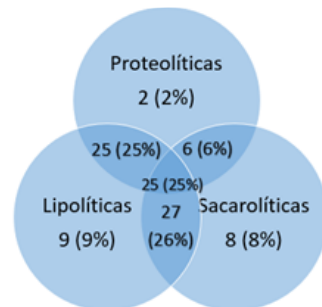


Figura 1 – Associações de atividades proteolítica, lipolíticas e sacarolítica entre os isolados, isoladas de leite cru, a 35 °C

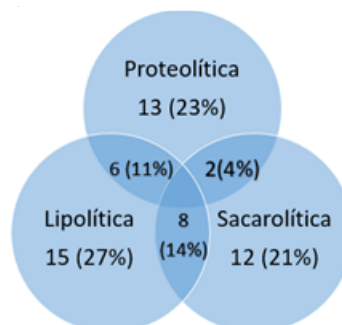


Figura 2 – Associações de atividades proteolítica, lipolíticas e sacarolíticas entre os isolados bacterianos, isoladas de leite cru a 7 °C

Diante dos resultados observados a 35 °C, 27 (26,5%) dos isolados apresentaram comportamento lipolítico e sacarolítico, concomitantemente, 25 (24,5%) demonstraram atividade proteolítica (P), lipolítica (L) e sacarolítica (S) simultaneamente, 25 (24,5%) apresentaram capacidade lipolítica e proteolíticas, e 6 (5,9%) dos isolados apresentaram atividades proteolítica e sacarolítica. Além disso, 10 (9%) exemplares não apresentaram nenhuma das atividades citadas acima.

Considerando a manifestação metabólica isolada e simultânea, observou-se que: 85 (83%) dos isolados apresentaram capacidade de degradar lipídeos, 65 (64%) dos isolados apresentaram capacidade de degradar lactose e 57 (55%) dos apresentaram capacidade de degradar proteína.

Ao avaliar a capacidade simultânea de deterioração, a 7 °C, 8 (14%) dos isolados foram lipolíticos e sacarolíticos, 6 (11%) lipolíticas e proteolíticas, e 2 (4%) proteolíticas e sacarolíticas. Sendo que, 55 (50%) dos isolados não apresentaram atividades deteriorantes nesta temperatura. Considerando a atividade metabólica isolada e simultânea dos isolados bacterianos deteriorantes, ao final obteve-se 29 (50%) cepas lipolíticas, 22 (39%) sacarolíticas e 21 proteolíticas (37%).

Parte das cepas demonstraram eficácia na degradação de proteínas (35 °C e a 7 °C). Esta degradação e conseqüentemente desestabilização de leite UHT (Ultra High Temperature) durante a sua vida de prateleira é promovida, principalmente, pela atividade proteolítica residual atribuída principalmente as proteases produzidas por bactérias psicotróficas e proteases nativas (ZHANG *et al.*, 2018). Segundo Beloti (2015) os psicotróficos são, quase que na sua totalidade, aeróbios mesófilos que tem capacidade de se desenvolver em temperaturas de refrigeração, ativando metabolismos

alternativos. Estes só têm seu crescimento contido em temperaturas abaixo de 2 °C. Sua influência está diretamente ligada a vida útil do leite e desperta preocupação da indústria.

Autores apontam os microrganismos psicotróficos como responsáveis pela deterioração do leite mesmo após os tratamentos térmicos mais utilizados em laticínios, como a pasteurização e o tratamento UHT. Estes por sua vez são potenciais produtores de enzimas proteolíticas e lipolíticas, caracterizadas usualmente por serem termoresistentes (BAGLINIÈRE *et al.*, 2012; VITHANAGE *et al.*, 2014; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2018; YUAN *et al.*, 2018). Assim, a presença dessas enzimas tem sido apontada como fator limitante para a vida útil do leite UHT, além de causar modificações indesejáveis em derivados lácteos (PINTO *et al.*, 2015).

Além de causar prejuízos econômicos alguns autores sugerem a ideia de que a contagem elevada de bactérias psicotróficas no leite cru é realidade, e apresentam diversos problemas para a indústria de laticínios, podendo causar danos à saúde humana (YAMAZI, 2012; LIMA, 2016; PEREIRA, 2017).

