

BRUNA APARECIDA SIMONCELLO

EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DE *Pseudomonas fluorescens* NO LEITE UHT RECONSTITUÍDO DESNATADO E ADICIONADO DE DIFERENTES BLENDS DE FOSFATO

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

Orientador: Ítalo Tuler Perrone

Coorientador: Antônio Fernandes de Carvalho

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S596e
2023
Simoncello, Bruna Aparecida, 1995-
Efeito da pré-incubação de *Pseudomonas fluorescens* no
leite UHT reconstituído desnatado e adicionado de diferentes
blends de fosfato / Bruna Aparecida Simoncello. – Viçosa, MG,
2023.

1 dissertação eletrônica (38 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Ítalo Tuler Perrone.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2023.

Referências bibliográficas: f. 31-38.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.162>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Leite - Contaminação. 2. Leite - Pasteurização. 3.
Pseudomonas fluorescens. 4. Fosfatos. I. Perrone, Ítalo Tuler,
1978-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Tecnologia de Alimentos. Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 637.141


BRUNA APARECIDA SIMONCELLO

EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DE *Pseudomonas fluorescens* NO LEITE UHT RECONSTITUÍDO DESNATADO E ADICIONADO DE DIFERENTES BLENDS DE FOSFATO


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

APROVADA: 17 de janeiro de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 BRUNA APARECIDA SIMONCELLO
Data: 03/04/2023 12:02:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Bruna Aparecida Simoncello
Autora

Documento assinado digitalmente
 ITALO TULER PERRONE
Data: 03/04/2023 14:08:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ítalo Tuler Perrone
Orientador

Deus por guiar meus caminhos, meus pais
Geraldo e Ardeni e ao meu irmão Diego.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e proteger, não me desamparando nos momentos mais difíceis.

Aos meu pais, Geraldo e Ardeni e ao meu irmão Diego pela parceria.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ítalo, pela oportunidade de trabalho e confiança depositada em mim.

Ao coorientador, Prof. Dr. Antônio Fernandes de Carvalho pelas contribuições dadas nos laboratórios e equipamentos para execução das análises.

Aos amigos da equipe Inovaleite, Raiane, Sidney, Andressa, Maria Tereza, Isabella, Luana, Jaqueline, Mariana, Patty e Davide. As amigas de Viçosa, Kátia, Larissa, Malú.

O técnico Luis, obrigada por toda ajuda e disponibilidade.

RESUMO

SIMONCELLO, Bruna Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2023. **Efeito da pré-incubação de *Pseudomonas fluorescens* no leite UHT reconstituído desnatado e adicionado de diferentes blends de fosfato.** Orientador: Ítalo Tuler Perrone. Coorientador: Antônio Fernandes de Carvalho.

O leite é um alimento completo e altamente suscetível a contaminação. A proteólise microbiana contribui com a degradação do leite e tem consequência também sobre a vida de prateleira de seus derivados. Entre o gênero *Pseudomonas*, podemos destacar a espécie *P. fluorescens* que mostra considerável importância na deterioração do leite. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a estabilidade do leite UHT (ultra-high temperature) reconstituído processado a partir de leite contaminado intencionalmente com a cepa de bactéria psicrotrofica proteolítica *P. fluorescens* 07A e adicionado de diferentes blends de sais estabilizantes, visto que a legislação brasileira, permite a adição destes em concentrações não superior a 0,1%. Foram realizadas atividades como a caracterização da amostra A (leite desnatado reconstituído e processado); tratamento térmico prévio; padronização, ativação e inoculação da cepa *P. Fluorescens* 07A; adição de blends de fosfato e tratamento UHT. Além disso, análises microbiológicas e físico – químicas foram realizadas durante 90 dias de estocagem a temperatura de 25 °C.

Palavras chave: Tratamento térmico. Fosfatos. Análises físico-químicas. Análises microbiológicas. Leite em pó.

ABSTRACT

SIMONCELLO, Bruna Aparecida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2023. **Effect of pre-incubation of *Pseudomonas fluorescens* in reconstituted skimmed UHT milk and added with different phosphate blends.** Adviser: Ítalo Tuler Perrone. Co-adviser: Antônio Fernandes de Carvalho.

Milk is a complete food and highly susceptible to contamination. Microbial proteolysis contributes to the degradation of milk and also has consequences on the shelf life of its derivatives. Among the genus *Pseudomonas*, the species *P. fluorescens* has shown considerable importance in milk spoilage. Therefore, this study aimed to evaluate the stability of reconstituted UHT (ultra-high temperature) milk processed from milk intentionally contaminated with the strain of proteolytic psychrotrophic bacteria *P. fluorescens* 07A and added with different blends of salts stabilizers, since the Brazilian legislation allows the addition of these in a concentration not higher than 0.1%. Activities were carried out such as the characterization of sample A (reconstituted skimmed milk); previous heat treatment; standardization, activation and inoculation of the *P. fluorescens* 07A strain; addition of phosphate blends and UHT treatment in sample A. In addition, microbiological and physical-chemical analyzes were carried out during 90 days of storage at a temperature of 25 °C.

Keywords: Thermal treatment. Phosphates. Physicochemical analysis. Microbiological analysis. Powdered milk

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo geral	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. REFERENCIAL TEÓRICO	10
3.1. Leite em pó desnatado no Brasil	10
3.2. Leite UHT	11
3.3. Micro-organismos psicrotróficos no leite	12
3.4. Importância das proteínas do leite para a indústria	13
3.5. Adição de sais estabilizantes	14
3.6. Estabilidade térmica	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1. Instalações	16
4.2. Metodologia.....	16
4.3. Análises microbiológicas	17
4.3.1. Contagem de mesófilos aeróbicos	17
4.3.2. Contagem de esporos aeróbicos	18
4.4. Análises físico – químicas	18
4.4.1. Determinação atividade de água	18
4.4.2. Determinação Umidade.....	18
4.4.3. Determinação cinzas	18
4.4.4. Determinação do pH.....	19
4.4.5. Determinação acidez.....	19
4.4.6. Estabilidade térmica	19
4.4.7. Análise cálcio iônico	19
4.4.8. Nitrogênio total (NT)	19
4.4.9. Nitrogênio não caseínico (NCN) e nitrogênio não proteico (NPN)	20
4.4.10. Eletroforese SDS-PAGE.....	20
4.4.11. Determinação potencial zeta (ζ)	20
4.4.12. Determinação tamanho das partículas	21
4.4.13. Análise de tamanho de partículas por espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	21
4.4.14. Atividade enzimática.....	21
4.5. Análise estatística	21

5. RESULTADOS	22
5.1. Teste piloto referente a padronização da cepa P. Fluorescens 07A.	22
5.2. Análises físico – químicas leite em pó.....	22
5.3. Análises leite reconstituído antes e após tratamento térmico.....	23
5.4. Análises microbiológicas no leite UHT reconstituído desnatado.	23
5.5. Análises físico-químicas no leite UHT reconstituído desnatado.	24
5.5.1. Acidez e pH	24
5.5.2. Estabilidade térmica e cálcio iônico.....	25
5.5.3. Proteína total, nitrogênio não protéico (NNP) e nitrogênio não caseínico (NNC).	26
5.5.4. Análise de eletroforese SDS-PAGE.	27
5.5.5. Tamanho de partícula (LS), potencial zeta, tamanho de partícula por difração da luz (DLS).	28
5.5.6. Atividade enzimática.....	29
5.4.7. Visualização das amostras nos tempos T0 E T90.....	30
6. CONCLUSÃO.....	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento completo e altamente suscetível a contaminação e desenvolvimento de micro-organismos devido a diversidade de nutrientes, valor de pH próximo à neutralidade (Netto, 2012). A fração proteica no leite de vaca representa cerca de 3,4 % de proteína, dividida em três grupos principais: caseínas, proteínas do soro e nitrogênio não proteico (Netto, 2012).

