

LEANDRO CARDOSO RIBEIRO

**INIBIÇÃO DAS ATIVIDADES PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA DE
Pseudomonas fluorescens POR NISINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Ribeiro, Leandro Cardoso, 1986-
R484i Inibição das atividades proteolítica e lipolítica de
2018 *Pseudomonas fluorescens* por nisina / Leandro Cardoso Ribeiro.
– Viçosa, MG, 2018.
xi, 47f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 36-47.

1. Leite - Bacteriologia. 2. Enzimas proteolíticas.
3. Organismos psicrotróficos. 4. Nisina. 5. *Pseudomonas
fluorescens*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

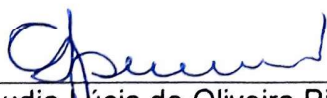
CDD 22. ed. 637.1277

LEANDRO CARDOSO RIBEIRO

**INIBIÇÃO DAS ATIVIDADES PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA DE
Pseudomonas fluorescens POR NISINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2018.



Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto



Denise Mara Soares Bazzoli



Ramila Cristiane Rodrigues



François Baglinière
(Coorientador)



Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

*À minha esposa, Lilian,
À minha mãe, Maria,
pelo incentivo e apoio constante.*

DEDICO

"Muitas das coisas mais importantes do mundo foram conseguidas por pessoas que continuaram tentando quando parecia não haver mais nenhuma esperança de sucesso."

Dale Carnegie

AGRADECIMENTOS

À Lilian, pela paciência, companheirismo e amor incondicional que foram fundamentais em cada momento e tornaram mais suaves as dificuldades encontradas no caminho.

À minha mãe, pelo apoio, incentivo e por sempre acreditar em mim.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pelo ensino de excelência e por fornecerem toda a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, por ser meu exemplo de profissional, pela orientação, pelos “puxões de orelha” e por todos os ensinamentos e palavras de estímulo.

Ao Dr. François Baglinière, por todo conhecimento compartilhado, pela amizade e por me influenciar a trabalhar com atividade proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* em leite.

À professora Denise Mara Soares Bazzoli, pelo apoio irrestrito, por todo o carinho e pelas valiosas sugestões.

À Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, pesquisadora da EPAMIG, pela disponibilidade e sugestões.

À Dra. Ramila Cristiane Rodrigues, pós-doutoranda do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelo apoio, carinho e estímulo.

À professora Míriam Terezinha dos Santos, pela afeição, apoio e por ser uma das responsáveis por eu optar pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

Ao professor Mateus Ferreira Santana, pela paciência e disponibilidade em todos os momentos que precisei.

Aos professores do Departamento de Microbiologia por toda competência e por serem essenciais para a minha formação.

Aos amigos Ana Carolina Nery, Beatriz Pazetto, Matheus Guidini e Giarlã Silva, por todos os momentos de carinho, por cada sorriso compartilhado, por cada palavra de conforto, por estarem sempre presentes nos momentos mais difíceis dessa jornada e por tornarem os meus dias mais suaves e divertidos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Cleonice,

Leonardo, Deisy, Gabriel, Felipe Almeida, Felipe Lopes, Júlia, Fernanda, Érika, Sabrina, Solimar, Andres, Amanda, Cláudia, Fábio, Mayara e Jéssika, pela convivência e troca de experiências.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular de Bactérias, por todo apoio e por compartilharem o espaço físico do laboratório, os equipamentos e os reagentes fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial pelos momentos de descontração.

Aos amigos do grupo “Padrão Biologia Molecular”, por dividirem ensinamentos, pelas travessuras, churrascos, gargalhadas e pelos momentos inesquecíveis. “Duzentos reais, Carlos!”

À Camila e Elizete pelos momentos de relaxamento, pelos cafés e por torcerem sempre pela minha vitória.

Aos funcionários e amigos Raquel, Aline, Letícia, Sandra, Gabriel e Iraci, pela amizade, disponibilidade e por toda atenção.

À todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho e para meu crescimento pessoal e profissional.

BIOGRAFIA

LEANDRO CARDOSO RIBEIRO, filho de Sebastião Marcos Ribeiro e Maria da Penha Cardoso, nasceu em Juiz de Fora - MG, em 27 de março de 1986.

Em julho de 2010, graduou-se em Biomedicina pela Universidade Presidente Antonio Carlos (UNIPAC), em Juiz de Fora – MG.

Em agosto de 2016, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, na área de Microbiologia de Alimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Deterioração do leite por bactérias psicrotróficas.....	4
2.2. Ação de proteases e lipases no leite	7
2.3. Sistema de secreção enzimática e organização do operon <i>aprX-lipA</i>	10
2.4. Nisina como conservantes de alimentos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Isolados bacterianos.....	16
3.2. Preparo e atividade de nisina	16
3.3. Condição de cultivo	17
3.4. Atividade proteolítica extracelular	18
3.4.1. Quantificação da atividade proteolítica extracelular	18
3.4.2. Zimografia para avaliação da atividade proteolítica	18
3.5. Atividade lipolítica extracelular.....	19
3.5.1. Quantificação da atividade lipolítica extracelular.....	19
3.5.2. Zimografia para avaliação da atividade lipolítica.....	20
3.6. Quantificação da atividade proteolítica e lipolítica intracelular	21
3.7. Quantificação da atividade proteolítica no sobrenadante livre de células a adicionado de nisina	21
3.8. Quantificação da atividade lipolítica de <i>P. fluorescens</i> cultivada na ausência de nisina.....	22
3.9. Extração e purificação de RNA total	22
3.10. Análise estatística	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Efeito de nisina sobre o crescimento de <i>P. fluorescens</i>	24
4.2. Efeito de nisina sobre a atividade proteolítica no sobrenadante livre de células de <i>P. fluorescens</i>	25
4.3. Efeito de nisina sobre a atividade proteolítica intracelular de <i>P. fluorescens</i>	29
4.4. Efeito inibitório de nisina sobre a atividade lipolítica de <i>P. fluorescens</i>	29
4.5. Efeito de nisina sobre a atividade lipolítica intracelular de <i>P. fluorescens</i>	32
4.6. Extração de RNA de <i>P. fluorescens</i> na ausência e na presença de nisina ...	32
5. CONCLUSÃO	35
6. BIBLIOGRAFIA	36

RESUMO

RIBEIRO, Leandro Cardoso, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Inibição das atividades proteolítica e lipolítica de *Pseudomonas fluorescens* por nisina.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Coorientadores: François Baglinière e Hilário Cuquetto Mantovani.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são os principais contaminantes do leite cru refrigerado e algumas espécies produzem proteases e lipases resistentes às temperaturas de pasteurização e Ultra Alta temperatura (UAT) comumente utilizadas pela indústria como estratégia para garantir a qualidade e segurança do leite. A atividade destas enzimas sobre os constituintes do leite causa diversos problemas como a gelificação e coagulação, sabor e odor indesejados além de rancidez, levando à diminuição do rendimento na fabricação de queijos, perda de qualidade sensorial e diminuição da vida de prateleira dos produtos lácteos. Nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* utilizada como bioconservante em alimentos em mais de 50 países. Tem ação bactericida contra micro-organismos gram-positivos por se ligar à membrana citoplasmática destes, formar poros que ocasionam o efluxo de eletrólitos e de metabólitos, levando o micro-organismo à morte. Entretanto, micro-organismos gram-negativos são pouco susceptíveis ao mecanismo de ação da nisina, uma vez que a membrana externa atua como barreira, impedindo a passagem da bacteriocina, não permitindo que esta chegue ao seu sítio de ação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito inibitório de nisina sobre a atividade das proteases e lipases produzidas por *Pseudomonas fluorescens*, quantificar as atividades proteolíticas e lipolíticas extra e intracelular na presença e na ausência de nisina e verificar a influência da bacteriocina sobre a transcrição dos genes do operon *aprX-lipA*. Foi observado que nisina, na concentração de 400 AU/mL não inibe o crescimento celular de *P. fluorescens* mas, tem efeito inibitório sobre as atividades proteolítica e lipolítica desta bactéria. A atividade proteolítica dos isolados de *P. fluorescens* denominados L211, L213 e L214 foi inibida em 78, 90 e 92%, respectivamente, no período de 24 h na presença de nisina. Este efeito inibidor foi reduzido no período de 48 h de incubação e variou entre 58% e 60%. A atividade lipolítica dos isolados de *P. fluorescens* L211 e L213 foi completamente inibida em 24 h de incubação, enquanto o percentual de inibição da atividade lipolítica do isolado L214 foi de 97%. Como observado sobre a

atividade proteolítica, a extensão do período de incubação para 48 h reduziu o efeito inibidor da nisina sobre a lipólise e este percentual de inibição variou de 89% à 92%. Não foi observada nenhuma influência da nisina sobre a reação hidrolítica das enzimas secretadas. Porém, não foi possível esclarecer se nisina atua sobre a transcrição dos genes, a síntese ou sobre a secreção da protease e da lipase do micro-organismo. A extração do RNA total foi feita para investigar a transcrição dos genes *aprX*, *lipA*, *aprD*, *aprE* e *aprF*, referentes à protease, lipase e as três proteínas do sistema de transporte ABC, respectivamente, em condições de crescimento de *P. fluorescens* na presença de nisina (400 AU/mL). Estas análises podem ajudar a explicar o mecanismo utilizado por nisina para inibir a atividade enzimática de *P. fluorescens*.

ABSTRACT

RIBEIRO, Leandro Cardoso, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018.
Inhibition of proteolytic and lipolytic activities of *Pseudomonas fluorescens* by nisin. Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisers: François Baglinière and Hilário Cuquetto Mantovani.

The main contaminant of refrigerated raw milk is the bacteria of the genus *Pseudomonas*. These microorganisms produce proteases and lipases resistant to the Ultra High Temperature (UHT) pasteurization temperatures commonly used by industry as a strategy to ensure the quality and safety of the product. The activity of these enzymes in the milk constituents causes several problems such as milk gelling and coagulation, undesired taste and odor besides rancidity, leading to a decrease in cheese production yield, loss of sensorial quality and shortening the shelf life of the products dairy products. Nisin is a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* used as a biopreservative in foods in more than 50 countries. It has bactericidal activity against Gram-positive microorganisms to bind to the cytoplasmic membrane of these microorganisms forming pores that cause the efflux of electrolytes and metabolites, taking the microorganism to death. However, by having the outer membrane, Gram-negative bacteria are less susceptible to the mechanism of action of nisin. The outer membrane acts as a barrier, preventing the passage of the bacteriocin and not allowing it to reach its site of action. The objective of this study was to evaluate the inhibitory effect of nisin on the activity of proteases and lipases produced by fluorescent *Pseudomonas*, to quantify extra and intracellular proteolytic and lipolytic activities in the presence and absence of nisin and to verify the influence of bacteriocin on the transcription of genes of the aprX-lipA operon. It was observed that nisin, at a concentration of 400 AU/mL, does not inhibit cellular growth but has an inhibitory effect on the proteolytic and lipolytic activities of the enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens*. The proteolytic activity of *P. fluorescens* L211, L213 and L214 was inhibited at 78, 90 and 92%, respectively; in the period of 24 h and the percent inhibition in the 48 h period is 60% for the strains L211 and L213 and of 58 % for L214 strain. The lipolytic activity of *P. fluorescens* L211 and L213 strains was completely inhibited in 24 h while the percent inhibition of the lipolytic activity of the L214 strain was 97%. At 48 h the inhibition percent reduced to 89, 92 and 91%, respectively. The results demonstrate that nisin does not act to

inhibit the hydrolytic reaction of the enzymes after their synthesis and secretion to the external environment. However, it was not possible to clarify whether nisin acts on the secretion, translation or transcription of the protease and lipase genes of the microorganism. RNA extraction of the *P. fluorescens* was done so that further analysis could be performed. These analyzes may help explain the mechanism used by nisin to inhibit the enzymatic activity of *P. fluorescens*.

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas fluorescens é uma das bactérias psicrotróficas mais comumente encontrada no leite cru. Esta bactéria produz enzimas, a exemplo de proteases e lipases, que são capazes de resistirem aos tratamentos térmicos comumente utilizados pela indústria nos processos de pasteurização e esterilização do leite cru. Esta termorresistência causa diversos problemas tecnológicos para a indústria laticinista como a gelificação e a coagulação do leite, sabor e odor indesejados, além de rancidez.

AprX e LipA são, respectivamente, proteases e lipases produzidas por *P. fluorescens*. Os genes que codificam estas enzimas em *P. fluorescens* estão organizados em um operon, *aprX-lipA*, juntamente com os genes das proteínas do sistema transportador tipo I, *aprDEF*, responsáveis por exportarem essas enzimas para o meio externo. Isto sugere que a transcrição destes genes é um processo muito bem coordenado e com alguma importância fisiológica.

Nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que tem ação contra bactérias gram-positivas e é utilizada pela indústria como bioconservante. Esta bacteriocina se liga, por meio de ligações de hidrogênio, ao grupo pirofosfato do lipídeo II presente na membrana citoplasmática deste grupo de bactérias, e se insere na fase lipídica da membrana celular, com consequente formação de poros ocasionando a perda do potencial de membrana e o extravasamento de íons e metabólitos da célula bacteriana, causando sua morte.

A ação antimicrobiana de nisina em bactérias gram-negativas é possível

com uso de agentes ou tratamentos capazes de desestabilizar a membrana externa dessas bactérias, permitindo assim, que a bacteriocina atravessasse essa barreira e se ligue à parede celular. Entretanto, estudos prévios indicam que embora concentrações de nisina que não sejam capazes de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas, são capazes de reduzir a atividade proteolítica e lipolítica das bactérias psicrótróficas isoladas de leite. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi explorar este potencial inibidor de nisina e entender o mecanismo de ação desta bacteriocina sobre a atividade deterioradora de *P. fluorescens* isoladas de leite cru.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O consumo global de leite fluído tem aumentado nos últimos anos, principalmente entre os países em desenvolvimento. Para suprir a demanda, estima-se que seja necessário um aumento na produção de leite de, aproximadamente, 2% ao ano (GEROSA; SKOET, 2013; KAPAJ; DECI, 2017). O Brasil é o quinto maior produtor de leite do mundo e superado apenas pela Índia, Estados Unidos, China e Paquistão (KAPAJ; DECI, 2017). A produção de leite fluído no Brasil em 2017, foi de 23.555 milhões de toneladas métricas (MMT), sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor de leite do país (KAPAJ; DECI, 2017; USDA, 2017).

Devido ao alto valor nutricional e aos benefícios à saúde, o leite é um dos alimentos mais consumidos em todo o mundo e é, frequentemente, indicado em dietas balanceadas por ser fonte de proteínas, carboidratos, lipídeos, minerais e aminoácidos. Segundo as Diretrizes Dietéticas para Americanos (DGA) a ingestão de leite e produtos lácteos contribui para a manutenção dos níveis adequados de minerais, como cálcio, magnésio, fósforo, e vitaminas A, D, B12 e B2 no organismo (LAMARCHE et al., 2016; MOBLEY; JENSEN; MAULDING, 2014; SEBASTIAN et al., 2010).

A abundância de nutrientes do leite, associada ao pH próximo ao neutro e a alta atividade de água permitem a multiplicação de diversos micro-organismos patogênicos e deterioradores. A multiplicação de micro-organismos leva à deterioração do leite pela produção de metabólitos que irão promover alterações no leite e derivados, como acidificação, proteólise e lipólise. Alguns

micro-organismos deterioradores utilizam a lactose como fonte de carbono e energia, produzindo ácido láctico, o que leva à redução do pH do leite de 6,6 para aproximadamente 4,5, o que resultará na precipitação da caseína, a principal proteína do leite (CLAEYS et al., 2013; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005a; YUAN et al., 2017a).

A legislação brasileira estabelece, desde 2001 com a adoção da Instrução Normativa (IN) nº 51, que o leite seja refrigerado imediatamente após a ordenha e que o transporte seja realizado em caminhões com tanques isotérmicos (BRASIL, 2002). Em 2011, o Brasil instituiu a IN nº 62 que determina que a leite seja mantido em temperatura de, no máximo 7 °C, na fonte de produção. Esta medida é capaz de reduzir o crescimento microbiano e controlar a deterioração do leite (BRASIL, 2011). Entretanto, algumas bactérias, denominadas de psicotróficas, têm a capacidade de crescer nessas temperaturas (MACHADO et al., 2017).

2.1. Deterioração do leite por bactérias psicotróficas

Bactérias psicotróficas apresentam temperatura ótima de crescimento entre 15 °C e 40 °C mas que também têm a capacidade de se multiplicarem em temperaturas 7 ± 1 °C, com formação de colônias visíveis ou turvação do meio, em período de 7 a 10 dias (COUSIN; JAY; VASAVADA, 2013). O crescimento a baixas temperaturas exige uma série de adaptações estruturais e metabólicas pelas células bacterianas. Para manter a fluidez, a permeabilidade e preservar as funções da membrana celular ocorre aumento dos ácidos graxos insaturados. Esta ampliação do número de ácidos graxos insaturados gera redução no ponto de fusão dos lipídeos, mantendo-os em estado líquido, permitindo que a membrana continue funcionalmente ativa (BEALES, 2004; JAY, 2005)

Alguns micro-organismos psicotróficos podem produzir enzimas extracelulares, como proteases e lipases, resistentes às temperaturas de pasteurização e ao tratamento a Ultra-Alta Temperatura (UAT) (BAUR et al., 2015; MACHADO et al., 2017). Desta forma, quando o leite cru é submetido a altas temperaturas, a maioria das células vegetativas é eliminada mas, as enzimas termorresistentes secretadas por estas permanecem ativas no leite (XIN et al., 2017). A atividade residual destas enzimas compromete a integridade

dos elementos que compõem o leite e causam alterações sensoriais como sabores e odores desagradáveis, rancidez e gelificação do leite UAT, além de reduzir a vida de prateleira dos produtos, diminuir o rendimento na fabricação de queijos e levar à perda da estabilidade térmica (PINTO et al., 2014; MARTINS et al., 2015; MACHADO et al., 2017; ZHANG; BIJL; HETTINGA, 2018).

Os gêneros de bactérias psicrotróficas comumente encontrados no leite são *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Serratia*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas*, sendo este último o gênero predominante (NICODÈME et al., 2005; PINTO et al., 2006; MARTINS et al., 2006; BAGLINIÈRE et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2015; MACHADO et al., 2017; YUAN et al., 2017).

Pinto et al. (2015) analisaram amostras de leite cru refrigerado de fazendas da Zona da Mata mineira para identificar a microbiota psicrotrófica proteolítica contaminante do leite e concluíram que *Pseudomonas* é o gênero de bactérias predominante nas amostras, representando 33,98% do total de bactérias isoladas. Von Neubeck et al. (2015) avaliaram a biodiversidade da microbiota do leite cru refrigerado de 10 fazendas e 10 laticínios diferentes da Alemanha e obtiveram 2.906 isolados pertencentes aos gêneros: *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Acinetobacter*, *Microbacterium*, *Carnobacterium*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc*, *Stenotrophomonas*, *Candida*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Hafnia*, *Aerococcus*, *Kluyveromyces*, *Bacillus* e outros 46 gêneros menos representativos. Dentre estes, os gêneros *Pseudomonas*, *Lactococcus* e *Acinetobacter* foram os mais abundantes. Aproximadamente, 85% das bactérias encontradas do gênero *Pseudomonas* apresentaram atividade proteolítica ou lipolítica ou ambas as atividades enzimáticas (VON NEUBECK et al., 2015).

De acordo com a literatura, *Pseudomonas fluorescens* é a bactéria psicrotrófica mais frequentemente encontrada no leite cru (PINTO et al., 2006; 2015; MARTINS et al., 2014; SCATAMBURLO et al., 2015; MENG et al., 2018). Estas bactérias, bastonetes, gram-negativas, não formadoras de esporos, com múltiplos flagelos polares, aeróbias obrigatórias, oxidase e catalase positivas, com temperatura ótima de crescimento entre 25 °C e 30 °C, podem ser encontradas em diversos ambientes como solo, água e superfícies e raízes de plantas (MOORE et al., 2006). As bactérias do gênero *Pseudomonas* apresentam alta concentração de lipídeos insaturados em sua membrana, o que

lhes confere vantagem competitiva e melhor adaptabilidade às baixas temperaturas (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

A identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas de leite cru granelizado realizada por Pinto et al. (2015) demonstraram a dominância da espécie *P. fluorescens* que representou 33,31% do total de isolados proteolíticos identificados. A predominância da contaminação por *P. fluorescens* no leite cru também foi confirmada por Yuan et al. (2017) ao analisarem 16 amostras de leite provenientes de 11 cidades de diferentes regiões da China. Eles encontraram abundância relativa de 58,8% dos isolados como sendo do gênero *Pseudomonas*. Destes 15,8% foram identificadas como sendo da espécie *P. fluorescens*.

Algumas espécies do gênero *Pseudomonas* são capazes de produzir enzimas responsáveis pela degradação do leite. AprX é uma protease extracelular produzida *P. fluorescens*, classificada como metaloprotease alcalina, que tem alta concentração dos resíduos de aminoácidos alanina e glicina e baixas concentrações de cisteína e metionina (MITCHELL; EWINGS; BARTLEY, 1986; DUFOUR et al., 2008; MARCHAND et al., 2008). A AprX pertence à família das serralisinas, tem massa molecular de, aproximadamente, 50 kDa, possui resíduos de ácido glutâmico no sítio ativo e necessita de cátion bivalente, zinco (Zn^{2+}) para ser funcional. A termoestabilidade desta enzima é conferida pela presença do Zn^{2+} , oito átomos de cálcio e pela ausência de pontes dissulfeto, que conferem maior flexibilidade à estrutura primária (MITCHELL; EWINGS; BARTLEY, 1986; GARCÍA-CARREÑO, 1992; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; BAGLINIÈRE et al., 2013; MATÉOS et al., 2015; MARTINS et al., 2015).

Além da protease AprX, *P. fluorescens* também produz a lipase LipA, classificada como serina hidrolase, com massa molecular de, aproximadamente, 50 kDa e que apresenta atividade sobre substratos insolúveis como a gordura do leite. Assim como a AprX, tanto a secreção de LipA e a estabilidade a altas temperaturas é estimulada por cálcio (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997).

Um fato interessante é que a produção de lipase por *P. fluorescens* é regulada pela temperatura, sendo que, quanto maior a temperatura de crescimento, menor a produção da enzima (ANDERSSON, 1980). Merieau et al. (1993) demonstraram que em baixas temperaturas, a lipase de *P. fluorescens* MFO apresenta alta atividade sendo que a temperatura ótima de atividade é de

17,5 °C. Woods et al. (2001) também verificaram o aumento da atividade lipolítica em baixas temperaturas e confirmaram que acima da temperatura ótima de crescimento de *P. fluorescens* B52 não foi detectada atividade lipolítica.

Mesmo tendo atividade ótima a baixas temperaturas e não sendo detectada atividade em temperaturas acima de 30 °C, LipA apresenta resistência a altas temperaturas (ANDERSSON, 1980; WOODS et al., 2001). Após submeterem o leite cru ao tratamento térmico de 63 °C por 30 min, Law et al. (1976) observaram que a lipase de *P. fluorescens* manteve atividade residual entre 64,3 e 100%. A hidrólise da gordura do leite causa rancidez e, ocasionalmente, sabor amargo, em leite fluído, manteigas e iogurtes tornando os produtos inadequados para o consumo (DE JONGHE et al., 2011).

2.2. Ação de proteases e lipases no leite

As atividades de proteases e lipases representam uma das principais causas de deterioração do leite. Estas enzimas podem ser naturais do leite ou de origem bacteriana (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003). A proteólise do leite por proteases nativas está associada, principalmente, à ação da enzima plasmina, que encontra-se associada às micelas de caseína e aos glóbulos de gordura (KELLY; FOX, 2006). Porém, a concentração destas enzimas no leite é muito baixa, sendo necessário um longo período de tempo para que a atividade destas enzimas sobre as proteínas do leite sejam perceptíveis (POLITIS; BARBANO; GOREWIT, 1992; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003). Também é difícil perceber a ocorrência de lipólise por enzimas naturais do leite em razão da baixa concentração em que as mesmas se encontram no meio (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003).

Proteases são enzimas que catalisam a clivagem hidrolítica das ligações peptídicas das proteínas, fragmentando a cadeia polipeptídica (NELSON; COX, 2013). A protease sintetizada por *P. fluorescens*, AprX, atua sobre as micelas de caseína, desestabiliza sua estrutura e altera suas características físico-químicas. Por estarem mais expostas na micela de caseína, as frações de κ -caseínas são, preferencialmente, sujeitas à ação das proteases bacterianas, seguida das frações β , α_{s1} e α_{s2} -caseínas (KOKA; WEIMER, 2000; RAJMOHAN; DODD; WAITES, 2002; BAGLINIÈRE et al., 2012).

A AprX desestabiliza o leite durante o período de estocagem aumenta a viscosidade com formação de gel ou sedimento, coagulação devido a formação de caseínas complexadas, odor desagradável e sabor amargo no produto (BAGLINIÈRE et al., 2013; CALDERA et al., 2016).

Woods et al. (2001) observaram que a produção de protease por *P. fluorescens* B52 foi similar em temperaturas de 17 °C e 27 °C, mas diminuiu quando a taxa de crescimento do micro-organismo foi reduzida, o que ocorreu em temperaturas acima de 27 °C. Pinto et al. (2014) avaliaram o perfil de degradação das frações de caseína pela protease de *P. fluorescens* em temperaturas variando de 2 °C a 10 °C e observaram que, mesmo na menor temperatura avaliada, ocorreu a hidrólise das frações de caseína pela atividade enzimática. Alves et al. (2018) demonstraram que baixas temperaturas não inibem a produção de proteases por *P. fluorescens*.