Os isolados bacterianos lipolíticos geram grandes preocupações para produtores e industriais. Atividade residual destas enzimas extracelulares após tratamento térmico elevado pode levar a problemas tecnológicos, sabores desagradáveis e instabilidade físico-química, influenciando na vida útil do leite e produtos lácteos (MACHADO *et al.*, 2017). Em um estudo realizado por Lima Neto (2018) foi feita a classificação da atividade enzimática proteolítica e lipolítica em leite cru captado em laticínios no município de Piumhi, MG. A pesquisa demonstrou que o perfil enzimático das amostras teve baixa incidência de microrganismos com capacidade lipolítica e uma incidência maior de microrganismos com capacidade proteolítica a 37 °C. Não

houve lipólise e foi observada uma incidência de proteólise insignificante a 7 °C.

Diferente do estudo anterior, nas duas avaliações de temperatura do presente estudo, obtivemos destaque para atividade lipolítica. Isso pode se dar em razão de diversos fatores, como: temperatura do ambiente, manejo, refrigeração inadequada e outros. Segundo Spina *et al.* (2010) estes processos degradativos são mais acentuados em temperaturas de resfriamento marginal e, um fator que necessita bastante atenção é o emprego incorreto da refrigeração do leite, principalmente, em um país como o Brasil, onde as temperaturas médias ao longo do ano ficam acima de 25 °C na maioria das regiões. A Instrução Normativa nº 76 (BRASIL, 2018) preconiza que o leite deve ser refrigerado a 4 °C, porém quando esta temperatura oscila entre 5 °C e 10 °C, caracterizando resfriamento marginal, cria-se um ambiente muito favorável à multiplicação de uma microbiota com características mistas (psicotróficas/mesófilas).

Em relação a alta atividade sacarolítica, observa-se que este grupo pode ter se mostrado elevado em razão de serem aeróbios mesófilos. Portanto, além das condições propícias, boa parte dos microrganismos mesófilos tem metabolismo sacarolítico, os carboidratos abundam na natureza e seu metabolismo geram maiores quantidades de energia, o que explica o considerável aparecimento a 7 °C (BELOTI, 2015).

A grande preocupação está relacionada à hidrólise da lactose por enzimas sacarolíticas que levam à formação de ácido láctico. O sabor ácido do leite fermentado deve-se ao ácido láctico produzido por bactérias do gênero *Lactobacillus*. A redução do pH associado a produção de ácido láctico provoca a coagulação das proteínas do leite. Em caso de acidez elevada, o leite torna-se impróprio para consumo, indicando alta atividade microbiana (NASCIMENTO, 2014; MAGRI, 2015).

Em um estudo sobre biodiversidade da microbiota de leite cru refrigerado e seu potencial de deterioração, Neubeck e colaboradores (2015) compararam o potencial enzimático em três temperaturas: 30 °C, 15 °C e 6 °C. A maioria das amostras mostrou quase nenhuma diferença entre 30 °C e 15 °C, mas a 6 °C, as contagens de placas foram até três unidades log menores, em concordância com os resultados deste estudo.

O experimento de avaliação do gene demonstrou que 10 das 112 amostras, aproximadamente 9% dos isolados, apresentaram o gene *apr*. Após isso, por meio da amplificação do gene 16S rRNA também se confirmou que as bactérias que se apresentaram positivas para o gene, também foram positivas para *Pseudomonas* spp. Este resultado corrobora com outros estudos.

Em uma pesquisa sobre *Pseudomonas* spp. em leite cru e suas propriedades proteolíticas associadas a baixas temperaturas, um total de 143 isolados de 87 amostras foram confirmados como *Pseudomonas*, e foram identificados como pertencentes a 14 espécies de *Pseudomonas*. O potencial de deterioração variou de acordo com as temperaturas testadas (MENG *et al.*, 2017).

Em uma pesquisa de Teider Júnior e colaboradores (2018), buscou-se identificar a microbiota psicotrófica deteriorante em leite cru refrigerado. Foram apontadas como as principais bactérias entre proteolíticas: *Lactococcus lactis*, *Enterobacter kobei*, *Serratia ureilytica*, *Aerococcus urinaeequi* e *Bacillus licheniformis*. Entre os lipolíticos observaram-se *E. kobei*, *L. lactis*, *A. urinaeequi* e *Acinetobacter lwoffii*; *S. ureilytica*. As que mais produziram metaloprotease alcalina (AprX) foram *E. kobei*, *Pseudomonas* spp. e *Yersinia enterocolitica*.

No estudo de D'Incecco *et al.* (2019) cepas de *Pseudomonas fluorescens*, *P. poae* e *Chryseobacterium joostei*, foram selecionadas entre cepas positivas para AprX

do leite cru e foram avaliadas a gelificação e formação de caseinomacropéptídeos. Os caseinomacropéptídeos foram sucessivamente degradados, especialmente no leite armazenado em temperatura mais elevada, devido à proteólise extensa; um sedimento abundante foi desenvolvido em vez de um gel. Os caseinomacropéptídeos podem ser apresentados como um indicador precoce da gelificação do leite UHT.