Leite UHT (ultra-high temperature) reconstituído é o produto elaborado a partir de leite em pó previamente reconstituído, homogeneizado e submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130°C e 150°C, mediante processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (Brasil, 2013)

O leite UHT se destaca no mercado por ser um produto de vida de prateleira estendida, o que oferece comodidade ao consumidor. Entretanto, a desestabilização ou geleificação do leite UHT é uma grande preocupação para as indústrias de lácteos, uma vez que limita a sua vida útil e o potencial de mercado deste produto (Alves et al., 2016).

A proteólise microbiana contribui com a degradação do leite e tem consequência também sobre a vida de prateleira de seus derivados. A desestabilização da dispersão coloidal do leite de consumo está relacionada com a presença de micro-organismos psicrotróficos na matéria-prima e tem sido relatado como um problema de ordem mundial. Uma das principais causas apontadas para o problema de geleificação deste produto é a ação de enzimas proteolíticas produzidas por bactérias psicrotróficas sobre as frações de caseína do leite (Bagliniere et al., 2017). A maioria das proteases de psicrotróficos atua sobre a micela de caseína preferencialmente às proteínas do soro, sendo que as frações mais susceptíveis são a κ -caseína e β -caseína (Chen et al., 2003). Entre os género *Pseudomonas*, a espécie *P. fluorescens* tem mostrado considerável importância na deterioração do leite (De Jonghe et al., 2011; Rasolofo et al., 2010). Embora os microrganismos psicrotróficos sejam inativados pelo calor, tratamento comumente usado na indústria de laticínios, suas proteases extracelulares são geralmente termorresistentes e mantêm suas atividades mesmo após o leite pasteurizado ou submetido ao

tratamentos de ultra-alta temperatura (UHT) (McPhee e Griffiths, 2011).

Pseudomonas fluorescens 07A, uma cepa proteolítica, foi isolada de leite cru a granel (Pinto, 2004; Martins et al., 2005) e produz uma protease extracelular responsável pela deterioração do leite, mesmo em baixas temperaturas.

A legislação brasileira, permite a adição de sais estabilizantes (citrato de sódio, monofosfato de sódio, difosfato de sódio, trifosfato de sódio combinados ou não) no leite UHT em concentração não superior a 0,1% (Brasil, 1997). Esses sais atuam como agentes quelantes de cálcio e aumentam a estabilidade térmica do leite, pois sequestram o cálcio iônico durante o processamento e estabilizam micelas de caseína (Tsioulpas et al., 2010; Boumpa et al., 2008; Gaucheron, 2005; Udabage et al., 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a estabilidade de leite UHT reconstituído processado a partir de leite contaminado intencionalmente com a cepa de bactéria psicotrófica proteolítica *P. fluorescens* 07A.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da qualidade da matéria-prima e com a adição de diferentes sais estabilizantes na estabilidade de leite UHT durante sua vida de prateleira.

Acompanhar as características físicas-químicas e microbiológicas de leite reconstituído, com pré - incubação da cepa proteolítica *P. fluorescens* 07A, durante 90 dias de estocagem.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Leite em pó desnatado no Brasil

Entende-se por leite em pó o produto que se obtém por desidratação do leite de vaca, integral, parcialmente desnatado ou desnatado de acordo com teor de gordura correspondente (menor ou igual a 1,5%) e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados, leite em pó desnatado (Brasil, 2018).

A produção de leite em pó apresenta como vantagem uma maior facilidade de

transporte, armazenamento e manuseio do produto final, seja ele para o consumo na forma direta, ou como ingrediente na elaboração de outros produtos alimentícios (Balke et al. 2014).

Leite pasteurizado reconstituído: produto elaborado a partir de leite em pó previamente reconstituído submetido a aquecimento em temperatura entre 72°C a 75°C durante 15s a 20s (quinze segundos a vinte segundos), exclusivamente em equipamento de pasteurização a placas, dotado de painel de controle com termoregistrador termo-regulador automáticos, válvula automática de desvio de fluxo, termômetros e torneiras de prova, seguindo-se resfriamento imediato em circuito fechado e em equipamento a placa até temperatura igual ou inferior a 4°C (Brasil, 2013).

Leite ultra-alta temperatura (UHT ou UAT) reconstituído: produto elaborado a partir de leite em pó previamente reconstituído, homogeneizado e submetido, durante 2 a 4 segundos, a uma temperatura entre 130°C e 150°C, mediante processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (Brasil, 2013).

Os leites reconstituídos terão como ingredientes obrigatórios água potável e leite em pó, admitindo-se como ingredientes opcionais creme de leite, manteiga extra ou de primeira qualidade sem sal, gordura anidra de leite (Brasil, 2013).

Além das informações obrigatórias no rótulo do leite UHT e do leite pasteurizado reconstituídos, contidas na legislação em vigor, deverá ser acrescentado o termo "RECONSTITUÍDO" à denominação de venda dos produtos (Brasil, 2013).

3.2. Leite UHT

O leite UHT (Ultra High Temperature) é o produto lácteo que possui longa vida útil sem necessidade de ser mantido refrigerado durante o armazenamento (Vianna et al., 2012).

Devido a sua importância econômica, tecnologias mais avançadas são necessárias, a instabilidade térmica da matéria-prima pode causar floculação do leite nas superfícies do trocador de calor e formação de sedimentos e gelificação durante o armazenamento, o que pode levar à rejeição dos consumidores.

Quando o leite é aquecido, o pH diminui, reduzindo a repulsão eletrostática, levando à desestabilização das micelas de caseína, deposição de fosfato de cálcio

e aumento da concentração de cálcio ionizado (SINGH, 2004).

Portanto, o valor do pH e o cálcio ionizado são fatores importantes que controlam a estabilidade térmica do leite em altas temperaturas. (TSIOULPAS et al., 2010; BOUMPA et al., 2008; TSIOULPAS et al., 2007).