Lipólise é a quebra hidrolítica de triacilgliceróis com liberação de ácidos graxos livres ou não esterificados e glicerídeos (mono ou diglicerídeos), que pode ocorrer devido à ação de esterases ou lipases (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003). As esterases são responsáveis pela hidrólise de triacilgliceróis de cadeia curta (até 10 carbonos), enquanto as lipases atuam preferencialmente, sobre os de cadeia longa, contendo 10 ou mais átomos de carbono, mas também são capazes de hidrolizar ácidos graxos de cadeia curta (DANIEL; COOLBEAR, 2003; CHEN; DEETH, 2006; NELSON; COX, 2013). A clivagem das ligações ésteres dos triglicerídeos, constituintes dos glóbulos de gordura libera ácidos graxos como ácido butírico, capróico, caprílico e cáprico no meio. Estes ácidos causam sabores e odores desagradáveis e rancificação em produtos lácteos (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003).

Woods et al. (2001) demonstraram que *P. fluorescens* B52 secreta uma única lipase detectável de, aproximadamente, 52 kDa e que a produção da lipase é maior em baixas temperaturas do que na temperatura ótima de crescimento do micro-organismo, indicando um sistema de regulação da expressão da lipase por baixa temperatura.

As enzimas AprX e LipA resistem ao tratamento térmico de pasteurização e UAT aplicados pela indústria de alimentos (BAUR et al., 2015; YUAN et al., 2017b). Entretanto, Sørhaug e Stepaniak (1997) descreveram que a temperatura ótima destas enzimas é entre 30 °C e 45 °C. Apesar de resistirem ao tratamento térmico, estas enzimas são sensíveis às temperaturas entre 50 °C e 60 °C

(SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). Adams et al. (1975) mostraram redução na atividade proteolítica de *P. fluorescens* ao submeterem amostras de leite ao tratamento térmico de 72 °C por um período de 4 a 5 h ou a 120° por 7 min. Porém, a aplicação de altas temperaturas por longos períodos de tempo causa danos severos aos constituintes do leite e queda do valor nutricional (FRAU; FONT DE VALDEZ; PECE, 2014; PESTANA et al., 2015).

A detecção de proteases e lipases produzidas por *P. fluorescens* ocorre na fase de desaceleração e na fase estacionária de crescimento quando a população bacteriana está em, aproximadamente, 10^6 a 10^8 UFC/mL (MITCHELL; EWINGS; BARTLEY, 1986; KOKA; WEIMER, 2000; DUFOUR et al., 2008; MARCHAND et al., 2008; STOECKEL et al., 2016). Estas enzimas oferecem vantagem competitiva para o micro-organismo produtor quando a quantidade de nutrientes no meio em que se encontram é insuficiente para que mantenham suas atividades metabólicas basais (STEAD, 1987).

Woods e colaboradores (2001) descreveram que a produção dessas enzimas pode ser regulada por fatores nutricionais, temperatura e disponibilidade de oxigênio. Liu e colaboradores (2007) demonstraram que a produção de proteases por *P. fluorescens* é regulada pelo mecanismo de *quorum sensing* (QS). Porém, Martins et al. (2014) não detectaram a produção de acil-homoserina lactonas (AHL), moléculas sinalizadoras de um dos sistemas de QS em gram-negativas, em dois isolados de *P. fluorescens* de leite cru e concluíram que, nestes isolados, a produção de proteases extracelulares não é regulada pelo autoindutor 1 do sistema de QS. Isto sugere que a produção e a secreção destas enzimas não são mecanismos totalmente definidos.

A ação de proteases e lipases em leite e derivados é um grande desafio para a indústria, pois leva a problemas de qualidade e reduz vida de prateleira desses produtos (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003). Como estas enzimas são capazes de resistirem aos tratamentos térmicos comumente aplicados pela indústria, elas permanecem com atividade suficiente para deteriorarem os produtos ainda dentro do prazo de validade, sendo assim, representam um problema sério na indústria do leite e ainda sem solução.

2.3. Sistema de secreção enzimática e organização do operon *aprX-lipA*

As enzimas AprX e LipA de *P. fluorescens* são secretadas por um transportador ABC, também chamado de sistema de transporte tipo I. O primeiro constituinte deste sistema de transporte é uma proteína de membrana interna, AprD, que é uma proteína de ligação ao ATP e responsável pelo reconhecimento da proteína a ser transportada. O segundo componente, uma proteína de fusão entre as membranas interna e externa, AprE, também está ligado à membrana interna e se comunica com o terceiro componente do sistema, a proteína AprF, que está associada à membrana externa. Juntas, essas três proteínas formam um canal permitindo que as enzimas atravessem do citoplasma para o meio externo, sem passar pelo espaço periplasmático (KAWAI et al., 1999; WHITE, DRUMMOND, FUQUA, 2011).

Woods e colaboradores (2001) demonstraram que os genes *aprX* e *lipA* em *P. fluorescens* B52 estão organizados em um mesmo operon, *aprX-lipA*, porém cada um situado nas extremidades do RNA mensageiro produzido, (Figura 1). Além dos genes codificadores destas enzimas, este operon contém também um gene denominado *inh*, que codifica um inibidor de protease, três genes que codificam proteínas do sistema de transporte tipo I (*aprD*, *aprE* e *aprF*) e os genes que codificam as proteínas autotransportadoras, *prtA* e *prtB*. Foi demonstrado também que a expressão destes genes está sobre o controle de uma única região promotora localizada *upstream* ao gene *aprX* (WOODS et al., 2001).



Figura 1. Organização do operon *aprX-lipA* em *P. fluorescens* B52. Fonte: MCCARTHY; WOODS; BEACHAM, 2004.

A presença de ferro (Fe^{+3}) no meio leva à repressão da produção da protease e lipase de *P. fluorescens*. Além disso, a temperatura também pode regular a expressão dos genes *aprX* e *lipA*, sendo o gene da protease mais expresso em temperaturas próximas à ótima de crescimento e a expressão do

gene da lipase aumentada em baixas temperaturas (MCCARTHY; WOODS; BEACHAM, 2004; WOODS et al., 2001).

Outros pesquisadores relataram arranjos similares no operon *aprX-lipA* de outras estirpes de *P. fluorescens*. Ma e colaboradores (2003) indicaram que há diferenças na organização do operon *aprX-lipA* entre estirpes de *P. fluorescens* entretanto, a parte central do operon que codifica as proteínas transportadoras *aprD-aprE-aprF* não apresentou diferenças. Além disso, eles também demonstram que os genes da protease, *aprX* e do inibidor da protease *inh*, estão presentes nas estirpes estudadas, assim como o gene da lipase, *lipA*. Mas algumas linhagens não apresentaram os genes *ptrA* e *ptrB*, que codificam serina proteases homólogas e algumas, apresentaram dois genes homólogos de lipase, *lipA1* e *lipA2*. A organização destes genes no operon sugere um processo de transcrição coordenada e um provável significado fisiológico (MCCARTHY; WOODS; BEACHAM, 2004; MARCHAND et al., 2009).

2.4. Nisina como conservantes de alimentos

A indústria de alimentos está constantemente em busca de estratégias que auxiliem no processo de conservação de alimentos e de formas para evitar a contaminação dos produtos alimentícios por micro-organismos que possam alterar suas características sensoriais, além de se preocupar em oferecer um alimento seguro, que não represente risco à saúde dos consumidores (GARCÍA et al., 2010). Uma das alternativas utilizadas pela indústria é o uso de bacteriocinas como bioconservantes (COTTER; ROSS; HILL, 2012). Bacteriocinas são peptídeos sintetizados ribossomicamente por bactérias gram-positivas e gram-negativas, que inibem ou causam a morte de outras bactérias relacionadas (GARCÍA et al., 2010; BALCIUNAS et al., 2013; KHAN; OH, 2015; PRUDÊNCIO; VANETTI; PRIETO, 2015).

A bacteriocina mais amplamente estudada é a nisina (COTTER; ROSS; HILL, 2012). Descoberta em 1928, esta bacteriocina é utilizada como conservante de alimentos desde 1950 e pode ser utilizada em queijos, saladas, sopas enlatadas, entre outros (KHAN; OH, 2015). No Brasil, o uso de nisina como aditivo em alimentos é permitido na fabricação de queijos pasteurizados no limite de 12,5 kg/mg, visando controlar o crescimento de *Clostridium* spp.

(BRASIL, 1996). Por ter ação antimicrobiana em baixas concentrações, não apresentar toxicidade contra células eucarióticas, ser hidrolisada por enzimas digestivas, não levar a alteração de sabor e odor dos produtos, a nisina é caracterizada pela *Food and Drug Administration* (FDA) como GRAS (*Geralmente Reconhecida como Segura*) (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005b; KRIVOROTOVA et al., 2016; BALCIUNAS et al., 2013).

A nisina comumente usada é sintetizada pela bactéria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e sua cadeia polipeptídica é constituída por 34 resíduos de aminoácidos, tendo massa molecular de 3,5 kDa (Figura 2) e amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas. Geralmente, as bactérias gram-negativas não são afetadas pela ação da nisina, a não ser na presença de agente desestabilizador da membrana externa, como o EDTA (PRUDÊNCIO; VANETTI; PRIETO, 2015) ou agentes físicos como temperatura (GALVÃO; PRUDÊNCIO; VANETTI, 2015). É conhecido um total de seis variantes de nisina, entretanto as variantes A e Z são as mais estudadas, sendo que a diferença entre as duas variantes é o aminoácido 27, His27ASN, da cadeia peptídica (LIANG et al., 2010; BALCIUNAS et al., 2013; KHAN; OH, 2015; PRUDÊNCIO; VANETTI; PRIETO, 2015).

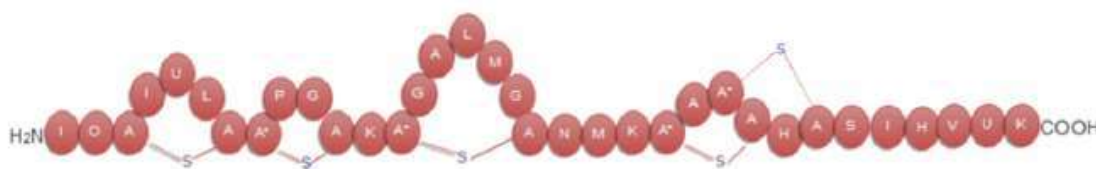


Figura 2. Representação esquemática de uma molécula de nisina com seus 34 resíduos de aminoácidos e os cinco anéis cíclicos de lantionina. Fonte: KHAN (2015).

Segundo Klaenhammer (1993), a nisina é classificada como uma bacteriocina da Classe I, também denominada de lantibióticos. A classe I é composta por pequenos peptídeos que apresentam de 19 a 38 resíduos de aminoácidos e massa molecular menor do que 5 kDa, contêm em sua estrutura, aminoácidos raros, que são modificados pós-tradução, como a lantionina e β -metil lantionina e os aminoácidos insaturados deidroalanina e deidrobutilina. Apresenta estabilidade em pH 2,0 e pode ser estocada por longos períodos em temperatura entre 2 °C e 7 °C. Entretanto, quando em pH 7,0 é facilmente

inativada a temperatura ambiente (BREUKINK; DE KRUIJFF, 1999; PRUDÊNCIO et al., 2016; WORAPRAYOTE et al., 2016).

Nisina apresenta estabilidade térmica quando submetida a procedimentos de autoclavagem, sob temperatura de 121 °C, sem alterações na estrutura (JOZALA et al., 2007). A temperatura e o pH são fatores que influenciam a atividade, estabilidade e solubilidade da nisina, sendo que, quanto menor o pH, maior a solubilidade da bacteriocina. Nisina é praticamente insolúvel em condições de pH neutro ou alcalino (PENNA et al., 2006).

A molécula de nisina é carregada positivamente, sendo assim, um peptídeo catiônico. Desta forma, ela tem preferência por se ligar a paredes celulares de bactérias que contenham altos teores de lipídeos aniônicos que conferem cargas negativas, característica das bactérias gram-positivas. Além disso, nisina apresenta características anfipáticas, sendo a metade N-terminal mais hidrofóbica do que a metade C-terminal (BREUKINK; DE KRUIJFF, 1999).

Nisina se liga ao lipídeo II nas membranas citoplasmáticas das bactérias gram-positivas por meio de ligações de hidrogênio entre os grupamentos amida dos dois anéis N terminais da molécula da bacteriocina com a fração de pirofostato presente no lipídeo II. Em seguida, ocorre a inserção da nisina na fase lipídica da membrana celular das bactérias. Outras sete moléculas de nisina são recrutadas, formando um complexo com um total de oito moléculas da bacteriocina e quatro moléculas de lipídeo II (Figura 3), que resultará na formação de poros na membrana. Isto provocará o efluxo de íons vitais e a dissipação da força próton motora da bactéria, resultando na morte celular (BREUKINK; DE KRUIJFF, 1999, 2006; CLEVELAND et al., 2001; ZACHAROF; LOVITT, 2012; BALCIUNAS et al., 2013).