Ao comparar a desestabilização das proteínas do leite entre a protease AprX de *P. fluorescens* e plasmina, Zhang e colaboradores (2018) concluíram que a forte gelificação induzida pelo AprX no leite UHT é causada principalmente pela hidrólise da κ -caseína, enquanto a gelificação induzida pela plasmina no leite UHT é causada principalmente pela hidrólise da β e α -caseína; AprX pode, assim, induzir a gelificação a um grau de hidrólise mais baixo que a plasmina.

Desta forma, é visto que as proteases bacterianas possuem grande influência sobre a vida útil do leite. A prevenção da multiplicação destes microrganismos que muitas vezes são psicrotróficos no leite é tecnicamente possível, mas é difícil alcançar na prática, porque geralmente erros humanos resultam em contaminação (COUSIN, 1982).

Os principais pontos de contaminação do leite com bactérias psicrotróficas são a água residual dos latões, superfície dos latões, tanques de expansão e os tetos higienizados inadequadamente. Entretanto, a contaminação do leite com mesófilos e psicrotróficos não depende do sistema de produção ou do tipo de ordenha utilizado nas propriedades, mas sim, das boas práticas aplicadas em todo o processo de produção leiteira (YAMAZI *et al.*, 2010).

CONCLUSÃO

As bactérias isoladas do leite no presente estudo apresentaram significativa atividade deteriorante do leite. O gene *apr* foi

confirmado em parte dos isolados, confirmando o gênero *Pseudomonas*, porém, em quantidade inferior à atividade deteriorante demonstrada à princípio. Mais estudos são necessários para a descoberta de novas espécies que possam ter o gene, assim como qual outro possível gene pode ser responsável pela deterioração em temperatura de refrigeração dos isolados que não possuíam o gene *apr*.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão – FAPEMA.

REFERÊNCIAS

ANDREANI, N. A. *et al.* Characterization of the thermostable protease AprX in strains of *Pseudomonas fluorescens* and impact on the shelf-life of dairy products: Preliminary results. **Italian Journal of Food Safety**, v. 5, n. 6175, p. 239-244, 2016.

BACH, J. H. *et al.* PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soli. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 173-182, 2001.

BAGLINIÈRE, F. *et al.* Quantitative and qualitative variability of the caseinolytic potential of different strains of *Pseudomonas fluorescens*: Implications for the stability of casein micelles of UHT milks during their storage. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2593-2603, 2012.

BEERENS, H., LUQUET, F.M. **Guía práctico para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos**. Zaragoza: Editorial Acríbia. 1990. 141 p.

BELOTI, V. **Leite: Obtenção, inspeção e**

- qualidade.** Londrina: Editora Planta, 2015.
- BEZERRA, A. S. *et al.* Comportamento da produção e dos preços de leite bovino no estado do Maranhão. **Nucleus Animalium**, v. 9, n. 1, p. 97-108, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. 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. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 230, p. 9, 30 nov. 2018.
- BRASIL, R. B. *et al.* Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**, v. 25, n. 2, p. 71-80, 2015.
- CARVALHO *et al.* **Nota de conjuntura: Leite e derivados - Maio de 2019.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, maio. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1109189/nota-de-conjuntura-leite-e-derivados---maio-de-2019>
- COSTA, W. A.; VANETTI, M. C. D.; PUSCHAMANN, R. Biocontrole de *Listeria monocytogenes* por *Pediococcus acidilactici* em couve minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 785-792, 2009.
- COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.
- D'INCECCO, P. *et al.* Bacterial proteolysis of casein leading to UHT milk gelation: An applicative study. **Food Chemistry**, v. 292, p. 217-226, 2019.
- DOWNES, F. P.; ITO, K. (ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4th ed. Washington: American Public Health Association – APHA, 2001.
- EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Balde Cheio.** 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/balde-cheio>
- HAHNE, J. *et al.* The contribution of fast growing, psychrotrophic microorganisms on biodiversity of refrigerated raw cow's milk with high bacterial counts and their food spoilage potential. **Food Microbiology**, v. 79, p. 11-19, 2019.
- HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7162-7168, 2007.
- HÉBRAUD, M.; POTIER, P. Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 211-219, 1999.
- KABLE, M. E. *et al.* Viable and total bacterial populations undergo equipment-and time-dependent shifts during milk processing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 13, p. e00270-19, 2019.
- LEMOS, K. L. **Caracterização dos principais micro-organismos deteriorantes e perfil genético de bactérias aeróbicas formadoras de esporos isoladas de leite cru bovino produzido no estado do Maranhão – Brasil.** 2016. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