3.3. Micro-organismos psicrotróficos no leite

Os microrganismos que geralmente contaminam o leite se multiplicam em uma ampla faixa de temperatura. De acordo com a faixa de temperatura e temperatura de reprodução ideal, os microrganismos podem ser divididos em bactérias psicofílicas, bactérias mesofílicas e bactérias termofílicas. Microrganismos psicofílicos são microrganismos cuja temperatura de reprodução está entre 0 °C e 20 °C, e a temperatura ótima é inferior a 15 °C (Morita, 1975). As bactérias mesófilas constituem uma população que inclui a maioria dos microrganismos acidificantes do leite, caracterizando-se por se reproduzir entre 20 °C e 45 °C, sendo que a temperatura ótima de reprodução está entre 30 °C e 40 °C (Jay et al., 2005). Bactérias termofílicas são definidas como bactérias cuja temperatura ótima de reprodução está entre 45 °C e 65 °C. Para algumas espécies consideradas bactérias extremamente termofílicas, a temperatura de reprodução pode chegar a 90 °C, com a temperatura mais baixa em torno de 35 °C (ICMSF, 1994).

Entre as bactérias psicofílicas contaminadas, *Pseudomonas* é o gênero mais comumente encontrado em leite refrigerado e laticínios (Adams et al., 1976).

As enzimas proteolíticas da microbiota psicrotrófica, em sua maioria, são resistentes aos tratamentos térmicos aplicados no processamento de leite e derivados. A atividade residual dessas enzimas gera problemas de ordem tecnológica como perda de estabilidade térmica do leite, coagulação doce em leite UHT. Tais problemas são ainda mais agravantes no Brasil, pois ainda hoje, em muitas propriedades a matéria-prima é de baixa qualidade. Por isso estudos com microrganismos psicrotróficos e suas enzimas podem gerar contribuições para a cadeia produtiva do leite (Netto, 2012).

Muitas dessas enzimas mantêm grande parte de sua atividade mesmo após os tratamentos térmicos utilizados nas indústrias de laticínios, o que constitui um dos principais problemas atuais na produção de derivados lácteos (Samaržija et al., 2012). Entre as características que permitem a estabilidade térmicas dessas enzimas estão nos sítios de ligação ao Ca^{+2} , empacotamento maximizado e núcleo hidrofóbico

(Sørhaug e Stepaniak, 1997).

As proteases extracelulares podem causar degradação da micela de caseína, o que resulta em modificações nas propriedades físico-químicas e características sensoriais de produtos lácteos (Chen et al., 2003; McPhee e Griffiths, 2011). Esses problemas levam a perdas econômicas dos produtos associado à gelificação do leite UHT ou mudanças nas características sensoriais (Machado et al., 2017).

A cepa *P. fluorescens* 07A isolada de leite cru produz protease, esta enzima apresenta alta atividade residual quando submetida a intenso tratamento térmico, enquanto os tratamentos térmicos mais brandos levam à hidrólise da protease e perda massiva de atividade (Alves et al., 2016).

A produção de proteases por bactérias psicrotróficas é um processo complexo influenciada pela composição do meio (McKellar et al., 1987), condições de cultura e fase de crescimento (Nicodème et al., 2005; Rajmohan et al., 2002). A temperatura também é um fator importante associado à regulação da produção de protease por micro-organismos psicrotróficos (Woods et al., 2001; McKellar e Cholette, 1987).

A cepa *P. fluorescens* 07A foi isolada de leite cru coletado em Minas Gerais, Brasil (Pinto, 2004 ; Martins et al., 2005). A cultura foi cultivada em caldo Luria-Bertani (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 25 ° C (Alves et al., 2016).

3.4. Importância das proteínas do leite para a indústria

A parte nitrogenada do leite consiste em caseína, proteína do soro e compostos nitrogenados não proteicos (Horne, 2009; Fox; Brodtkorb, 2008; Silva, 2004).

As propriedades nutricionais, sensoriais e de textura dos principais produtos lácteos (como o leite líquido) são derivadas das propriedades da caseína (De Kruif et al., 2012). A capacidade do leite de resistir a altas temperaturas sem perder estabilidade é muito peculiar, o que torna possível processar muitos produtos lácteos esterilizados com uma vida útil longa (Singh, 2004). A aplicabilidade da proteína é diferente e o efeito fisiológico é muito benéfico. As condições que levam à agregação das micelas de caseína são conhecidas, mas os fatores que promovem a dissociação das micelas de caseína não são totalmente compreendidos (Ye & Harte, 2013).

A coagulação do leite é o processo que consiste na transformação do leite em estado líquido para gel. Este processo é decorrente de modificações físico-químicas nas micelas que podem ocorrer por meio de acidificação ou por ação enzimática. A

coagulação e formação do gel não ocorre abaixo de 18 °C e acima de 55 °C (NERO, DA CRUZ & BERSOT, 2017)

3.5. Adição de sais estabilizantes

Os minerais correspondem às menores partes do leite e determinam muitas de suas propriedades, incluindo formação e Estabilidade de micelas de caseína. Do ponto de vista técnico, Os minerais afetam a estabilidade da proteína durante o processamento, a textura da proteína vários géis (Lucey; Horne, 2009; Gaucheron, 2005). O fosfato de cálcio coloidal é parte integrante da estrutura micelar da caseína. Portanto, dependendo das condições físico-químicas, a estrutura pode ser parcialmente destruída pela dissociação das caseínas e dos sais (Gaucheron, 2005).

Sais estabilizantes ou quelantes de cálcio, tais como citratos e fosfatos, são frequentemente adicionados no leite e derivados com o intuito de modificar suas propriedades físicas (Kaliappan; Lucey, 2011), formando complexos estáveis por meio de ligações iônicas com os metais ou metais alcalinos terrosos (Fox; Mcsweeney, 1998). Esses sais podem aumentar a estabilidade térmica do leite (Tsioulpas et al., 2010), diminuir a floculação nos trocadores de calor (Prakash et al., 2007), minimizar a formação de sedimentos e gelificação de produtos UHT (Boumpa et al., 2008; Walstra et al., 2006). Estabilizantes podem apresentar efeitos diferentes na concentração de cálcio iônico no leite, no pH, na estabilidade ao etanol, e desta forma, podem impulsionar na sedimentação e vida de prateleira do produto (Rodrigues, 2012).

Adição de citrato e fosfato antes do processo UHT são alternativas para reduzir a precipitação e gelificação que limitam a vida útil do leite UHT (Kelly et al., 2006).

Vários autores citam que esses agentes quelantes de cálcio aumentam a estabilidade térmica do leite, porque sequestram o cálcio ionizado, reduzindo o cálcio disponível, e se ligam à caseína para estabilizar as micelas evitando a precipitação (Tsioulpas et al., 2010; Boumpa et al., 2008; Gaucheron, 2005; Pastorino, 2003; Udabage et al., 2001).

