

## Proteases and lipases produced by *Pseudomonas*: a challenge in the dairy industry

## Proteases e lipases produzidas por *Pseudomonas*: um desafio na indústria de lácteos

Article Info:

Article history: Received 2022-10-02 / Accepted 2022-11-10/ Available online 2022-11-10

doi: 10.18540/jcecv18iss9pp14900-01e

**Nayara Aparecida da Silva Costa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1690-9828>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: [nayaraascosta@gmail.com](mailto:nayaraascosta@gmail.com)

**Rafaela da Silva Rodrigues**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5152-8313>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: [rafaelasilva\\_mts@hotmail.com](mailto:rafaelasilva_mts@hotmail.com)

**Antônio Fernandes de Carvalho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3238-936X>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: [antoniofernandes@ufv.br](mailto:antoniofernandes@ufv.br)

**Solimar Gonçalves Machado**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2836-6026>

Universidade Federal de Viçosa, Brasil

E-mail: [solimar.machado@ufv.br](mailto:solimar.machado@ufv.br)

### Resumo

*Pseudomonas* spp. são comumente relacionadas com a deterioração de produtos lácteos. Algumas espécies desse gênero, além de se multiplicarem em temperaturas de refrigeração, produzem enzimas hidrolíticas responsáveis pela deterioração do leite e seus derivados. A metaloprotease AprX é uma das proteases produzidas por *Pseudomonas*. Essa enzima, codificada pelo gene *aprX*, é resistente ao calor e capaz de manter sua atividade mesmo após tratamentos térmicos comumente utilizados na indústria de laticínios, como pasteurização e tratamento UHT (*Ultra-high Temperature*), resultando em perdas das características sensoriais e em problemas como a gelificação. Algumas cepas de *Pseudomonas* também podem produzir enzimas lipolíticas termorresistentes. Essas enzimas catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, resultando na liberação de ácidos graxos associados à deterioração de muitos alimentos. Esses ácidos contribuem para o sabor forte, rançoso e de sabão de produtos lácteos. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi destacar, por meio de uma revisão de literatura, os desafios enfrentados pela indústria de lácteos frente às proteases e lipases produzidas pelo gênero *Pseudomonas*.

**Palavras-chave:** Psicotróficos. Enzimas lipolíticas. Enzimas proteolíticas.

### Abstract

*Pseudomonas* spp. are commonly related to spoilage of dairy products. Some species belonging to this genus, in addition to multiplying at cold temperatures, produce hydrolytic enzymes responsible for dairy products spoilage. The AprX metalloprotease is one of the proteases produced by *Pseudomonas*. This enzyme, encoded by the *aprX* gene, is heat-resistant and able to maintain its activity even after heat treatments commonly used in the dairy industry, such as pasteurization and UHT (*Ultra-high Temperature*) treatment, resulting in loss of sensory characteristics and age

gelation. Some strains of *Pseudomonas* can also produce heat-resistant lipolytic enzymes. These enzymes catalyze the hydrolysis of triacylglycerols, resulting in the release of fatty acids associated with spoilage in many foods. These acids contribute to the strong, rancid, soapy flavor of dairy products. Thus, the objective of this work was to highlight, through a literature review, the challenges faced by the dairy industry against proteases and lipases produced by the genus *Pseudomonas*.

**Keywords:** Psychrotrophs. Lipolytic enzymes. Proteolytic enzymes.

## 1. Introdução

O gênero *Pseudomonas* apresenta uma ampla diversidade de espécies ubíquas gram-negativas e não formadoras de esporos (Papenfort & Bassler, 2016; Raposo et al., 2016). Algumas espécies pertencentes a esse gênero são psicrotróficas e podem ser encontradas em alimentos armazenados aerobicamente com alto teor de água, como carne vermelha, aves e lácteos. Algumas das espécies de *Pseudomonas* mais importantes conhecidas por causar deterioração de alimentos refrigerados são *P. fluorescens*, *P. lundensis*, *P. fragi* e *P. putida* (Caldera et al., 2016; de Oliveira et al., 2015; Raposo et al., 2016; Fernández-Gómez et al., 2021).

No setor de laticínios, visando controlar a multiplicação de microrganismos, a fim de promover a qualidade do leite e conseqüentemente dos produtos lácteos, tornou-se obrigatório o seu resfriamento na unidade produtora. No entanto, isso favorece o crescimento de microrganismos psicrotróficos, visto que sua multiplicação é favorecida em detrimento dos outros microrganismos mesófilos (Pinto et al., 2006). Dentre os microrganismos cultiváveis no leite cru refrigerado, *Pseudomonas* é o que tem exibido maior prevalência (Goulart, 2017) e tem causado inúmeros efeitos negativos em produtos lácteos devido à produção de enzimas hidrolíticas termorresistentes.

As enzimas proteolíticas produzidas por *Pseudomonas* podem resultar em vários problemas tecnológicos para a indústria laticinista, como a instabilidade do leite ao calor, a gelificação do leite UHT, a ocorrência de sabores e odores indesejáveis (Baglinière et al., 2013; Baglinière et al., 2012) e a redução de rendimento na produção de queijo (Narvhus et al., 2021).

Bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* frequentemente isoladas de produtos ou ambientes lácteos também podem apresentar atividade lipolítica (Narvhus et al., 2021). A presença de lipase bacteriana pode afetar a qualidade do leite fluido e seus derivados (Ribeiro Júnior et al., 2018), uma vez que pode causar alterações sensoriais como gosto amargo ou rançoso em queijos (Fairbain & Law, 1986)

Dentro desta perspectiva, este trabalho propõe discutir os problemas causados por *Pseudomonas* spp. na indústria de laticínios relacionados à atividade proteolítica e lipolítica.

## 2. Proteases

Entre as proteases bacterianas, um papel predominante na deterioração dos produtos lácteos parece ser desempenhado pela metaloprotease termoestável AprX, produzida por cepas de *Pseudomonas* (Andreani et al., 2016). Trata-se de uma enzima resistente às condições de aquecimento usadas no processamento UHT, com atividade residual que pode levar ao desenvolvimento de defeitos de qualidade no leite UHT, como aumento de viscosidade, sedimentação, gelificação e gosto amargo. Esses problemas resultam na redução da vida útil do produto (Baglinière et al., 2013).

Apesar da maioria das espécies de *Pseudomonas* produzir a enzima AprX, as propriedades bioquímicas da metaloprotease variam de acordo com a espécie (Zhang et al., 2015). Caldera et al. (2016) examinaram as características fenotípicas e atividades de deterioração enzimática de 66 cepas de *Pseudomonas* e encontraram grandes variações na atividade proteolítica medida em leite UHT.

Em queijos frescos, especialmente em queijo muçarela, a multiplicação de *Pseudomonas* e

outras bactérias comensais psicrotróficas não é neutralizada por nenhum fator inibidor. Conseqüentemente, suas proteases têm um impacto dramático na estrutura e qualidade da proteína desses queijos durante o armazenamento a frio. A perda de caseína resulta no enrugamento da pele da muçarela e no enfraquecimento de sua estrutura, assim o queijo desmorona lentamente sobre si mesmo (Baruzzi et al., 2021).

Atualmente, a detecção de *AprX* é feita, principalmente, pela técnica de detecção do gene codificador, uma vez que a presença do gene *aprX* pode indicar um potencial de deterioração. Porém, mesmo cepas que possuem o gene *aprX* no genoma podem não apresentar potencial deteriorador caso a proteína não seja expressa. A atividade hidrolítica é uma característica cepa-específica e pode dificultar a avaliação do potencial deteriorador dos microrganismos contaminantes de produtos e ambientes lácteos. Como forma de controlar a proteólise por essa enzima, manter boas práticas de higiene, tanto na fazenda quanto na indústria, é primordial, uma vez que contagens de bactérias elevadas podem resultar em maior grau de proteólise dependendo do potencial deteriorador das cepas contaminantes (Zhang et al., 2019).

### 3. Lipases

O gênero *Pseudomonas* é apontado como importante produtor de lipase dentre os gêneros bacterianos (Bora & Gohain, 2013). As lipases produzidas por psicrotróficos são consideradas importantes no desenvolvimento de defeitos no sabor e aroma em queijos porque são adsorvidas pelos glóbulos de gordura, ficando retidas na massa do queijo. A presença de lipases em queijos promove a hidrólise da gordura com liberação de ácidos graxos e a formação de ácidos hexanóico, octanóico, decanoico e butírico, que conferem sabor picante, rançoso, gorduroso e de sabão ao produto (Santos et al., 2021).

Em leite UHT é comum a presença de lipases estáveis ao calor, que podem impactar na vida útil e na qualidade do produto. Andrewes (2018) detectou lipase no leite UHT através da formação de éster metílico e verificaram que quanto maior a quantidade de lipases presente na amostra, maior a deterioração do produto, levando o leite UHT a apresentar um sabor de sabão em um período de 15 dias após a sua fabricação (Santos et al., 2021).

Apesar da capacidade de se proliferar em ambientes de refrigeração, Pereira et al. (2019) constataram que quanto maior o tempo e a maior a temperatura de armazenamento, mais elevado é o índice lipolítico de espécies de *Pseudomonas*. A produção de enzimas como proteases, lipases e fosfolipases por microrganismos psicrotróficos é afetada pela temperatura (Nuñez & Nuñez, 1988).

### 4. Conclusão

*Pseudomonas* spp. constituem um problema na indústria laticinista devido à produção de enzimas hidrolíticas, como lipases e proteases. O período de estocagem do leite cru e más condições de higiene contribuem para a hidrólise enzimática de produtos lácteos, uma vez que essas enzimas podem ser termoestáveis. Logo, o tempo curto de armazenamento do leite cru e práticas adequadas na obtenção higiênica da matéria-prima devem ser adotadas, a fim de evitar a deterioração.