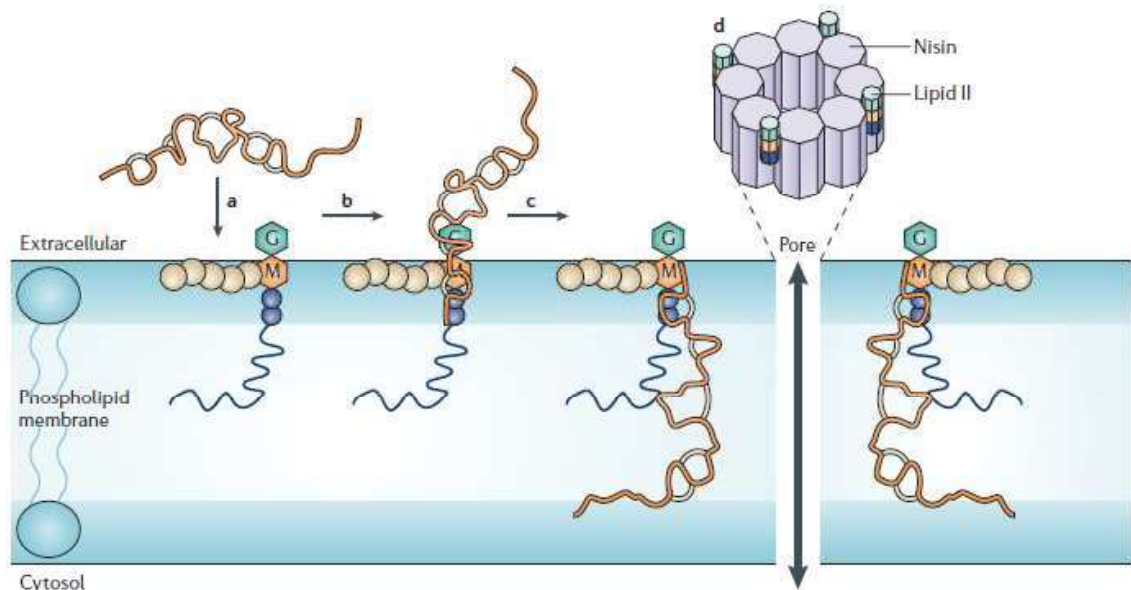


Figura 3: Modelo de formação de poros por nisin na membrana citoplasmática de bactérias gram-positivas. Primeiro nisin atinge a membrana plasmática bacteriana (a) onde se liga ao lipídeo II por meio de seus dois anéis N terminais (b). Em seguida, há a formação de poros (c), que envolve a orientação transmembrana estável da nisin. Outras sete moléculas de nisin são recrutadas para formar o complexo do poro. Fonte: BREUKINK; DE KRUIJFF (2006).

A busca por estratégias que permitam utilizar nisin no controle de bactérias gram-negativas é frequente. Estas estratégias envolvem a associação de nisin com outras substâncias ou com novas tecnologias, atuando de forma sinérgica, a fim de potencializar as ações bactericida e bacteriostática deste peptídeo (GALVÃO et al., 2015; KHAN; OH, 2015; PRUDÊNCIO; VANETTI; PRIETO, 2015; PRUDÊNCIO et al., 2016; CHIKINDAS et al., 2018). A sensibilidade dos micro-organismos gram-negativos à nisin pode ser alterada por fatores ambientais como variações na temperatura e pH e alteração na estrutura e composição da camada de lipopolissacarídeos (LPS), o que torna as células susceptíveis à ação de nisin por alterar a fluidez e permeabilidade da membrana externa (PRUDÊNCIO et al., 2016). Galvão, Prudêncio e Vanetti (2015) demonstraram que temperaturas alta de 55 °C e baixa de -26 °C, associadas à nisin (500 AU/mL) foram capazes de reduzir a população de *Salmonella*, um patógeno gram-negativo, em quatro e 3,5 ciclos logarítmicos, respectivamente. A ação combinada de nisin e ultrassom, avaliada por Freitas (2017), foi capaz de causar a redução de cinco ciclos logarítmicos na população

de *Shigella flexneri*, também gram-negativo, demonstrando que os dois fatores associados são eficientes para inativação e controle do crescimento do micro-organismo.

Outros estudos têm relatado o efeito sinérgico de nisina combinada com antimicrobianos. Mirhosseini e Afzali (2016) associaram o uso de nanopartículas de óxido de magnésio (MgO), um óxido metálico inorgânico não-tóxico, com considerável potencial antimicrobiano, com nisina e observaram que esses fatores combinados tiveram efeito letal contra *Escherichia coli* em leite. Esses autores sugeriram que a aplicação de nanopartículas de MgO combinada com nisina e temperatura moderada pode ser alternativa em substituição aos tratamentos térmicos comumente utilizados pela indústria por causarem alterações sensoriais mínimas no produto.

Considerando que as informações sobre o efeito da nisina sobre bactérias gram-negativas, o presente estudo objetiva avaliar o efeito inibitório de nisina sobre enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas por *P. fluorescens*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Industrial – MIND e no Laboratório de Genética Molecular de Bactérias do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária/BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

3.1. Isolados bacterianos

Três isolados de *P. fluorescens*, denominados de L211, L213 e L214, provenientes de leite cru foram utilizados neste estudo (MACHADO et al., 2015). Em estudos prévios, estes isolados foram selecionados por apresentarem alta atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato (dados não mostrados). Os estoques das suspensões de células correspondentes aos isolados analisados foi realizado em glicerol (20% v/v) e armazenados à -80 °C. Os três isolados foram ativados a 25 °C (a partir dos estoques) por 24 h em 10 mL de leite integral reconstituído (10% p/v) esterilizado.

3.2. Preparo e atividade de nisina

A solução estoque de nisina (Nisaplin®, 2,5% p/p, lote 4262437142, Danisco, Copenhagen, Dinamarca) foi preparada diluindo o produto em pó em tampão fosfato de sódio (5 mM, pH 2,0). *Lactococcus lactis* ATCC19435 foi utilizada para determinar a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em

ágar (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976) e a quantificação da atividade antimicrobiana foi realizada método de difusão crítica (HOOVER; HARLANDER, 1993) e a concentração expressa em unidades arbitrárias (AU/mL).

3.3. Condição de cultivo

Uma alíquota de 1,5 mL da cultura ativada em leite integral reconstituído (10% p/v) foi transferida para microtubos e centrifugada a 10.000 *g* por 10 min. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspendidas em 1,0 mL de solução salina 0,85 % (p/v) e centrifugado nas condições descritas anteriormente. Esse procedimento foi realizado por duas vezes. A partir da suspensão obtidas foram realizadas duas diluições seriadas (1:10 e 1:100). Uma alíquota de 0,1 mL da diluição 1:100 foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 6,78 mL de leite integral reconstituído (10% p/v) e 3,12 mL de nisina (400 AU). O tratamento controle foi feito substituindo-se a nisina por tampão fosfato (5 mM, pH 2,0).

As amostras foram incubadas a 25 °C e, nos tempos 0 h, 24 h e 48 h, foram realizados plaqueamentos, pela técnica de microgotas para determinar o número de células viáveis (UFC/mL). Além disto, nestes tempos foram coletadas alíquotas de 0,5 mL para a determinação da atividade proteolítica e lipolítica dos isolados investigados.

A alíquota de 0,5 mL destinada à atividade proteolítica foi centrifugada a 10.000 *g* por 10 min e o sobrenadante livre de células foi transferido para microtubos e armazenados à -20 °C, para posterior análise. A massa celular foi suspendida em solução salina 0,85% e submetido à lise mecânica, conforme item 3.6.

A alíquota coletada para atividade lipolítica foi imediatamente analisada, conforme item 3.5. Após as análises, a alíquota restante foi centrifugada a 10.000 *g* por 10 min. O sobrenadante foi descartado e a massa celular foi suspendida em solução salina 0,85% e submetido à lise mecânica, conforme item 3.6.

A concentração de proteínas foi determinada conforme Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (Sigma, St. Louis, USA) como padrão. Os experimentos foram realizados em, no mínimo, três repetições e em duplicata, em cada repetição.

3.4. Atividade proteolítica extracelular

3.4.1. Quantificação da atividade proteolítica extracelular

A atividade proteolítica extracelular foi quantificada no sobrenadante utilizando azocaseína (Sigma, St. Louis, EUA) como substrato, conforme descrito por Dufour et al. (2008), com modificações. A solução estoque de azocaseína 2% (p/v) foi preparada diluindo-se o substrato em solução de Tris-HCL 100 mM, pH 8,0.

Uma alíquota de 250 µL da solução de azocaseína 2% (p/v) foi adicionada em 50 µL do sobrenadante livre de células. A mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C por 30 min e a reação foi interrompida adicionando-se 600 µL de ácido tricloroacético 20% v/v (TCA) (Sigma, St. Louis, EUA).

Em seguida, a amostra foi centrifugada por 10 min a 10.000 g e a absorbância a 366 nm foi determinada em leitor de ELISA Multiskan™ Go Microplate Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Hudson, EUA). O branco foi feito utilizando 50 µL das amostras do tempo 0 h, adicionado de 250 µL de azocaseína 2% (p/v) e 600 µL de TCA 20%. O experimento foi realizado em, no mínimo, três repetições e em duplicata em cada repetição.

3.4.2. Zimografia para avaliação da atividade proteolítica

Os sobrenadantes livres de células de cada cultura dos isolados de *P. fluorescens* foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida suplementado com azocaseína 0,2% (p/v), conforme descrito por Christensen e colaboradores (2003) com o objetivo de visualizar, em gel, a atividade proteolítica e estimar a massa molecular das enzimas secretadas por cada isolado investigado.

Foram preparados géis de concentração 5% de acrilamida e géis de separação 12% de acrilamida suplementado com azocaseína 0,2% (p/v). Após a polimerização, o sistema foi montado em cuba apropriada preenchida com tampão de corrida Tris-glicina 1X pH 8,8 (CHRISTENSEN et al., 2003).

As amostras consistiram de 15 µL dos sobrenadantes livres de células e 15 µL de tampão de amostra 4X. As amostras foram fervidas a 100 °C por 10 min e aplicadas nos géis. Em uma canaleta dos géis, foi aplicado 5 µL do

marcador *SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard* (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A reação de eletroforese foi conduzida a 60 V por 20 min para empilhamento das enzimas e 80 V por 2 h e 30 min para separação das fases proteicas.

Após a eletroforese os géis foram lavados por duas vezes em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 e em seguida, foi adicionado 25 % (v/v) de isopropanol por 15 min, em temperatura ambiente, para renaturação das proteínas. Posteriormente, os géis foram lavados com Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Em seguida, os géis foram incubados por 12 h a 4 °C em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 (CHRISTENSEN et al., 2003).

Após a renaturação, os géis foram incubados em CaCl₂ 5 mM e Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 a 40 °C durante 6 h. Logo após, os géis foram lavados em solução de NaOH 1 M por 5 min e a atividade proteolítica foi detectada como zonas claras sob o fundo laranja (CHRISTENSEN et al., 2003).

A partir da revelação dos géis foram capturadas imagens dos mesmos e estas foram submetidas à análise utilizando o *software* ImageJ, do *National Institutes of Health* (NIH). O ImageJ gerou histogramas, calculando a distribuição das intensidades de cinza presentes na figura. Desta forma, nos histogramas gerados, foi possível observar picos referentes às bandas correspondentes à atividade da protease sobre o substrato adicionado no gel (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). O experimento foi realizado em três repetições biológicas e duas repetições técnicas.

3.5. Atividade lipolítica extracelular

3.5.1. Quantificação da atividade lipolítica extracelular

Para quantificar a atividade lipolítica no sobrenadante livre de células, *p*-Nitrofenil palmitato (*p*-NPP; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi utilizado como substrato, conforme Martins et al. (2015). Para o preparo da solução de substrato duas soluções, A e B, foram misturadas, sendo uma parte da solução A, constituída de *p*-NPP 0,3% (m/v) diluído em 2-propanol e nove partes da solução B, constituída de desoxicolado de sódio 0,2% (m/v) e goma arábica 0,1% (m/v) em tampão fosfato dissolvidos em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 8,0 (MARTINS et al., 2015);

Foi feita uma mistura de 1000 µL do sobrenadante livre de células com 1000 µL da solução de substrato. Aliquotas de 100 µL desta mistura foram incubadas por 1 h a 25 °C e a reação enzimática foi terminada por adição de 0,5 mL de 1 M de Na₂CO₃. Em seguida, foi determinada a absorbância a 410 nm em leitor de ELISA Multiskan™ Go Microplate Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Hudson, EUA). O experimento foi realizado em, no mínimo, três repetições e em duplicata em cada repetição.

A curva padrão foi obtida usando concentrações de 0,1 a 3,5 mM de *p*-NPP, em substituição ao extrato livre de células, e a reação foi conduzida conforme descrito anteriormente.

