



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

**Incidência e avaliação da atividade lipolítica e proteolítica de
Bacillus cereus em leite UHT**

Maike Taís Maziero^{1*}, Cibeli Viana², Roberto Montanhini Neto³, José Paes de Almeida Nogueira Pinto⁴ e Luciano dos Santos Bersot⁵

^{1*} Doutoranda em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico. Caixa Postal 19011 CEP 81531-990 Curitiba – PR. e-mail: maikemaziero@yahoo.com.br

² Méd. Veterinária Residente UNESP - Botucatu

³ Mestrando em Ciências Veterinárias - UFPR

⁴ Prof. Doutor UNESP - Botucatu

⁵ Prof. Doutor Universidade Federal do Paraná

Resumo

Bacillus cereus é um microrganismo termodúrico que pode apresentar atividade lipolítica e proteolítica, comprometendo a qualidade de produtos lácteos. Sua presença foi avaliada em 110 amostras de 19 marcas comerciais através de duas metodologias, uma qualitativa e outra quantitativa. Pela técnica quantitativa nenhuma amostra apresentou contagens acima do limite de detecção do método (>10 UFC/ml). Já pelo método qualitativo 18 amostras (16,36%) foram positivas para *B. cereus*. Todas as cepas de *B. cereus* isoladas em leite UHT apresentaram atividade proteolítica após 24h de incubação. Nenhuma das cepas de *B. cereus* apresentou atividade lipolítica após 24h de

incubação, no entanto, prolongando esta incubação para 96h, dez cepas formaram halos característicos de lipólise. Foi constatado que 44,4% das cepas de *B. cereus* apresentaram atividade lipolítica e proteolítica simultaneamente. A presença de *B. cereus* proteolítico e lipolítico em leite UHT pode causar defeitos sensoriais durante seu prazo de validade.

Palavras-chave: lipólise, proteólise, geleificação.

Incidence and lipolytic and proteolytic activity of *Bacillus cereus* in UHT milk

Abstract

Bacillus cereus is a thermotolerant microorganism that may have lipolytic and proteolytic activity, decreasing the quality of dairy products by causing sensorial defects during shelf life. The presence of *B. cereus* was evaluated in 110 UHT milk samples from 19 commercial brands, using two methods: qualitative and quantitative. By the quantitative technique no sample had any counts above the limit of detection (> 10 CFU/ml). On the other hand, by the qualitative method 18 samples (16.36%) were positive for *B. cereus*. All strains of *B. cereus* isolated from UHT milk showed proteolytic activity after 24h incubation. Any isolated strain had lipolytic activity after 24h of incubation, however, extending this incubation to 96h, 10 strains formed characteristic lipolysis sign in growth medium. It was found that 44.4% *B. cereus* strains presented both lipolytic and proteolytic activity.

Keywords: lipolysis, proteolysis, gelation.

INTRODUÇÃO

O leite longa vida tem uma participação elevada na comercialização de leites fluídos no Brasil devido, principalmente, a sua praticidade por não necessitar de refrigeração e pelo seu longo prazo de validade. Segundo dados

da Associação Brasileira de Leite Longa Vida, a participação de mercado do produto que era de 14,4% em 1993, alcançou 74,6% em 2007 (ABLV, 2010).

O leite longa vida, processado à ultra-alta temperatura (UAT) ou *ultra hight temperature* (UHT), é homogeneizado e submetido a uma temperatura entre 130 °C e 150 °C durante 2 a 4 segundos, mediante processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32 °C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997).

O processamento do leite a ultra-alta temperatura origina um produto microbiologicamente estável, ou seja, que pode ser armazenado a temperatura ambiente por um longo período (VEISSEYRE, 1988; ORDÓÑEZ, 2005). O processo elimina quase todas as células bacterianas vegetativas, no entanto, alguns esporos podem resistir, entre eles esporos do grupo *Bacillus* spp. (FOSCHINO et al., 1990). Algumas linhagens de *B. cereus* podem resistir ao processamento térmico aplicado na indústria de alimentos (GAILLARD et al., 1988; SVENSSON et al., 1999).

B. cereus geralmente sintetiza uma variedade de enzimas, entre elas, as proteases e lipases. Estas enzimas são responsáveis pelo desenvolvimento de atributos sensoriais indesejáveis em produtos lácteos (ALMEIDA et al., 2000; CHEN et al., 2004).

A presença de lipases provoca alterações sensoriais em leite UHT, tais como, formação de gosto "de sabão", rançoso e amargo (ANDERSSON et al., 1981). As proteases podem causar geleificação no leite UHT, uma vez que atuam principalmente sobre a κ -caseína do leite, provocando perda de estabilidade, o que favorece a agregação das micelas de caseína (SILVA, 2004; VIDAL-MARTINS et al., 2005).

Considerando a importância que o leite UHT tem no mercado brasileiro, é fundamental o monitoramento de sua qualidade microbiológica, tanto pela questão de saúde pública quanto pelo aspecto tecnológico, ou seja, perda das suas características sensoriais e diminuição do prazo de validade.