Os fosfatos são compostos preparados a partir do ácido fosfórico, parcialmente ou totalmente neutralizado com íons de metais alcalinos, predominantemente sódio, potássio e cálcio. Os fosfatos estão entre os mais importantes ingredientes na indústria de laticínios (Dziezak, 1990). Quando usados em concentrações bem abaixo

de 5%, desempenham uma variedade de funções como, emulsificação, neutralização, estabilização e sequestro de metais, além de promover o controle da coagulação proteica e a dispersão de proteínas. A adição de fosfato dissódico estabiliza a caseína do leite impedindo sua coagulação; assim durante a estocagem o leite pode não formar gel e outras alterações reológicas. Os citratos são comumente adicionados a leites que vão ser submetidos a tratamentos térmicos como UHT, porém altos níveis de citrato podem causar a desintegração das micelas de caseína (Pinheiro e Mosquim, 1991).

Visto isso a escolha dos estabilizadores não é fácil, sendo considerados eficazes quando reduzem moderadamente o cálcio ionizado e não aumentam excessivamente o pH (Tsioulpas et al., 2010).

3.6. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica é a resistência do leite ao tratamento térmico sem formação de grumos (Singh, 2004). Tratamento térmico severo, excesso de íons cálcio, pH, hidrólise enzimática da kappa-caseína são fatores que levam à instabilidade (O'Connell et al. 2006; Singh 2004)

A estabilidade térmica máxima do leite ocorre em um pH próximo a 6,7. Quando o pH excede 6,9, há a dissociação das soroproteínas e também da kappa-caseína, promovendo redução da estabilidade térmica (Singh, 2004). Quando o pH está abaixo de 6,5 reduz a força iônica, para a estrutura micelar se manter ocorre um deslocamento, o cálcio muda da fase coloidal para a fase solúvel, resultando em um aumento do cálcio iônico.

A quantidade de cálcio ligado controla as cargas das micelas e, consequentemente, o nível de cálcio iônico no sistema. À medida que aumenta a quantidade do cálcio total, aumenta a quantidade de cálcio ligado e reduzem as cargas negativas das micelas, ocorrendo a diminuição da barreira energética para a coagulação. Se o nível de cálcio reduz, aumentam as cargas negativas das micelas e a repulsão entre elas, dificultando a coagulação. Portanto, é muito importante para a estabilidade do leite o equilíbrio entre as três fases de cálcio no leite (Ribeiro et al., 2010; Horne; Parker, 1981). Com isso, o Ca^{2+} pode ser influenciado pela quantidade e tipos de caseínas, por fosfatos e citratos e pH do leite (Lewis, 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Instalações

O presente trabalho foi realizado em um grupo de pesquisas multicêntrico INOVALEITE (laboratório de Leite e Derivados) da Universidade Federal de Viçosa em parceria com o QUIMTEC (laboratório de Química e tecnologia de Alimentos) da Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.2. Metodologia

No estudo por apresentar maior facilidade de transporte, armazenamento e manuseio do produto final foi utilizado o leite em pó desnatado como ingrediente na elaboração de leite fluido submetido a pasteurização, inoculação de *Pseudomonas fluorescens* e processo de ultra-alta temperatura (UHT).

Na primeira etapa, a PF 07A (*Pseudomonas fluorescens*) foram ativadas em caldo BHI na proporção 1% (v/v), após 24 horas à 25 °C foi feita a diluição em série para 10⁵ cfu/mL, posteriormente inoculada 1% (v/v) na amostra de leite reconstituído e encubada a 7 °C, prosseguiu-se com a enumeração em ágar PCA (Plate Count Agar) por ensaio micro-gotas (20 ul/gota) em 0, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

Posteriormente a reconstituição do leite em pó foi feita na proporção 1:10, uma parte de leite em pó para 10 partes de água destilada, obtendo a amostra leite desnatado reconstituído (amostra A).

Foram submetidos ao tratamento térmico (90 °C por 90 s) 80 L de leite reconstituído, em seguida distribuídos em 16 garrafas de vidro Schott com 4,5 L cada.

Foi realizada ativação da PF 1% (V/V) em 20 mL de caldo BHI por 24 h/25 °C, em seguida centrifugação por 15 minutos à 7 °C, após a centrifugação foi feita a junção da ressuspensão do pellet com 20 mL de amostra A (10% m/v); concentração de células: 10⁹ cfu/mL, posteriormente diluição em série para 10⁷ cfu/mL na amostra A.

Após tratamento térmico na amostra A, foi inoculado 0,45 mL de inóculo PF 07A a 10⁷ cfu/mL⁻¹ em 14 vidros shot incubados por 72 h à 7 °C, outros 2 vidros shot contendo amostra não tiveram adição de PF e foram utilizados como amostra controle. Análises de amostras inoculadas e de controle, 0 e 72 h de inoculação / incubação.

Cada 2 vidros shot contendo amostra A com PF inoculada foram adicionado de diferentes blends de fosfato 20 minutos antes do tratamento UHT. Exceto A7 (amostra + PF07A) e A8 (Controle). Segue disposto na tabela 1.

Tabela 1: Blends de fosto utilizados em cada amostra A.

Amostra	Blend
A1	Tripolifosfato de sódio e monofosfato monossódico
A2	Polifosfato de sódio, monofosfato monossódico e monofosfato dissódico
A3 e A4	Fosfato trissódico, polifosfato de sódio e monofosfato monossódico
A5	Fosfato Dissódico
A6	Citrato de sódio
A7	-
A8	-

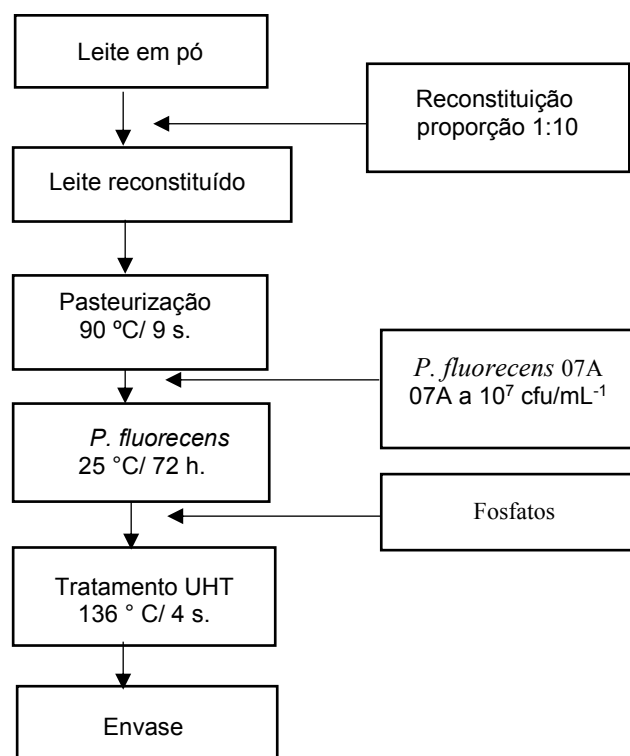
Fonte: Autores (2023)

Após, as amostras foram submetidas ao tratamento UHT (4 s / 136 °C), sendo posteriormente distribuídas em garrafas assépticas (~ 250 mL).