3.5.2. Zimografia para avaliação da atividade lipolítica

Os sobrenadantes livres de células de cada isolado de *P. fluorescens* foram submetidos à eletroforese em condições desnaturantes com o objetivo de visualizar, em gel, a atividade de enzimas lipolíticas e estimar seus tamanhos.

Géis de separação 12% e géis de concentração 5% foram preparados e polimerizados quimicamente pela adição de 0,025% (v/v) de tetrametileno diamina (TEMED) e 0,05% (p/v) de persulfato de amônio. Após a polimerização, a eletroforese foi realizada utilizando tampão de corrida Tris-Glicina 1X pH 8,8 (LAEMMLI, 1970) .

Aliquotas de 15 µL dos sobrenadantes livres de células e 15 µL de tampão de amostra 4X foram transferidas para microtubos de 0,5 mL. As amostras foram fervidas a 100 °C por 10 min e aplicadas nos géis. Foi aplicado 5 µL do marcador (BioRad, Hercules, EUA). A reação de eletroforese foi conduzida a 60 V por 20 min para empilhamento das enzimas e 80 V por 2 h e 30 min para separação das fases proteicas.

Os géis foram submetidos à etapa de renaturação, conforme descrito no item 3.8. Após a etapa de renaturação, os géis foram cobertos com o substrato fluorescente metilumbeliferil-butirato de etila (0,01 M em dimetil formamida), para detecção da atividade lipolítica utilizando luz ultravioleta com comprimento de onda de 365 nm para visualização de bandas fluorescentes, conforme Dufour et al. (2008).

Imagens dos géis foram capturadas e submetidas à análise pelo

software ImageJ, gerando histogramas para detecção de picos referentes às bandas correspondentes à atividade da protease sobre o substrato adicionado no gel (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

O experimento foi realizado em, no mínimo, três repetições e em duplicata em cada repetição.

3.6. Quantificação da atividade proteolítica e lipolítica intracelular

Para determinar as atividades proteolítica e lipolítica intracelular dos isolados de *P. fluorescens* cultivados na presença e na ausência de nisina, alíquotas de 1 mL de leite integral reconstituído a 10% e inoculadas com *P. fluorescens* foram coletadas nos tempos 0 h, 24 h e 48 h, transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas a 10.000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células coletadas foram lavadas duas vezes com solução salina 0,85% e centrifugadas a 10.000 g por 10 min. Em seguida, as células foram ressuspensas em solução salina 0,85 % e as amostras foram transferidas para microtubos *Lysing Matrix B tubes* (MP Biomedicals, Santa Ana, EUA) contendo esferas de sílica de 0,1 mm. As amostras foram submetidas a agitação em vórtex por 30 s para rompimento das células e, em seguida, foram novamente centrifugadas a 10.000 g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e utilizado para quantificação das atividades proteolítica e lipolítica, conforme item 3.4.1 e 3.5.1.

O experimento foi realizado em, no mínimo, três repetições e em duplicata em cada repetição.

3.7. Quantificação da atividade proteolítica no sobrenadante livre de células a adicionado de nisina

Os três isolados de *P. fluorescens* foram cultivados em leite integral reconstituído 10% (p/v), sem a adição de nisina, por até 48 h e, nos tempos 0 h, 24 h e 48 h foram coletadas alíquotas para análise. Nisina, na concentração de 400 AU/mL foi adicionada nas amostras e a quantificação espectrofotométrica para determinação das atividades proteolíticas foi feita, conforme descrito no item 3.4.1.

3.8. Quantificação da atividade lipolítica de *P. fluorescens* cultivada na ausência de nisina

P. fluorescens L211, L213 e L214 foram cultivadas em leite integral reconstituído 10% (p/v) e, nos tempos 0 h, 24 h e 48 h foram coletadas alíquotas para análise, e em seguida foi adicionada nisina (400 AU/mL) nas amostras e a quantificação espectrofotométrica foi feita, conforme descrito no item 3.5.1.

3.9. Extração e purificação de RNA total

Os isolados de *P. fluorescens* L211, L213 e L214 foram cultivados conforme item 3.3 por até 48 h e alíquotas de 1 mL foram coletadas nos tempos 0 h, 24 h e 48 h. Estas alíquotas foram centrifugadas a 10.000 *g* por 15 min a 6 °C e os sobrenadantes, juntamente com a gordura do leite, foram descartados. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em solução de PBS (pH 7,2) EDTA 0,5 mM preparados com água padrão biologia molecular tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1%. Em seguida as células foram ressuspensas em 500 µL de PBS-EDTA e centrifugadas a 10.000 *g* por 10 min a 6 °C (MURA et al., 2013).

As células foram ressuspensas em 1 mL de QIAzol *Lisys Reagent* (Qiagen, Maryland, EUA), agitadas por 30 s em vórtex e centrifugadas a 12.000 *g* por 10 min. As fases de coloração rosa clara foram coletadas e transferidas para novos tubos e novamente foram agitadas por 30 s em vórtex. Em seguida, as amostras ficaram em repouso por 5 min à temperatura ambiente para lise das células. Foram adicionados 300 µL de clorofórmio gelado, seguido de agitação vigorosa por 15 s e foram deixadas em repouso por 2 min à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 *g* por 15 min sob temperatura de 4 °C para separação das fases hidrofílicas e hidrofóbicas.

As fases hidrofílicas, contendo o RNA, foram transferidas para microtubos de 1,5 mL onde foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado e homogeneizado para mistura completa do reagente. As amostras foram incubadas por 10 min à temperatura ambiente para precipitação do RNA e centrifugadas a 12.000 *g*, por 10 min 4 °C. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 75% (v/v) gelado foi adicionado ao microtubo, seguido de homogeneização em vórtex e centrifugação a 7.500 *g*, por 10 min a 4 °C. O

sobrenadante foi descartado e o RNA precipitado foi deixado secar ao ar para evaporação do etanol. Posteriormente, o RNA extraído foi ressuspenso em 30 µL de água Milli-Q® - DEPC. A concentração de RNA total foi estimada por leitura em espectrofotômetro Nanodrop™ 2000C Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Hudson, EUA) a 230 nm, 260 nm e 280 nm para cálculo das razões. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese aplicando 1 µL da amostra de RNA extraído em gel de agarose 0,8% (p/v). A eliminação do DNA contaminante na amostra foi feita por tratamento com RQ1 DNase livre de RNase (Promega Madison, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O experimento foi realizado em, no mínimo, três repetições.

3.10. Análise estatística

O teste t foi usado para verificar a existência de diferença estatística entre o tratamento com nisina e o grupo controle na análise crescimento microbiano e das atividades enzimáticas. O nível de significância adotado foi de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito de nisina sobre o crescimento de *P. fluorescens*

Pseudomonas fluorescens cresceu em leite integral reconstituído a 10% na presença de 400 AU/mL de nisina, sob temperatura de 25 °C e não foi observado efeito inibitório desta bacteriocina ($p>0,05$) sobre o crescimento dos três isolados nas condições estudadas (Figura 4). A ausência de efeito inibidor de nisina sobre *P. fluorescens* é em razão de tratar-se de bactéria gram-negativa, com presença da membrana externa que atua como barreira e bloqueia a passagem das moléculas de nisina, impedindo-as de atingirem à membrana citoplasmática (BREUKINK; DE KRUIJFF, 2006; VUKOMANOVIĆ et al., 2017).

A resistência de bactérias gram-negativas à nisina é registrada na literatura. Prudêncio et al. (2015) demonstraram que 200 AU/mL de nisina, adicionada em caldo BHI, não afetou o crescimento de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium cultivada em temperatura de 37 °C. Resultado similar foi encontrado por Felipe (2016) ao verificar que nisina, na concentração de 200 AU/mL, não apresentou efeito sobre o crescimento de diferentes isolados de *Serratia liquefaciens* cultivadas em meio BHI sob temperatura de 30 °C. Freitas (2017) também observou que nisina não foi capaz de inibir o crescimento de *S. flexneri* cultivada em caldo BHI a 37 °C. A passagem da nisina pela membrana externa de bactérias gram-negativas é fundamental para sua atividade antibacteriana (BOZIARIS; ADAMS, 1999; HELANDER; MATTILA-SANDHOLM, 2000).

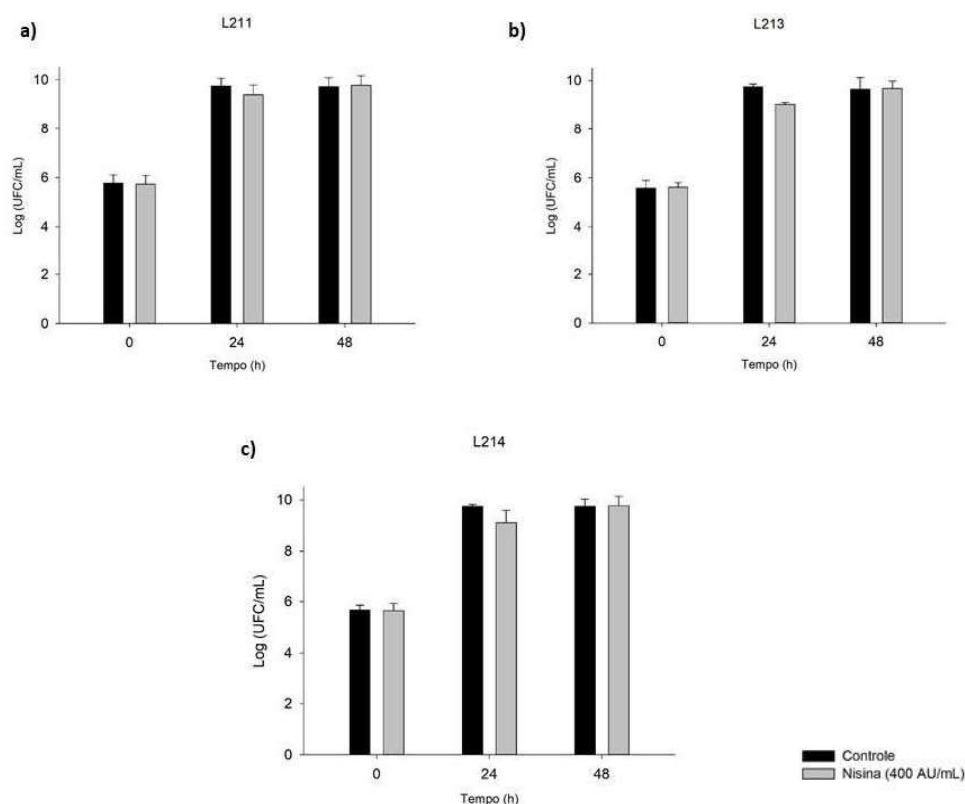


Figura 4: Efeito de nisina sobre o crescimento de *P. fluorescens* L211 (a), L213 (b) e L214 (c) cultivadas em leite integral reconstituído a 10% (p/v) na presença e na ausência de nisina nos tempos 0, 24 e 48 h. A população inicial foi de, aproximadamente, 10^6 UFC/mL. O controle (■) foi feito adicionado tampão fosfato (5 mM, pH 2,0) ao leite. Nisina (□) foi adicionada na concentração de 400 AU/mL. Como observado no gráfico, nisina não apresentou efeito sobre o crescimento dos isolados de *P. fluorescens* ($p > 0,05$).

4.2. Efeito de nisina sobre a atividade proteolítica no sobrenadante livre de células de *P. fluorescens*

Embora não seja capaz de afetar o crescimento vegetativo de *P. fluorescens* em leite integral reconstituído a 10%, a presença de nisina reduziu a atividade proteolítica deste deteriorador (Figura 5). O percentual de inibição da atividade proteolítica de *P. fluorescens* L211 foi de cerca de 78% ($p < 0,05$) em 24 h e de, aproximadamente, 60% ($p < 0,05$) no tempo de 48 h de incubação (Figura 5a). Além disso, os resultados demonstram que *P. fluorescens* L211 foi o isolado mais proteolítico entre os três avaliados. Em 24 h, a atividade proteolítica dos isolados L213 e L214 foi inibida em cerca de 90 e 92% ($p < 0,05$), respectivamente, e em 48 h, a inibição foi em torno de 60 e 58% ($p < 0,05$), respectivamente (Figura 5b e 5c).