- LIMA, J. B. A. **Caracterização genética de bactérias proteolíticas e lipolíticas autóctones do leite cru no Maranhão-Brasil**. 2016. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.
- LIMA NETO E. C. **Quantificação de microorganismos e classificação de sua atividade enzimática proteolítica e lipolítica em leite cru captado em laticínios no município de Piumhi- MG**. 2018. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro Universitário de Formiga, Formiga, 2018.
- LINS NETO, O. T. A. *et al.* Qualidade do leite in natura produzido e comercializado no município de Timon no estado do Maranhão. **Nucleus**, v. 13, n. 2, p. 41A-47A, 2016.
- MACHADO, S. G. *et al.* The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 302, 2017.
- MAGRI, L. P. **Quantificação de acidez titulável e pH utilizando técnica potenciométrica como indicador de qualidade do leite bovino**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia em Leite e Derivados) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.
- MARQUES, A. V. L. *et al.* Investigação da qualidade microbiológica de amostras de leite cru produzidos na fazenda experimental do instituto de ciências agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 3, p. 91-91, 2016.
- MENG, L. *et al.* Characterization of *Pseudomonas* spp. and associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2158, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02158
- NASCIMENTO, E. R. **Avaliação do teor de gordura e acidez em leite UHT desnatado comercializado em Campina Grande - PB**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Industrial) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.
- NEUBECK, M. V. *et al.* Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 57-65, 2015.
- PEREIRA, N. S. **Determinação da presença de bactérias psicrótróficas no leite cru produzido em região do interior do Rio Grande do Sul e sua correlação com o índice de acidez**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Centro Universitário Univates, Lajeado, 2017.
- PINTO, C. L. O. *et al.* Identificação de bactérias psicrótróficas 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. 2015.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012. Disponível em: <http://www.rproject.org>
- RIBEIRO JÚNIOR, J. C. *et al.* Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3069-3078, 2016.

- RIBEIRO JÚNIOR, J. C. *et al.* The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 75-83, 2018.
- SÁ, S. A. C. A. *et al.* Avaliação das condições de aeração do pré-inóculo utilizado no cultivo de bactérias ácido lácticas (BAL) em meio líquido. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 6, p. 0841-0845, 2017.
- SANTOS, G. B.; CARVALHO, G. R. Autocorrelação espacial e clusters na produção brasileira de leite. *In*: WORKSHOP DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA GADO DE LEITE, 23., 2019, Juiz de Fora. **Anais [...]**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2019.
- SCATAMBURLO, T. M. *et al.* Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 759-764, 2015.
- SILVA, F. G. *et al.* Microbiota psicotrófica deteriorante proteolítica e lipolítica do leite cru da região de Castro-PR. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, p. 63-65, 2016.
- SILVA, Z. F. *et al.* Características do sistema de produção de leite da Microrregião de Imperatriz, no Estado do Maranhão. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 55, n. 2, p. 92-97, 2012.
- SPINA, T. L. B. *et al.* A microbiota láctea: Importância na cadeia laticínista x deterioração. **Pubvet**, v. 4, p. Art. 865-871, 2010.
- TEIDER JÚNIOR, P. *et al.* *Pseudomonas* spp. and other psychrotrophic microorganisms in formal and informal Brazilian Minas Frescal cheese: Proteolytic, lipolytic and AprX production potential. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 3, p. 1- 30. 2018.
- VITHANAGE, N. R. *et al.* Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 189, p. 26-38, 2014.
- YAMAZI, A. K. **Caracterização da atividade e do potencial proteolítico de *Pseudomonas* spp. isolados de leite de cabra**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.
- YAMAZI, A. K. *et al.* Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 4, 2010.
- YUAN, L. *et al.* Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of their enzymes. **Journal of Zhejiang University-Science B**, v. 19, n. 8, p. 630-642, 2018.
- ZENI, M. P. *et al.* Influência dos microrganismos psicotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc & Ciência ACET**, v. 4, n. 1, p. 61-70, 2013.
- ZHANG, C. *et al.* Destabilization of UHT milk by protease AprX from *Pseudomonas fluorescens* and plasmin. **Food Chemistry**, v. 263, p. 127-134, 2018.