As amostras incubadas a 25 ° C foram analisadas nos tempos 0, 7, 14, 28, 56, 90 dias.

Abaixo segue fluxograma das etapas descritas anteriormente.

Figura 1 Cronograma das atividades



Fonte: Autores (2023)

4.3. Análises microbiológicas

4.3.1. Contagem de mesófilos aeróbicos

Foram transferidos 1 mL da amostra de leite para 9 mL de solução salina – peptonada e homogeneizadas em vortex. Em seguida, preparadas diluições seriadas

a fim de se obter enumeração entre 15 e 150 colônias por placa. Volumes de 1,0 mL de cada diluição serão inoculados em placas de petri e adicionado ágar BHI fundido e resfriado. As placas foram incubadas a $32 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Os resultados foram obtidos pela multiplicação das contagens encontradas pelo inverso da diluição utilizada e expressos em UFC mL⁻¹ (Wehr e Frank, 2004)).

4.3.2. Contagem de esporos aeróbicos

A metodologia para contagem de esporos mesófilos aeróbicos utilizada está descrita em Wehr e Frank (2004). Foi transferido, aproximadamente, 250 mL de amostra de leite para recipientes estéreis. As diluições seriadas foram realizadas transferindo-se 1 mL da amostra para tubos contendo 9 mL de solução salina-peptonada. Serão escolhidas diluições em que se esperava obter enumeração entre 25 e 250 colônias por placa. Será transferido 1 mL de cada diluição selecionada para eppendorf de 2 mL, aplicado tratamento térmico de $80 \text{ }^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$, em seguida transferir 1 mL para a placa de Petri contendo ágar BHI. As placas serão incubadas invertidas a $32 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h.

4.4. Análises físico – químicas

4.4.1. Determinação atividade de água

Foi inserido leite em pó na cápsula e colocada dentro da câmara de análise e iniciada a leitura da mesma. Após o equipamento (Aqualab) estabilizar, registrou-se o resultado. A estabilidade do equipamento foi observada por sinal de alerta (Brasil, 2014).

4.4.2. Determinação Umidade

A placa de petri foi colocada na estufa a uma temperatura de $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora, esfriou em dessecador e foi pesada. Em seguida, 5 g da amostra de leite em pó foram adicionadas e colocada em estufa na temperatura de $85 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas, esfriou em dessecador e foi pesada (Brasil, 2006).

4.4.3. Determinação cinzas

Pesamos aproximadamente 3 g de leite em pó em uma cápsula de porcelana, previamente aquecida em mufla a $550 \pm 10^{\circ}\text{C}$, por 1 hora, resfriada em dessecador e

pesada. Posteriormente a cápsula com leite em pó incinerada em mufla a $550 \pm 10^\circ\text{C}$, por aproximadamente 4 horas, o resíduo resfriou em dessecador e foi pesado (IAL, 2008).

4.4.4. Determinação do pH

A determinação do potencial hidrogeniônico foi realizada utilizando medidor de pH (Gehaka, modelo PG1400) em temperatura entre 20 e 25 °C, por meio da introdução do eletrodo juntamente com o medidor de temperatura de leite (Brasil, 2006).

4.4.5. Determinação acidez

A acidez fornecida por meio da titulação das propriedades de leite com solução de NaOH 0,1 mol / L, sendo o ponto final da titulação a viragem do indicador para coloração levemente rosa (Brasil, 2006). Os resultados foram expressos em percentual de ácido láctico (m/v).

4.4.6. Estabilidade térmica

A fim de verificar a estabilidade ao tratamento térmico, 5 mL da amostra de leite UHT foram colocados em tubos de ensaio os quais permaneceram em banho termostaticamente controlado em torno de 140 °C. O tempo necessário para ocorrer a desestabilização do sistema será avaliado como Tempo de Coagulação Térmica (Fox, 1982).

4.4.7. Análise cálcio iônico

Para a determinação da concentração de cálcio iônico no leite esterilizado, adicionou-se 25 mL de leite a 20 °C (+/- 1°C), a 0,5 mL de ISA (ionic strength adjustor), homogeneizou-se e, posteriormente, imergiu-se o eletrodo na amostra. A leitura foi realizada em ppm e convertida em mM. (Tanaka et al., (2011).

4.4.8. Nitrogênio total (NT)

A determinação do nitrogênio total segue o método Kjeldahl, que é realizado em três etapas. Inicialmente, a oxidação (digestão) da amostra (Digestor Buchi, Suíça) é realizada a 400 °C na presença de um catalisador com ácido sulfúrico, que destrói

a estrutura proteica e libera nitrogênio na forma de sais de amônio. Resfriar a amostra digerida à temperatura ambiente, adicionar solução de NaOH a 40%, liberar nitrogênio na forma de amônia durante a destilação (Buchistill, Suíça), coletar o destilado em solução de ácido bórico a 4% (adicionar indicador), Reagir com eles para gerar metaborato de amônio . O sal é titulado por neutralização com HCl 0,05 mol L⁻¹ e representa a fração de nitrogênio a ser determinada. O resultado é expresso como uma porcentagem do nitrogênio total (FIL 20B:1993).

4.4.9. Nitrogênio não caseínico (NCN) e nitrogênio não proteico (NPN)

O teor de NCN será mensurado a partir de filtrado do leite acidificado a pH 4,6 utilizando solução HCl 1,41mol L⁻¹ adaptado da norma FIL (FIL 20B:1993). A concentração de NPN será realizada pela diluição da amostra em uma parte igual de água destilada e posteriormente adicionada de TCA 24 % (m/v) em um volume igual ao da amostra diluída, para que o teor final de TCA seja 12%. O teor de nitrogênio será determinado segundo método de Kjeldalh (FIL 20B:1993), sendo convertido para concentração equivalente de proteína pelos fatores 6,25 para NCN e 6,19 para NPN.

4.4.10. Eletroforese SDS-PAGE

O preparo das amostras para monitoramento da proteólise foi adaptado de ADAMS et al. (1976). Alíquotas com leite refrigerado foram acidificadas para pH 4,0 com ácido clorídrico 3 M, sob agitação constante. Posteriormente, foram centrifugadas por 10 minutos. O soro foi eliminado e a caseína precipitada congelada a -18 °C até o momento da análise.

O SDS-PAGE foi feito com um gel 12% de acrilamida ao invés de 15% de acrilamida. Isso se deu devido ao poro do gel que se formou, quanto maior o percentual de acrilamida menores os poros, com poros menores se obtém maior resolução de proteínas pequenas, no nosso estudo foram avaliadas proteínas maiores, por isso a necessidade de um poro maior.