## Referências

- Andreani, N. A., Carraro, L., Fasolato, L., Balzan, S., Lucchini, R., Novelli, E., & Cardazzo, B. (2016). Characterisation of the Thermostable Protease AprX in Strains of *Pseudomonas fluorescens* and Impact on the Shelf-life of Dairy Products: Preliminary Results. *Italian Journal of Food Safety*, 5(4), 6175. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.6175>
- Andrewes, P. (2018). Indirect detection of lipase in UHT milk by measuring methyl ester formation. *International Dairy Journal*, 79, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.11.012>
- Baglinière, F., Matéos, A., Tanguy, G., Jardin, J., Briard-Bion, V., Rousseau, F., Robert, B., Beaucher, E., Gaillard, J. L., Amiel, C., Humbert, G., Dary, A., & Gaucheron, F. (2013). Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilization. *International Dairy Journal*, 31, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.02.011>.
- Baglinière, F., Tanguy, G., Jardin, J., Matéos, A., Briard, V., Rousseau, F., Robert, B., Beaucher, E., Humbert, G., Dary, A., Gaillard, J. L., Amiel, C., & Gaucheron, F. (2012). 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*, 135, 2593-2601. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.099>.
- Baruzzi, F., Lagonigro, R., Quintieri, L., Morea, M., & Caputo, L. (2012). Occurrence of non-lactic acid bacteria populations involved in protein hydrolysis of cold-stored high moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiology*, 30(1), 37-44. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.009>
- Bora, L., Gohain, D., & Das, R. (2013). Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(11), 1959-1970. <https://doi.org/10.1002/jctb.4170>
- Caldera, L., Franzetti, L. V., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., & Heyndrickx, M. (2016). Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology*, 54, 142-153. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.004>
- de Oliveira, G. B., Favarin, L., Luchese, R. H., & McIntosh, D. (2015). Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 313-321. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246220130963>
- Fairbairn, D. J., & Law, B. A. (1986). Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *The Journal of Dairy Research*, 53(1), 139-177. <https://doi.org/10.1017/s0022029900024742>
- Fernández-Gómez, P., Figueredo, A., López, M., González-Raurich, M., Prieto, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2021). Heterogeneity in biofilm formation and identification of biomarkers of strong biofilm formation among field isolates of *Pseudomonas* spp. *Food Research International*, 148, 110618. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110618>
- Goulart, J. Q. (2017). *Avaliação das características físico-químicas e rendimento do queijo fresco sem sal e iogurte natural produzidos a partir de leite contaminado com microrganismos psicrótróficos produtores de enzimas proteolíticas* [Master dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul]. <http://hdl.handle.net/10183/201587>.
- Matéos, A., Guyard-Nidodème, M., Baglinière, F., Jardin, J., Gaucheron, F., Dary, A., Humbert, G., & Gaillard, J. (2015). 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*, 49, 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.008>
- Narvhus, J. A., Bækkelund, O. N., Tidemann, E. M., Østlie, H. M., & Abrahamsen, R. K. (2021). Isolates of *Pseudomonas* spp. from cold-stored raw milk show variation in proteolytic and lipolytic properties. *International Dairy Journal*, 123, 105049. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105049>

- Nuñez, M., & Nuñez, J. A. (1988). Proteasas de psicrotrofos gram negativos: efectos sobre la leche y los productos lácteos. *Revista Española de Lechería*, 130, 251-260.
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576–588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
- Pereira, F. A., Luiz, L. L., Bruzaroski, S. R., Poli-Frederico, R. C., Fagnani, R., & Santana, E. H. (2019). The effect of cold storage, time and the population of *Pseudomonas* species on milk lipolysis. *Grasas Y Aceites*, 70(2), e300. <https://doi.org/10.3989/gya.0583181>
- Pinto, C. L. O, Martins, M. L., & Vanetti, M. C. D (2006). Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 645-651. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000300025>
- Raposo, A., Pérez, E., de Faria, C. T., Ferrús, M. A., & Carrascosa, C. (2016). Food spoilage by *Pseudomonas spp.*—An overview. *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*, 14, 41-71. <https://doi.org/10.1002/9781119139188.ch3>
- Ribeiro Júnior, J., de Oliveira, A. M., Silva, F. d. G., Tamanini, R., de Oliveira, A. L. M., & Beloti, V. (2018). The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, 101, 75-83. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13069>
- Santos, C. I. A., Salgado, C. A., & Vanetti, M. C. D. (2021). Lipases bacterianas: impactos na qualidade de produtos lácteos e potencial biotecnológico. *Research, Society and Development*, 10, 1-10. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21213>
- Zhang, C., Bijl, E., Svensson, B., & Hettinga, K. (2019). The Extracellular Protease AprX from *Pseudomonas* and its Spoilage Potential for UHT Milk: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 834–852. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12452>
- Zhang, S., Li, H., Uluko, H., Liu, L., Pang, X., & Lv, J. (2015). Investigation of Protease Production by *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 and Degradation on Milk Proteins. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2466-2472. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12496>