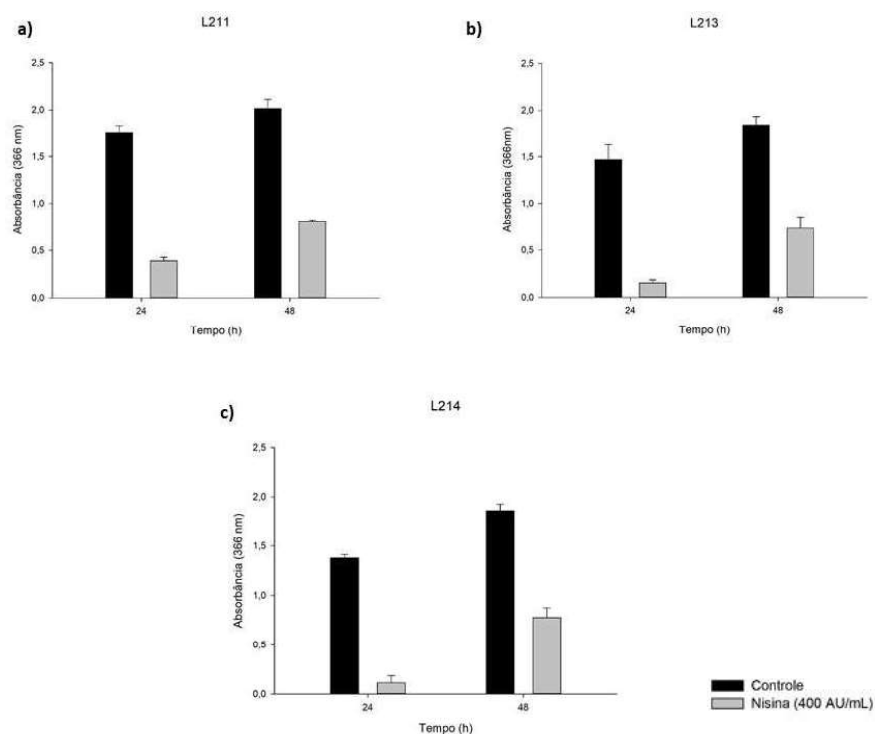


Figura 5: Efeito da nisina sobre a atividade proteolítica de *P. fluorescens* L211 (a), L213 (b) e L214 (c) utilizando azocaseína como substrato por leitura de absorbância a 366 nm. As barras escuras (■ - Controle) representam a atividade proteolítica dos isolados na ausência de nisina nos tempos de 24 h e 48 h de incubação. Na presença de nisina (■) em concentração de 400 AU/mL, em 24 h de incubação a 25 °C, o percentual de inibição atividade proteolítica de *P. fluorescens* L 211, L213 e L214 foi de em torno de 78%, 90% e 92%, respectivamente ($p < 0,05$), quando comparado com o grupo controle (■), em que nisina foi feita substituída por tampão fosfato (5 mM, pH 2,0). Em 48 h, o percentual de inibição da atividade proteolítica dos isolados L211 e L213 foi de aproximadamente 60%, enquanto o isolado L214 teve sua atividade proteolítica inibida em aproximadamente 58%.

A menor atividade das proteases de *P. fluorescens* na presença de nisina também foi detectada por zimografia (Figura 6). Na ausência de nisina observa-se bandas escuras nos géis nos tempos de incubação de 24 h e 48 h, confirmando o potencial proteolítico destes isolados. Entretanto, a banda verificada no tempo de 24 h do cultivo na presença de nisina demonstra a redução da atividade proteolítica do isolado L211 (Figura 6a). No zimograma, não foram observadas bandas representativas da atividade proteolítica nos sobrenadantes dos isolados L213 e L214 tratados com nisina no período de 24 h de incubação (Figura 6d e 6g).

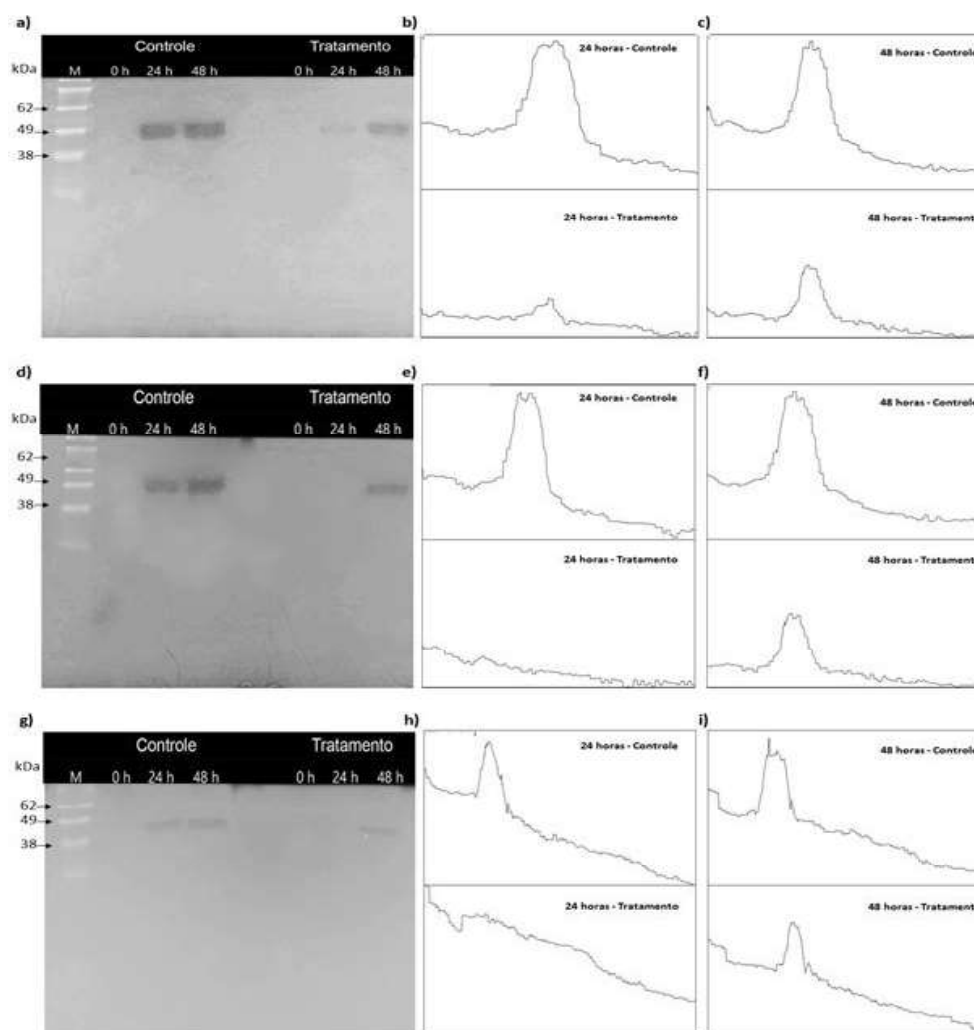


Figura 6: Análise do perfil de proteases produzidas por *P. fluorescens* L211 (a, b e c), L213 (d, e e f) e L214 (g, h e i) a partir de zimografia. Padrões similares foram encontrados para os isolados L213 e L214. Imagem dos histogramas geradas utilizando o *software* ImageJ. a) Zimografia em gel de poliácridamida 12% utilizando azocaseína como substrato para detecção da atividade enzimática. Observa-se a atividade de proteases de *P. fluorescens*, com massa molecular de, aproximadamente, 49 kDa, em leite integral reconstituído a 10% na ausência e na presença de nisina (400 AU/mL). b) Histograma do tempo 24 h da atividade proteolítica de *P. fluorescens* L211 gerado a partir da imagem do zimograma obtido comparando a intensidade das bandas apresentadas no gel entre o controle e o tratamento com nisina. A inibição da atividade proteolítica pode ser observada pela diferença dos picos formados entre o controle e o tratamento e c) Histograma do tempo 48 h da atividade proteolítica de *P. fluorescens* L211 gerado a partir da imagem do zimograma comparando a intensidade das bandas apresentadas no gel entre o controle e o tratamento com nisina. d) Zimografia em gel de poliácridamida 12% de *P. fluorescens* L213. e) Histograma do tempo de 24 h da atividade proteolítica do isolado L213. f) Histograma do tempo de 48 h da atividade proteolítica do isolado L213. g) Zimografia em gel de poliácridamida 12% de *P. fluorescens* L214. h) Histograma do tempo de 24 h da atividade proteolítica do isolado L214. i) Histograma do tempo de 48 h da atividade proteolítica do isolado L214.

Os histogramas gerados permitem observar os picos das bandas correspondentes à atividade da protease sobre a azocaseína adicionada ao gel. As figuras 6b e 6c representam os histogramas referentes à atividade proteolítica do isolado L211 nos tempos de 24 h e 48 h de incubação, respectivamente, no tratamento controle, isto é, na ausência de nisina, e na presença de nisina. A intensidade dos picos no tratamento controle, tanto no tempo 24 h quanto 48 h é maior do que nos tratamentos em que nisina foi adicionada, demonstrando que há inibição da atividade proteolítica de *P. fluorescens* na presença desta bacteriocina. A detecção da atividade proteolítica em 48 h no sobrenadante do cultivo de todos os isolados, confirmam os resultados anteriores de que há redução da atividade inibitória da nisina ao longo do tempo de incubação.

Nos géis é possível observar uma única banda referente à protease, indicando que a AprX é a única enzima detectável secretada pelos isolados de *P. fluorescens*. Alves et al. (2018) demonstraram que *P. fluorescens* 07A secreta uma única protease de, aproximadamente, 50 kDa e que a produção desta enzima é influenciada pela temperatura, sendo a síntese diminuída com a redução da temperatura. Os resultados de Dufour et al. (2008), Mu, Du, e Bai (2009) e Zhang et al. (2009) também demonstraram a síntese e secreção de apenas uma protease por diferentes espécies de *P. fluorescens*. Entretanto, outros autores detectaram que algumas espécies de *P. fluorescens* podem produzir mais de uma protease, demonstrando uma grande diversidade dentro da espécie (NICODÈME et al., 2005; RAJMOHAN; DODD; WAITES, 2002).

A inibição da atividade de enzimas proteolíticas em micro-organismos gram-negativos por nisina foi relatada por Felipe (2016), que observou redução de, aproximadamente, 24% na atividade proteolítica de *S. liquefaciens* na presença de 200 AU/mL nisina ao final de 24 h de incubação sob temperatura de 30 °C.

Foi avaliado ainda, o efeito inibitório de nisina sobre a atividade das proteases de *P. fluorescens* após a secreção destas para o meio externo (Tabela 1). A atividade proteolítica não foi inibida após a adição de nisina ao sobrenadante obtido após o crescimento bacteriano ($p > 0,05$). Este resultado indica que nisina não atua sobre a atividade das proteases após estas terem sido sintetizadas e secretadas, sugerindo que o mecanismo de ação da bacteriocina sobre a atividade proteolítica seja na regulação gênica, na síntese da protease ou na inibição da secreção desta.

Tabela 1: Atividade proteolítica de *P. fluorescens* L211, L213 e L214 avaliada no sobrenadante de cultivo em leite integral reconstituído a 10%, adicionado de 400AU/mL nisina, quantificada utilizando azocaseína como substrato por leitura de absorbância a 366 nm.

Isolado	Absorbância (366 nm)			
	Controle		Tratamento	
	24 h	48 h	24 h	48 h
L211	1,549	1,534	1,615	1,677
L213	1,223	1,335	1,358	1,362
L214	1,467	1,500	1,503	1,553

4.3. Efeito de nisina sobre a atividade proteolítica intracelular de *P. fluorescens*

A atividade proteolítica intracelular foi avaliada utilizando azocaseína como substrato. Entretanto, não foi possível detectar atividade proteolítica no extrato de células pela metodologia utilizada. É possível que a técnica utilizada não seja sensível o suficiente para detectar a atividade em concentrações intracelulares de proteases ou que estas enzimas não se acumulem no interior da célula, sendo secretadas à medida que o micro-organismo as sintetiza.

4.4. Efeito inibitório de nisina sobre a atividade lipolítica de *P. fluorescens*

A atividade lipolítica de *P. fluorescens* foi avaliada na ausência e na presença de nisina. Os resultados obtidos por quantificação espectrofotométrica mostraram que, quando nisina foi adicionada ao leite, o percentual de inibição da lipólise foi de até 100% em um período de 24 h e de 92% durante 48 h.

Conforme observado na figura 7, na presença de nisina, a atividade da lipase secretada por *P. fluorescens* L211 foi inibida em 99,8% ($p < 0,05$) em 24 h (Figura 7a). A medida que o tempo de incubação avança, a inibição da atividade lipolítica reduz para 88,48% ($p < 0,05$) em 48 h (Figura 7a). O isolado L213 teve sua atividade lipolítica completamente inibida em 24 h e, em 48 h, a lipase teve

9 % ($p < 0,05$) de atividade quando comparada à atividade lipolítica na ausência de nisina (Figura 7b). O percentual de atividade lipolítica do isolado *P. fluorescens* L214 foi de, aproximadamente, 3% e 9% durante 24 h e 48 h, respectivamente. L214 foi o isolado com maior atividade lipolítica, detectada em 24 h de incubação, na presença de nisina. Por outro lado, a maior atividade lipolítica no período de 48 h foi detectada no isolado *P. fluorescens* L211.

A atividade lipolítica de *P. fluorescens* também foi avaliada por zimografia. Entretanto, não foi possível detectar a atividade lipolítica no gel contendo metilumbeliferil buritato como substrato.