4.4.11. Determinação potencial zeta (ζ)

Foi utilizado o equipamento zetasizer nano zs90 da marca Malvern Panalytical. Cada uma das amostras foi adicionada em uma cubeta própria do equipamento e adicionado ao equipamento. (Gaucher et al., 2011).

4.4.12. Determinação tamanho das partículas

Cada uma das amostras foi analisada no equipamento de análise de tamanho de partículas por difração a laser Beckman Coulter LS 13 320 com módulo líquido aquoso. As amostras foram adicionadas no equipamento até o volume ideal sugerido pelo equipamento e em seguida realizadas três leituras da amostra.

4.4.13. Análise de tamanho de partículas por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Foi utilizado o equipamento zetasizer nano zs90 da marca Malvern Panalytical. Cada uma das amostras foi adicionada em uma cubeta própria do equipamento e adicionada a este. (ISO 22412, 2017).

4.4.14. Atividade enzimática

A atividade proteolítica foi determinada utilizando azocaseína (Sigma-Aldrich) como substrato, Um alíquota de 250 μ L de solução de azocaseína a 2% (p/v) em 40 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl_2 , pH 7,5, foi adicionado a 150 μ L da solução teste. A mistura foi agitada e incubada a 37 °C por 8 h, e a reação foi interrompida com a adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético a 10% (p/v). Após incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi neutralizado com a adição de 1,0 mL de NaOH 1M. A absorbância da solução resultante foi medida a 440 nm usando um espectrômetro SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima suficiente para aumentar 0,01 da absorbância da solução a 440 nm por minuto sob condições experimentais (Alves, 2016).

4.5. Análise estatística

As medições foram realizadas em triplicada e os dados obtidos foram relatados com média \pm desvio padrão. A diferença significativa entre as amostras de leite UHT foi averiguada pela análise de variância ANOVA a um grau de significância de 0,05% através do programa Sisvar.

5. RESULTADOS

5.1. Teste piloto referente a padronização da cepa *P. Fluorescens* 07A.

Tabela 2. Ensaio microgotas nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação.

Mesófilos aeróbicos (cfu/mL)					
Tempo	T0	T24	T48	T72	T96
Leite reconstituído (teste piloto)	$3,17 \times 10^3$	$5,17 \times 10^4$	$6,33 \times 10^5$	$1,28 \times 10^7$	nd
<i>P. fluorescens</i> (cfu/mL)					
Tempo	T0	T24	T48	T72	T96
Leite reconstituído (teste piloto)	$1,10 \times 10^4$	$6,67 \times 10^4$	$6,33 \times 10^5$	$1,45 \times 10^7$	$6,83 \times 10^7$

Fonte: Autores (2023)

Com o teste piloto verificamos a atividade da cepa *P. Fluorescens* 07A ao decorrer de 90 horas. Assim, após tratamento térmico prévio, foi determinado a utilização da cepa na concentração 10^7 , no tempo programado de 72 horas.

5.2. Análises físico – químicas leite em pó

Tabela 3. Análises físico – químicas leite em pó

Leite em pó	Amostra A
Aw	0,30
Umidade (% w/w)	3,72
Cinzas (% w/w)	5,99

Fonte: Autores (2023)

O teor de umidade no leite em pó desnatado foi de 3,72. De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó (Portaria nº 146 de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária) os limites de umidade estabelecidos são de no máximo 4,0 g/100g para os leites em pó semidesnatado e desnatado.

A média obtida para cinzas de 5,99 % encontrava-se em conformidade com os valores descritos em tabelas de composição de alimentos, como 5,8 % TACO (2006) e 5,9 % IBGE (1999).

Segundo algumas literaturas obtiveram, a composição média da atividade de água (Aw) no leite em pó desnatado em torno de 0,391, estando a nossa Aw dentro dessa especificação (Perrone, 2011).

5.3. Análises leite reconstituído antes e após tratamento térmico.

Tabela 4. Análises físico – químicas amostra A, tempo 0 h e 72 h.

Tempo	Acidez (% ácido láctico)		pH		Estabilidade Térmica (min)		Proteína Total (% w/w)	
	T0	T72	T0	T72	T0	T72	T0	T72
Anterior ao tratamento térmico (ATT)	0,14	nd	6,8	nd	68,5	nd	2,92	nd
Após o pré-tratamento térmico, CT	0,14	0,13	6,8	6,78	68	58	3,18	3,19
Após o pré-tratamento térmico, PF07A	0,14	0,14	6,8	6,73	68	42,5	3,36	3,12

Fonte: Autores (2023)

Tabela 5. Análises microbiológicas amostra A, tempo 0 h e 72 h.

Tempo	mesófilos aeróbicos (cfu/mL)		P. fluorescens (cfu/mL)		Bactérias formadoras de esporos (cfu/mL)		Enumeração de psicotróficos (cfu/mL)	
	T0	T72	T0	T24	T0	T72	T0	T72
Anterior ao tratamento térmico (ATT)	6,00x10 ²	nd	nd	nd	<10	nd	nd	nd
Após o pré-tratamento térmico, CT	<10	1,10x10	<10	<10	nd	nd	<10	<10
Após o pré-tratamento térmico, PF07A	1,83x10 ³	2,17x10 ⁶	3,67x10 ³	2,20x10 ⁶	nd	nd	5,83x10 ³	3,15x10 ⁶

Fonte: Autores (2023)

Foram realizadas conforme tabelas 4 e 5, análises no leite reconstituído anterior (ATT) e posteriormente ao pré-tratamento térmico (90°/9s). Após o tratamento térmico se fez a análise da amostra controle e da amostra adicionada de PF.

Analisando os dados obtidos é possível verificar que o leite reconstituído ATT e após o tratamento térmico se mantiveram dentro das normas da legislação, sendo que a presença de *P. fluorescens* foi constatada, visto ser esse o objetivo após sua adição proposital, além do mais observamos também uma redução no numero de mesófilos aeróbicos e bactérias formadoras de esporos, resultados também esperados devido ao processo térmico a qual foi submetida a amostra (Brasil, 2011).