O objetivo deste estudo foi avaliar a incidência de *Bacillus cereus* em leite UHT obtido no comércio varejista, avaliando o comportamento lipolítico e proteolítico das cepas encontradas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas 110 amostras de leite UHT de 19 marcas de diferentes lotes no mercado varejista dos Estados do Paraná e Santa Catarina, armazenadas em temperatura ambiente até o momento da análise. As amostras foram analisadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Água e Alimentos (LACOMA), na Universidade Federal do Paraná - Campus Palotina e no Laboratório de Microbiologia do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba.

As amostras foram incubadas a 35 °C por 7 dias conforme a Portaria 146 (BRASIL, 1996). Foram utilizadas duas metodologias para a avaliação de *B. cereus*, sendo uma quantitativa (plaqueamento direto) e outra qualitativa (enriquecimento seletivo).

A determinação quantitativa de *B. cereus* foi realizada por plaqueamento seletivo em agar manitol-gema de ovo-polimixina B (MYP). Após incubação a 30 °C por 18-40 horas, as colônias características de *B. cereus* foram submetidas à identificação bioquímica (BAM, 2001).

Para a pesquisa qualitativa de *B. cereus* foi realizado o enriquecimento seletivo em caldo de soja triptona (TSB) adicionado de polimixina B seguido de incubação a 30 °C por 24-30h. O plaqueamento seletivo foi feito em agar manitol-gema de ovo-polimixina B (MYP). Após incubação a 30 °C por 18-40 horas, as colônias características de *B. cereus* foram submetidas à identificação bioquímica (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

A identificação bioquímica de *B. cereus* foi feita pelas provas de utilização anaeróbica da glucose, decomposição da tirosina, prova de Vogues-Proskauer, redução do nitrato a nitrito e resistência a lisozima (BAM, 2001).

A determinação do caráter proteolítico e lipolítico das colônias isoladas foi feita em ágar leite (PCA adicionado de 10% de leite) e em ágar tributirina (PCA acrescido de 1% de tributirina) respectivamente. As placas foram incubadas a 30 °C por 24h, sendo consideradas positivas as colônias com formação de halo (BEERENS & LUQUET, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo método quantitativo nenhuma das amostras de leite UHT analisadas apresentou contagens dentro do limite de detecção do método (<10 UFC/ml). Por outro lado, pelo método quantitativo, 18 amostras (16,36%) foram positivas para *Bacillus cereus*. Este fato é indicativo que *B. cereus* está presente no leite em pequenas quantidades, o que dificulta sua detecção pelo método quantitativo.

No entanto, Janstová et al. (2006) inocularam *B. cereus* em leite UHT e verificaram que, um inóculo de 10 UFC/ml após 3 semanas estocado a 24 °C, origina uma contagem final de 6×10^5 UFC/ml. Este fato é indicativo que a positividade de *B. cereus* pelo método qualitativo é um dado crítico, pois este micro-organismo pode se multiplicar durante a estocagem do leite UHT.

A positividade de amostras de leite UHT pelo método qualitativo foi superior ao relatado por Vidal-Martins et al. (2005), que encontraram *B. cereus* em 11,8% de amostras de leite UHT comercializadas em São José do Rio Preto – SP. Pela mesma técnica, Rezende-Lago et al. (2007) identificaram 13,3% das amostras de leite longa vida positivas para *B. cereus*, sendo que algumas linhagens apresentaram capacidade enterotoxigênica, indicando risco potencial à saúde do consumidor. Apesar da incidência relatada na bibliografia, a legislação brasileira não prevê limites para *B. cereus* em leite UHT (BRASIL, 1996).

A presença de *B. cereus* no leite processado pode ocorrer devido a alta incidência de esporos no leite cru (SVENSSON et al., 2004), termorresistência

dos esporos (GAILLARD et al., 1988) ou pela contaminação pós-processamento (SCHRAFT et al., 1996).

Tabela 1 – Avaliação da atividade lipolítica e proteolítica a 30 °C das cepas de *Bacillus cereus* isoladas de leite UHT

Resultado	Atividade Lipolítica		Atividade Proteolítica
	24h	96h	24h
Negativo	18 (100%)	8 (44,4%)	0
Positivo	0	10 (55,6%)	18 (100%)
Total	18	18	18

Todas as cepas de *B. cereus* isoladas em leite UHT apresentaram atividade proteolítica após 24h de incubação (Tabela 1). A proteólise do leite UHT durante a estocagem em temperatura ambiente é o principal limitante de seu prazo de validade, devido a mudanças na sua textura, tais como, aumento da viscosidade, levando em alguns casos, à formação de gel (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

As proteases produzidas por *B. cereus* atuam com maior intensidade sobre as caseínas do leite, sendo que as proteínas do soro são mais resistentes à proteólise. A degradação da caseína libera peptídeos de baixo peso molecular que podem causar a formação de sabores indesejáveis no leite (JANSTOVÁ et al., 2006).

Nenhuma das cepas de *B. cereus* apresentou atividade lipolítica após 24h de incubação, no entanto, prolongando esta incubação para 96h, dez cepas formaram halos característicos de lipólise (Tabela 1). Apesar da técnica utilizada para avaliação da atividade lipolítica ser qualitativa, foi observado que os halos de lipólise apresentavam menor diâmetro do que os de colônias com atividade proteolítica.