O efeito inibitório de nisina sobre a atividade das lipases de *P. fluorescens* após a secreção destas (Tabela 2) também foi avaliado. Não houve efeito inibitório de nisina sobre a atividade lipolítica após a adição de nisina no sobrenadante da cultura de *P. fluorescens* ($p > 0,05$). Desta forma, pode-se concluir que, assim como na atividade proteolítica, nisina não atua sobre as lipases após a secreção, sugerindo que o mecanismo de ação da bacteriocina sobre a atividade lipolítica seja também na regulação gênica, na síntese ou na inibição da secreção da lipase.

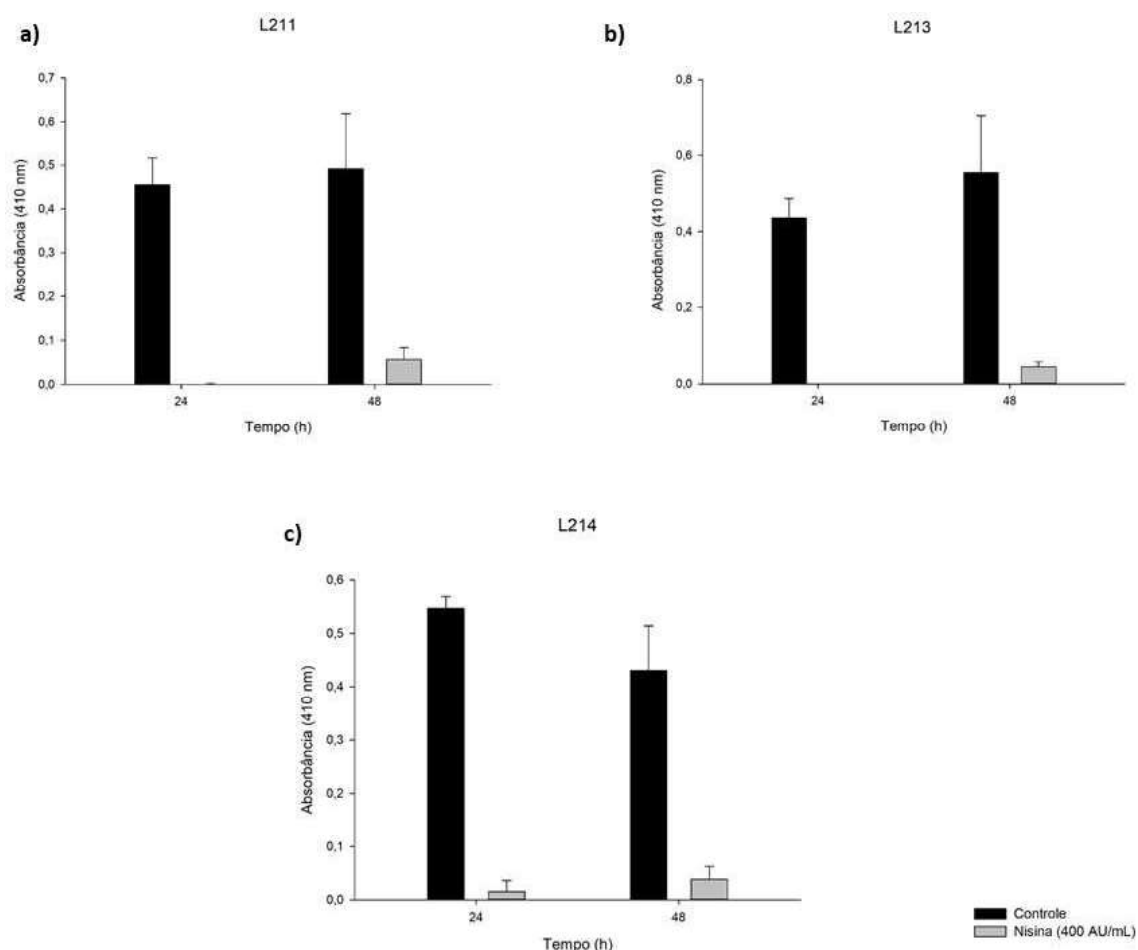


Figura 7: Efeito da nisina sobre a atividade lipolítica de *P. fluorescens* L211 (a), L213 (b) e L214 (c) quantificada utilizando p-Nitrofenil palmitato como substrato por leitura de absorbância a 410 nm. As barras escuras (■ - Controle) representam a atividade lipolítica dos isolados na ausência de nisina por períodos de 24 h e 48 h. Na presença de nisina (■) em concentração de 400 AU/mL, em 24 h de incubação a 25 °C, a atividade lipolítica de *P. fluorescens* L211 e L213 foi totalmente inibida ($p < 0,05$), enquanto o percentual de inibição da atividade lipolítica do isolado L214 de aproximadamente 97% quando comparado com o grupo controle (■), em que nisina foi substituída por tampão fosfato (5 mM, pH 2,0). O percentual de inibição, em 48 h, dos isolados L211, L213 e L214 foi de, aproximadamente, 89, 92 e 91%, respectivamente.

Não foi encontrada na literatura nenhum relato sobre a inibição da atividade de lipases por nisina, o que não permite a comparação destes resultados. Assim, este é o primeiro trabalho que demonstra o potencial de inibição da nisina sobre a atividade lipolítica das enzimas produzidas por *P. fluorescens*.

Tabela 2: Atividade lipolítica de *P. fluorescens* L211, L213 e L214 após a secreção das enzimas para o meio externo, avaliada logo depois da adição de 400 AU/mL nisina na amostra de leite integral reconstituído a 10%, quantificada utilizando azocaseína como substrato por leitura de absorbância a 410 nm.

Isolado	Absorbância (410 nm)			
	Controle		Tratamento	
	24 h	48 h	24 h	48 h
L211	1,411	1,484	1,551	1,538
L213	1,342	1,356	1,418	1,435
L214	1,337	1,315	1,344	1,383

4.5. Efeito de nisina sobre a atividade lipolítica intracelular de *P. fluorescens*

A atividade lipolítica intracelular foi avaliada utilizando *p*-Nitrofenil palmitato como substrato para a atividade das lipases. Entretanto, não foi possível detectar diferença de atividade lipolítica no extrato intracelular obtido de *P. fluorescens* cultivada na presença e na ausência de nisina pela metodologia utilizada (dados não mostrados).

4.6. Extração de RNA de *P. fluorescens* na ausência e na presença de nisina

A obtenção das amostras de RNA total purificadas a partir das culturas de *P. fluorescens* cultivadas em leite, na presença e na ausência de nisina, foi realizada com sucesso, mesmo o leite sendo considerado uma amostra complexa por conter vários interferentes, como íons e gordura, que podem dificultar a extração do material genético das culturas.

As extrações de RNAs dos três isolados de *P. fluorescens* nos tempos 0 h, 24 h e 48 h de incubação foram realizadas em triplicata. As concentrações de RNA, quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop, variaram de acordo com o tempo de incubação, sendo as menores concentrações obtidas nos tempos 0 h, tanto no controle, na ausência de nisina, quanto no tratamento na presença de nisina. Baixas concentrações de RNA foram detectadas em Nanodrop mas, não

foram detectadas quando 1 μ L da amostra foi aplicada em gel de agarose (Figura 8) na concentração de 0,8 % (p/v), para avaliar a integridade do material extraído.

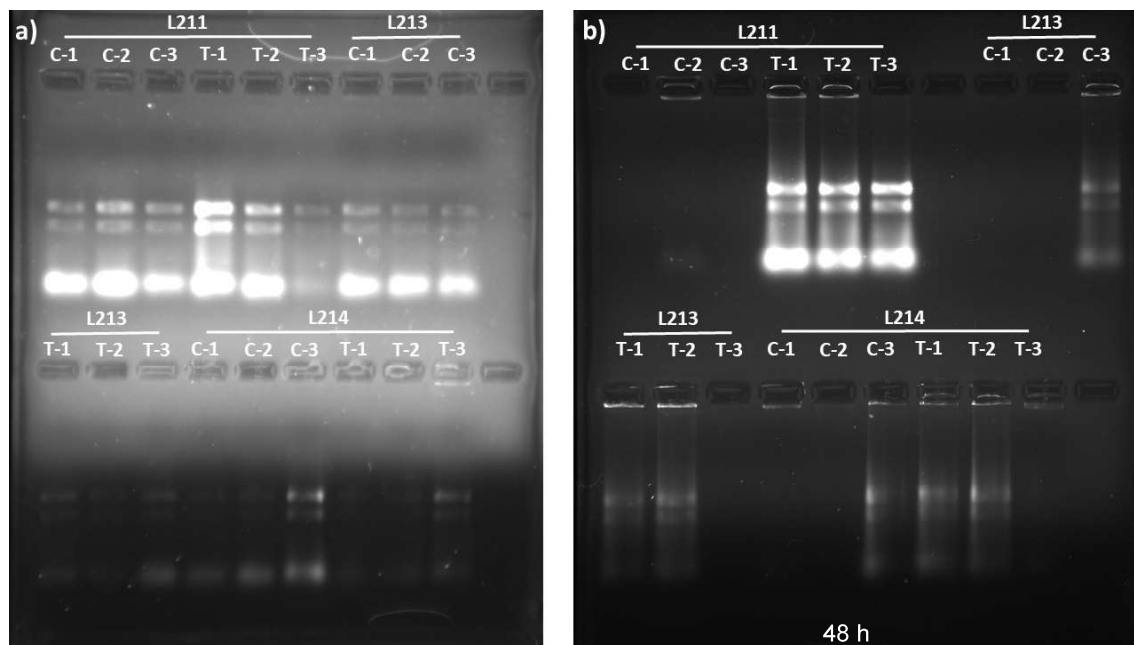


Figura 8: Amostras de RNA total obtidas a partir do crescimento de *P. fluorescens* L211, L213 e L214 em..... visualizados em gel de agarose 0,8 % (p/v). As amostras controle, de RNA extraído de *P. fluorescens* cultivada na ausência de nisina, estão representadas pela letra c. As amostras do tratamento, referente ao RNA extraído de *P. fluorescens* cultivada na presença de 400 AU/mL nisina, estão representados pela letra T. a) Amostras de RNA extraídas no tempo 24 h. b) Amostras de RNA extraídas no tempo 48 h.

Estas amostras de RNA obtidas serão posteriormente usadas para investigar por qRT-PCR o efeito do tratamento com nisina sobre a transcrição dos genes que codificam a protease *AprX*, o gene *lipA* que codifica lipase e os genes do sistema de transporte ABC: *aprD*, *aprE* e *aprF*, dos isolados de *P. fluorescens*.

É possível que nisina possa agir alterando a expressão gênica de *P. fluorescens*. Dados apresentados por Brogden (2005) indicaram que diferentes peptídeos catiônicos, além de serem capazes de interagir com a membrana citoplasmática dos micro-organismos e formar poros levando a célula à morte, podem atravessar a membrana e regular a expressão gênica, inibindo a replicação, a transcrição do DNA, a tradução do RNA e a síntese proteica e,

também, inibir a atividade enzimática. A ação da nisina como regulador da expressão gênica foi considerada por Zhao et al. (2016), que mostraram que esta bacteriocina foi capaz de controlar a expressão de 601 genes em *Staphylococcus aureus* inibindo ou induzindo a expressão destes. Dentre estes, estão genes relacionados à síntese de parede celular, formação de biofilmes, metabolismo de nucleotídeos e proteínas relacionadas ao sistema de transporte tipo ABC. Estas constatações podem sugerir que nisina seja capaz de atuar como reguladora da expressão gênica em outros micro-organismos e podem ser evidências de que esta bacteriocina possa inibir, em algum momento, a expressão de genes relacionados à atividade enzimática de *P. fluorescens*.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se sugerir também outros mecanismos de ação da nisina sobre *P. fluorescens*. Como a membrana externa de *P. fluorescens* atua como bloqueio a passagem de nisina e a impede de chegar ao seu sítio alvo na membrana citoplasmática, é provável que a bacteriocina não atravesse a membrana externa e não consiga alcançar o interior da célula. Se esta premissa for verdadeira, sugere-se que ocorra interação de nisina com proteínas da membrana externa que atuem no mecanismo de transporte de enzimas do citoplasma da célula para o ambiente externo. Desta forma, nisina poderia reduzir a secreção das enzimas avaliadas neste estudo. Outra hipótese para explicar a ação de nisina sobre a atividade enzimática em *P. fluorescens* seria o reconhecimento da bacteriocina por proteínas receptoras presente na membrana externa que desencadeariam uma série de reações que levariam ao controle da expressão gênica em nível de transcrição ou tradução do material genético. Além disso, pode-se hipotetizar que pequena quantidade de nisina consigam atravessar a barreira da membrana externa, ser internalizada e agir como reguladora transcricional ou inibidora da síntese proteica.

5. CONCLUSÃO

Nisina não apresentou efeito sobre o crescimento de *P. fluorescens* nas condições testadas, confirmando que esta bacteriocina não é efetiva sobre micro-organismos gram-negativos. Entretanto, as atividades proteolíticas e lipolíticas de *P. fluorescens* foram inibidas pela presença de nisina e este é o primeiro relato sobre o efeito inibitório de nisina em *P. fluorescens*. Após serem secretadas, a atividade hidrolítica das protease e lipase de *P. fluorescens* não foram afetadas por nisina.