5.4. Análises microbiológicas no leite UHT reconstituído desnatado.

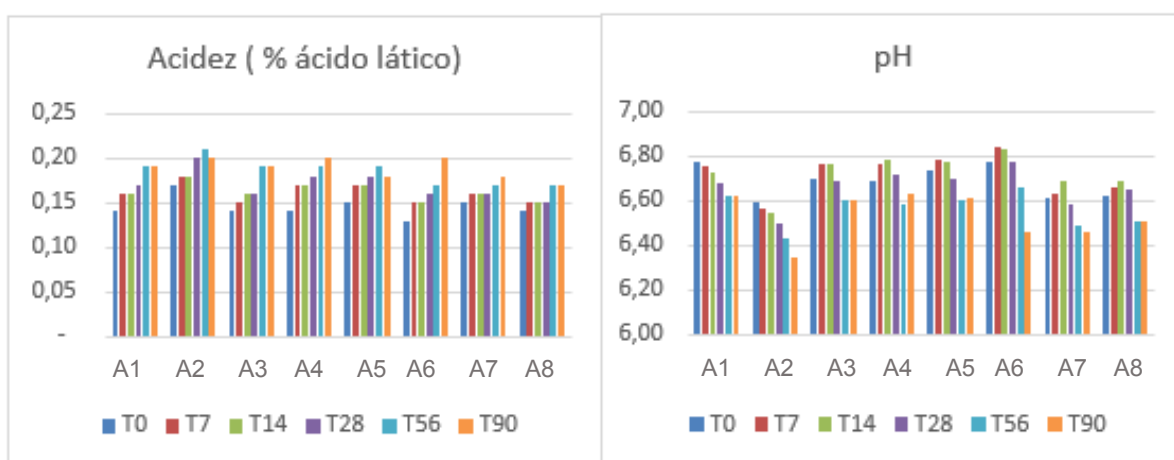
As análises de mesófilos e bactérias formadoras de esporos foram realizadas somente na primeira semana de análises, visto que os resultados *ficaram* <10 em ambos tempos, dentro dos padrões da legislação (Brasil, 1996).

5.5. Análises físico-químicas no leite UHT reconstituído desnatado.

Os resultados se referem a amostra A (leite UHT reconstituído desnatado)

5.5.1. Acidez e pH

Figura 2. Evolução da concentração de acidez e pH nas amostras de leite UHT. Amostras A1 a A8, nos tempos 0, 7, 14, 28, 56 e 90.



Fonte: Autores (2023)

Após 72 horas do tratamento térmico e adição da *P. fluorescens*, os blends foram adicionados ao leite reconstituído (exceto amostras 7 e 8) e submetido ao tratamento UHT, envasado assepticamente em garrafas com cerca de 250 mL, conservado a temperatura de 25° e submetido as análises em intervalos de 7 dias. Na figura 6 podemos analisar os dados relacionados a acidez e pH, ao longo de 90 dias.

Quanto a acidez, constatamos que na maioria dos tratamentos a amostra se manteve dentro do estabelecido pela legislação, na faixa de 0,14 a 0,18 gramas de ácido láctico por 100 mL de leite (Brasil, 2011). No entanto, as amostras A2, A4 e A6 apresentaram excesso de acidez no final do armazenamento. Tal fato pode se justificar pelo blend utilizado (Tabela 1), o que seria um pouco inconstante, visto que A4 foi adicionado do mesmo blend de A3, e este se manteve na faixa ideal.

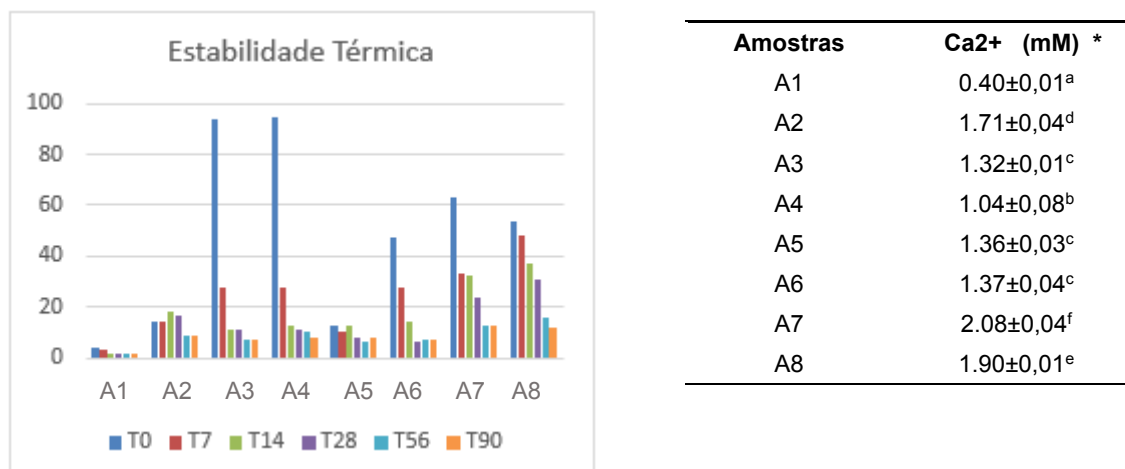
Na análise de pH observamos que à amostra A6 apresentou valor mais alto no início das análises, e ao longo do tempo foi reduzindo, apresentando relação com a análise de acidez que ao longo do tempo foi aumentando, com relação ao estabelecido

em literatura, Walstra, et al., 2006, relata valores de 6,60 e 6,80, esse valor superior pode ter se dado em função do citrato de sódio adicionado anteriormente ao tratamento UHT, visto que o citrato de sódio altera a estabilidade do leite por quelar o cálcio e pela sua influência em alterar o pH, aumentando-o. (Teixeira, 2019).

Melo Junior (2005) e Silva (2004) relatam que no leite UHT com adição de citrato de sódio o aumento inicial da estabilidade se dá devido à solubilização gradativa dos componentes do leite principalmente os sais, incluindo adição do citrato, para promover a estabilidade das micelas de caseína. Ao longo do tempo pode haver redução do pH, que pode ser atribuída pela desestabilização natural da caseína, causando desarranjos moleculares ocasionadas por proteases microbianas de psicrotóxicos.

5.5.2. Estabilidade térmica e cálcio iônico

Figura 3. Evolução da concentração da estabilidade térmica, amostras T1 a T8, nos tempos 0, 7, 14, 28, 56 e 90, e cálcio iônico no tempo 120 nas amostras de leite UHT.



Fonte: Autores (2022)

* Médias seguidas de pelo menos uma letra, na coluna, para cada variável, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