Matta & Punj (1999) avaliaram 100 amostras de leite cru e encontraram *B. cereus* lipolítico e psicrotófico em 15 amostras. As alterações sensoriais

MAZIERO, M.T. et al. Incidência e avaliação da atividade lipolítica e proteolítica de *Bacillus cereus* em leite UHT. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 27, Ed. 174, Art. 1174, 2011.

provocadas por lipases microbianas em leite UHT podem ser percebidas a partir de 22 dias de estocagem (ANDERSSON et al., 1981).

Foi constatado que 44,4% das cepas de *B. cereus* apresentaram atividade lipolítica e proteolítica simultaneamente. Este percentual foi menor que o relatado por Almeida et al. (2000), que encontraram 74% das cepas de *Bacillus* spp isoladas de leite cru com atividade conjunta lipolítica e proteolítica.

A presença de *B. cereus* proteolítico e lipolítico nas amostras de leite UHT avaliadas pode ser considerada um problema para a indústria de produtos lácteos, uma vez que este micro-organismo pode causar defeitos sensoriais ao longo do prazo de validade destes produtos.

CONCLUSÕES

A contagem de *B. cereus* nas amostras nas amostras de UHT foi abaixo do limite de detecção do método quantitativo, no entanto, a positividade detectada pelo método quantitativo em algumas amostras é indicativa de que, mesmo em pequenas quantidades, este micro-organismo pode estar presente neste produto. Todas as cepas isoladas apresentaram atividade proteolítica e algumas também lipolítica, o que pode causar defeitos sensoriais no leite UHT.

REFERENCIAS

ABLV. Associação Brasileira de Leite Longa Vida. Acesso em 01 de junho de 2010. disponível em: <http://www.ablv.org.br/Estatisticas.aspx>

ALMEIDA, I.C.; SANTOS, E.S.; CARVALHO, E.P. Pesquisa de atividade lipolítica e/ou proteolítica em cepas psicrotóxicas de *Pseudomonas* spp e *Bacillus* spp. **Higiene Alimentar**, v.14, n.71, p.58-60, 2000.

ANDERSSON, R.E.; DANIELSSON, G.; HEDLUND, C.B.; SVENSSON, S.G. Effect of a heat-resistant microbial lipase on flavor of ultra-high-temperature sterilized milk. **Journal of Dairy Science**, v.6, p.375-379, 1981.

BAM, **Bacteriological analytical manual**. Chapter 12: *Bacillus cereus*, 2001.

BEERENS, H.; LUQUET, F.M. **Guía practica para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos**. Editorial Acríbia S.A. 141p., 1990.

BRASIL, Ministério da Agricultura. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Aprovado pelo decreto n 30691 de 29/03/52. Alterado pelo Decreto 2244 de 04/06/1997. Brasília-DF, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. *Portaria 146 de 07/03/1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite UAT*. Brasília- DF, 1996.

CHEN, L.; COOLBEAR, T.; DANIEL, R.M. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp isolated from milk powder production lines. **International Dairy Journal**, v.14, p.495-504, 2004.

FOSCHINO, R.; GALLI, A.; OTTOGALLI, G. Research on the microflora of UHT Milk. **Annali di microbiologia ed enzimologia**. v.40, n.1, p.47-59, 1990.

GAILLARD, S.; LEGUERINEL, I.; MAFART, P. Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. **Journal of food science**, v.63, n.5, p.887-889, 1998.

JANSTOVÁ, B.; DRACKOVÁ, M., VORLOVÁ, L. Effect of *Bacillus cereus* enzymes on the milk quality following ultra high temperature processing. **Acta Vet. Brno**, v.75, p.601-609, 2006.

MATTA, H.; PUNJ, V. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.52, n.2, p.59-62, 1999.

ORDOÑEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos – Volume 2 – Alimentos de origem animal**. Editora Artmed. 279p., 2005.

REZENDE-LAGO, N.C.M.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; AMARAL, L.A. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1563-1569, 2007.

SCHRAFT, H.; STEELE, M.; McNAB, B.; ODUMERU, J.; GRIFFITHS, M.W. Epidemiological typing of *Bacillus* spp isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.11, p.4229-4232, 1996.

SILVA, P.H.F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e geleificação**. 127p., 2004.

SVENSSON, B.; ENEROTH, A.; BRENDENHAUG, J.; CHRISTIANSSON, A. Investigation of *Bacillus cereus* contamination sites in a dairy plant with RAPD-PCR. **International Dairy Journal**, v.9, p.903-912, 1999.

VEISSEYRE, R. **Lactologia técnica** - Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. Editorial Acribia, 1988.

VIDAL-MARTINS, A.A.; SALOTTI, B.M.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; PENNA, A.L.B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.698-704, 2005.

VIDAL-MARTINS, A.A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; REZENDE-LAGO, N.C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo *Bacillus cereus* em leite integral submetido à ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, p. 396-400, 2005a.