O mecanismo utilizado por nisina para inibir a atividade enzimática não está esclarecido e são necessários mais estudos para entender como a bacteriocina inibe as atividade proteolíticas e lipolíticas em *P. fluorescens*. A extração de RNA total foi realizada e, com material coletado, será possível verificar se a nisina é capaz de interferir na transcrição dos genes do operon *aprX-lipA*.

Entender o mecanismo de ação de nisina sobre a atividade enzimática pode contribuir para a ampliação do uso da bacteriocina pela indústria. Desta forma, nisina poderá ser utilizada como estratégia inibir a deterioração de alimentos quando esta estiver relacionada com a atividade enzimática.

6. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 6, p. 828–834, 1975.

ALVES, M. P. et al. Temperature modulates the production and activity of a metalloprotease from *Pseudomonas fluorescens* 07A in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 2, p. 992–999, 2018.

ANDERSSON, R. E. Microbial lipolysis at low temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 36–40, 1980.

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.

BAGLINIÈRE, F. et al. Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilisation. **International Dairy Journal**, v. 31, n. 2, p. 55–61, 2013.

BALCIUNAS, E. M. et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134–142, 2013.

BAUR, C. et al. Isolation and characterisation of a heat-resistant peptidase from *Pseudomonas panacis* withstanding general UHT processes. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 46–55, 2015.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 1–20, 2004.

BOZIARIS, I. S.; ADAMS, M. R. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, n. 2–3, p. 105–113, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Aprovar a extensão de uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12,5 mg/kg. **Diário Oficial**. República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial**. República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 172, 8-13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial**. República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 6-37.

BREUKINK, E.; DE KRUIJFF, B. The lantibiotic nisin, a special case or not? **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1462, n. 1–2, p. 223–234, 1999.

BREUKINK, E.; DE KRUIJFF, B. Lipid II as a target for antibiotics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 4, p. 321–323, 2006.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.

CALDERA, L. et al. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. **Food Microbiology**, v. 54, p. 142–153, 2016.

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, n. 4, p. 255–275, 2003.

CHIKINDAS, M. L. et al. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 23–28, 2018.

CHRISTENSEN, A. B. et al. Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. **Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 471–483, 2003.

CLAEYS, W. L. et al. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 251–262, 2013.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1–20, 2001.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 95–105, 2012.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C. Psychrotrophic microorganisms. In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2013. p. 159-166.

DE JONGHE, V. et al. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 460–470, 2011.

DEETH, H. C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 555–562, 2006.

DUFOUR, D. et al. Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 188–196, 2008.

DUONG, F. et al. The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: A new substrate for the Apr type I secretion system. **Gene**, v. 262, n. 1–2, p. 147–153, 2001.

FELIPE, F. O. **Efeito de nisinha sobre a atividade proteolítica de *Serratia liquefaciens***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2016.

FRAU, F.; FONT DE VALDEZ, G.; PECE, N. Effect of pasteurization temperature, starter culture, and incubation temperature on the physicochemical properties, yield, rheology, and sensory characteristics of spreadable goat cheese. **Journal of Food Processing**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

FREITAS, L. L. **Inativação de *Shigella flexneri* pela associação de nisin e ultrassom**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2017.

GALVÃO, M. F.; PRUDÊNCIO, C. V.; VANETTI, M. C. D. Stress enhances the sensitivity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to bacteriocins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 5, p. 1137–1143, 2015.

GARCÍA-CARREÑO, F. L. Protease inhibition in theory and practice. **Biotechnology Education**, v. 3, n. 4, p. 145–150, 1992.

GARCÍA, P. et al. Food biopreservation: Promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 8, p. 373–382, 2010.

GEROSA, S; SKOET, J. Milk availability: Current production and demand and medium-term outlook. In: MUEHLHOFF, E.; BENNETT, A.; MCMAHON, D. (Ed.). **Milk and Dairy Products in Human nutrition**. Rome, RM: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. p. 404.

HELANDER, I. M.; MATTILA-SANDHOLM, T. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, n. 2–3, p. 153–161, 2000.

HOOVER, D. G.; HARLANDER, S. K. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In: **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. San Diego, CA: Elsevier, 1993. p. 23–39.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Protection of foods with low-temperatures, and characteristics of psychrotrophic microorganisms. In: **Modern Food Microbiology**. 7. ed. Boston, MA: Springer US, 2005. p. 395–413.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Milk, fermentation, and fermented and nonfermented dairy products. In: **Modern Food Microbiology**. Food Science Text Series. 7. ed. Boston, MA: Springer US, 2005. p. 149–173.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Food protection with chemicals, and by biocontrol. In: **Modern Food Microbiology**. 7. ed. Boston: Springer US, 2005. p. 301–343.

JOZALA, A. F. et al. Effect of media on spore yield and thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136–140, p. 515–528, 2007.

KAPAJ, A.; DECI, E. World milk production and socio-economic factors effecting its consumption. In: RONALD ROSS WATSON, ROBERT J. COLLIER, V. R. P. (Ed.). **Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan**. 1 ed. Cambridge, MA: Academic Press, 2017. p. 107–115.

KAWAI, E. et al. The ABC-exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in *Pseudomonas fluorescens* no. 33. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, v. 1446, n. 3, p. 377–382, 1999.

KELLY, A. L.; FOX, P. F. Indigenous enzymes in milk: A synopsis of future research requirements. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 707–715, 2006.

KHAN, I.; OH, D. H. Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 34, p. 376–384, 2015.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1–3, p. 39–85, 1993.

KOKA, R.; WEIMER, B. C. Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 280–288, 2000.

KRIVOROTOVA, T. et al. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. **Food Hydrocolloids**, v. 54, p. 49–56, 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAMARCHE, B. et al. Does milk consumption contribute to cardiometabolic health and overall diet quality? **Canadian Journal of Cardiology**, v. 32, n. 8, p. 1026–1032, 2016.

LAW, B. Y. B. A.; SHARPE, M. E.; CHAPMAN, H. R. The effect of lipolytic Gram-negative psychrotrophs in stored milk on the development of rancidity in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 43 (3), p. 459–468, 1976.

LIANG, X. et al. Adverse effect of nisin resistance protein on nisin-induced expression system in *Lactococcus lactis*. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 458–465, 2010.

LIU, M.; WANG, H.; GRIFFITHS, M. W. Regulation of alkaline metalloprotease promoter by N-acyl homoserine lactone quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2174–2184, 2007.

MA, Q. et al. Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1611, n. 1–2, p. 223–233, 2003.

MACHADO, S. G. et al. *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. M1842–M1849, 2015.

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, n. MAR, p. 1–22, 2017.

MARCHAND, S. et al. Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 514–519, 2008.

MARCHAND, S. et al. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, n. 1–2, p. 68–77, 2009.

MARTINS, M. L. et al. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 2, p. 144–148, 2006.

MARTINS, M. L. et al. Lack of AHL-based quorum sensing in *Pseudomonas fluorescens* isolated from milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 1039–1046, 2014.

MARTINS, M. L. et al. 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. et al. 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.

MCCARTHY, C. N.; WOODS, R. G.; BEACHAM, I. R. Regulation of the *aprX-lipA* operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: Differential regulation of the proximal and distal genes, encoding protease and lipase, by *ompR-envZ*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 241, n. 2, p. 243–248, 2004.

MENG, L. et al. Identification and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different raw milks at storage temperatures. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2897–2905, 2018.

MERIEAU, A. et al. Temperature regulation of lipase secretion by *Pseudomonas fluorescens* strain MFO. **Applied Microbiology and Biotechnology Biotechnology**, v. 39, p. 104–109, 1993.

MIRHOSSEINI, M.; AFZALI, M. Investigation into the antibacterial behavior of suspensions of magnesium oxide nanoparticles in combination with nisin and heat against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in milk. **Food Control**, v. 68, p. 208–215, 2016.

MITCHELL, G. E.; EWINGS, K. N.; BARTLEY, J. P. Physicochemical properties of proteinases from selected psychrotrophic bacteria. **Journal of Dairy Research**, v. 53, n. 1, p. 97–115, 1986.

MOBLEY, A. R.; JENSEN, J. D.; MAULDING, M. K. Attitudes, beliefs, and barriers related to milk consumption in older, low-income women. **Journal of Nutrition Education and Behavior**, v. 46, n. 6, p. 554–559, 2014.

MOORE, E. R. B. et al. Nonmedical: *Pseudomonas*. In: **The Prokaryotes**. New York, NY: Springer New York, 2006. p. 646–703.

MU, Z.; DU, M.; BAI, Y. Purification and properties of a heat-stable enzyme of *Pseudomonas fluorescens* Rm12 from raw milk. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 5, p. 725–734, 2009.

MURA, M. C. et al. Development of a RNA extraction method from milk for gene expression study in the mammary gland of sheep. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 3, p. 2169–2173, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Amino acids, peptides and proteins. In: **Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed.** 6. ed. New York, NY: W.H. Freeman and Company, 2013. p. 75–114.

NICODÈME, M. et al. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: Dependence of proteolytic activity on culture conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 641–648, 2005.

OLIVEIRA, G. B. et al. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 313–321, 2015.

PENNA, T. C. V. et al. Detection of nisin expression by *Lactococcus lactis* using two susceptible bacteria to associate the effects of nisin with EDTA. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129, n. 1–3, p. 334–346, 2006.

PESTANA, J. M. et al. Effects of pasteurization and ultra-high temperature processes on proximate composition and fatty acid profile in bovine milk. **American Journal of Food Technology**, v. 10, n. 6, p. 265–272, 2015.

PINTO, C. L. DE O. et al. 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, 2015.

PINTO, C. L. O. et al. Proteolytic potential of *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated raw milk. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 4, n. 2, p. 16–25, 2014.

POLITIS, I.; BARBANO, D. M.; GOREWIT, R. C. Distribution of plasminogen and plasmin in fractions of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 6, p. 1402–1410, 1992.

PRUDÊNCIO, C. V. et al. Temperature and pH influence the susceptibility of *Salmonella* Typhimurium to nisin combined with EDTA. **Food Control**, v. 61, p. 248–253, 2016.

PRUDÊNCIO, C. V.; VANETTI, M. C. D.; PRIETO, M. Tolerance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to nisin combined with EDTA is accompanied by changes in cellular composition. **Food Research International**, v. 69, p. 281–288, 2015.

RAJMOHAN, S.; DODD, C. E. R.; WAITES, W. M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 2, p. 205–213, 2002.

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.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, 2012.

SEBASTIAN, R. S. et al. Fluid milk consumption in the United States. **Food Surveys Research Group**, n. 3, p. 1–8, 2010.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n. 2, p. 35–41, 1997.

STEAD, D. Production of extracellular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in whole milk. **Journal of Dairy Research**, v. 54, p. 535–543, 1987.

STOECKEL, M. et al. Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: A challenge in the production of ultra-high temperature milk products. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 250–261, 2016.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Review**, v. 40, n. 3, p. 722–756, 1976.

USDA, 2017. Brazil: Dairy and Products Annual. Annual Dairy Report. GAIN Report
Number: BR1719.
https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Dairy%20and%20Products%20Annual_Brasilia_Brazil_10-26-2017.pdf (accessed 20 june 2018).

VON NEUBECK, M. et al. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 57–65, 2015.

VUKOMANOVIĆ, M. et al. Nano-engineering the antimicrobial spectrum of lantibiotics: Activity of nisin against Gram-negative bacteria. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

WHITE, D., DRUMMOND, J., FUQUA, C. Protein transport and secretion. In: **The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes**. 4. ed. New York, NY: Oxford University Press, Inc., 2011. p. 452–481.

WOODS, R. G. et al. The *aprX-lipA* operon of *Pseudomonas fluorescens* B52: A molecular analysis of metalloprotease and lipase production. **Microbiology**, v. 147, n. 2, p. 345–354, 2001.

WORAPRAYOTE, W. et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**, v. 120, p. 118–132, 2016.

XIN, L. et al. The diversity and proteolytic properties of psychrotrophic bacteria in raw cows' milk from North China. **International Dairy Journal**, v. 66, p. 34–41, 2017.

YUAN, L. et al. Psychrotrophic bacterial populations in Chinese raw dairy milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 409–418, 2017.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria A review article. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 50–56, 2012.

ZHANG, C.; BIJL, E.; HETTINGA, K. Destabilization of UHT milk by protease AprX from *Pseudomonas fluorescens* and plasmin. **Food Chemistry**, v. 263, n. April, p. 127–134, 2018.

ZHANG, W. WEI et al. Identification and characterization of a virulence-associated protease from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1–2, p. 183–188, 2009.

ZHAO, X. et al. Analysis of the gene expression profile of *Staphylococcus aureus* treated with nisin. **Food Control**, v. 59, p. 499–506, 2016.