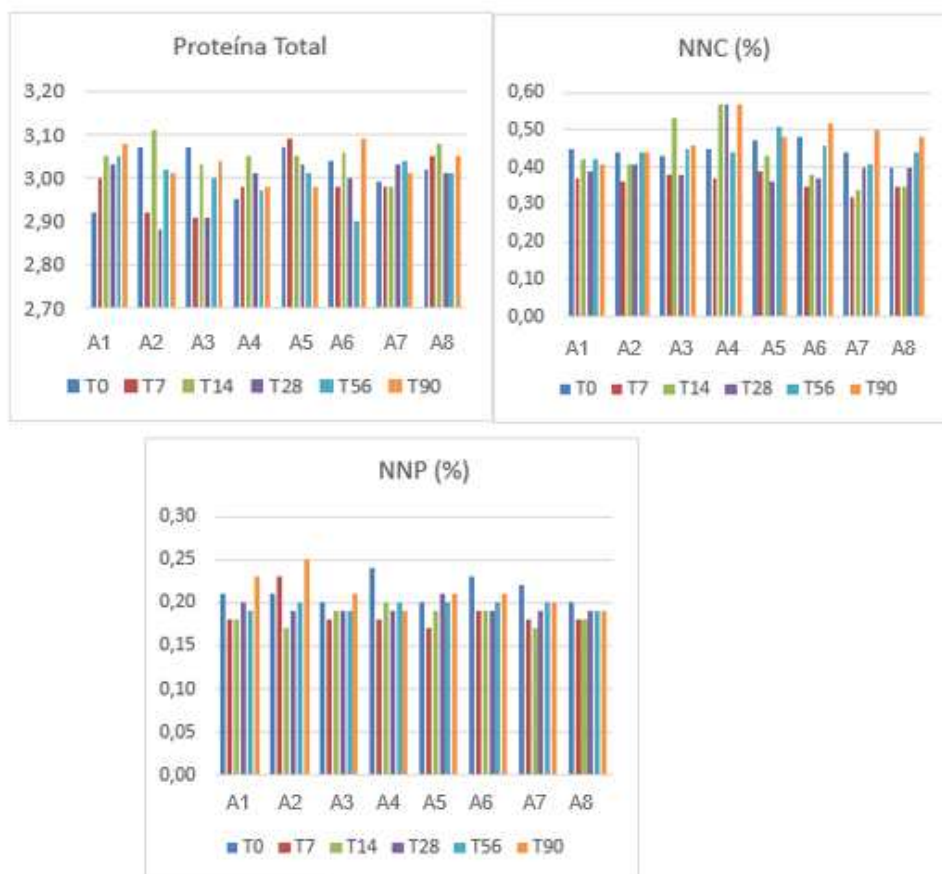
De acordo com a figura 3, podemos observar em um primeiro instante, que as amostras A3 e A4 apresentaram comportamento semelhante, isso se deve provavelmente ao fato de ambas amostras terem sido adicionadas com o mesmo blend de fosfatos. Porém na análise de cálcio iônico, A3 e A4 apresentaram diferença significativa, isso pode ser consequência do tempo de armazenamento da amostra para a realização desta análise.

O aumento do nível de cálcio iônico no leite aumenta a força iônica e, dessa forma, a ligação de íons a grupos carregados da proteína, o que leva a uma diminuição da repulsão eletrostática favorecendo a aglutinação protéica (Mikheeva et al., 2003).

Os fosfatos determinam uma redução do cálcio iônico no leite, determinando um aumento da estabilidade (Horne & Muir, 1990), todavia, o citrato tem efeito mais duradouro, por esse se manter por mais tempo na fase solúvel (Singh, 2004). Em A1 observamos um comportamento de baixíssima resistência térmica, isso, consideravelmente está relacionado ao blend utilizado, o tripolifosfato de sódio, interage com as proteínas para promover distensão entre as moléculas, e tem seu uso limitado por sua baixa solubilidade (FIB, 2012). Isso pode se justificar pelo fato do blend adicionado não ter cumprido seu papel de forma ideal, visto que apresentou baixo teor de cálcio iônico, no entanto, baixa resistência térmica.

5.5.3. Proteína total, nitrogênio não protéico (NNP) e nitrogênio não caseínico (NNC).

Figura 4. Evolução da concentração da estabilidade térmica e cálcio iônico nas amostras de leite UHT. Amostras A1 a A8, nos tempos 0, 7, 14, 28, 56 e 90.



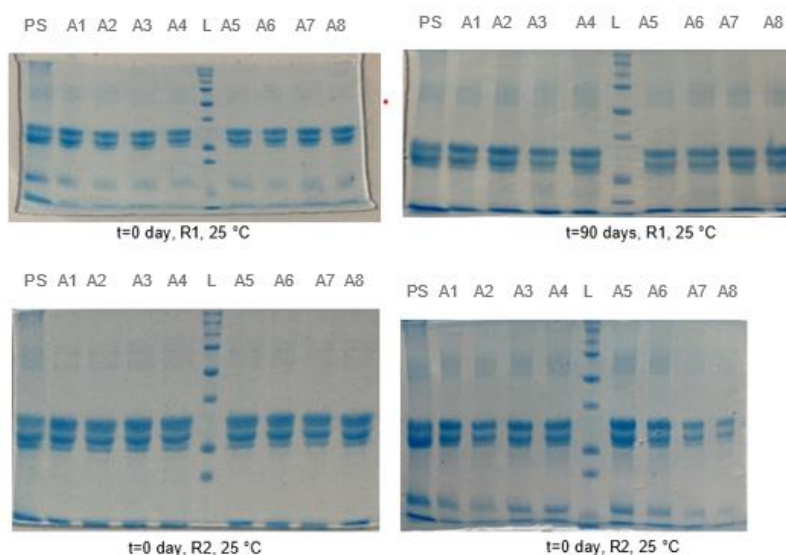
Uma concentração de proteína total para todas as amostras é de aproximadamente 31,0 g/L, permanecendo de acordo com os padrões estabelecidos o mínimo de 2,9% (Brasil, 2011). Porém, essa variação da proteína total ao longo do tempo não é justificável, indicando possível falha técnica de análise.

Segundo Fox (2015), não caseínico (NNC) são proteínas dos soros e compostos nitrogenados da baixa massa molar e corresponde a aproximadamente 20% da concentração total de proteínas nitrogenadas. Foi observado um aumento contínuo da concentração de NNC para UHT que foram processadas com adição de diferentes sais estabilizantes (Tabela 1). A proteólise primária da caseína contribui para esse aumento progressivo de NNC devido à transferência de peptídeos hidrolisados da micela de caseína para fração solúvel (Datta e Deeth, 2003; Netto, 2012).

O Aumento contínuo de NNP para é um indicativo de proteólise. Com a proteólise do leite, devido a degradação do leite das frações de caseína em peptídeos menores e aminoácidos livres temos um aumento dos níveis de NNP (Alves, 2016).

5.5.4. Análise de eletroforese SDS-PAGE.

Figura 5. SDS-PAGE.



Fonte: Autores (2022)

Nos 4 géis da figura 9 constatamos baixo grau de hidrólise das proteínas nas amostras inoculadas com PF 07A na temperatura de 25 ° C. Visualmente não observamos alterações nas bandas de frações de caseína, nos levando a concluir que

a *P. fluorescens* adicionada anteriormente ao tratamento térmico UHT não produziu o efeito esperado.

5.5.5. Tamanho de partícula (LS), potencial zeta, tamanho de partícula por difração da luz (DLS).

Tabela 6. Análises LS, Potencial Zeta e DLS.

	LS (T0)			LS (T90)		
	d ₁₀ (µm)	d ₅₀ (µm)	d ₉₀ (µm)	d ₁₀ (µm)	d ₅₀ (µm)	d ₉₀ (µm)
A1	0,10 ± 0,01	0,81 ± 0,19	11,45 ± 3,00	0,12 ± 0,01	4,54 ± 0,84	12,09 ± 4,01
A2	0,12 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,01
A3	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,01
A4	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,01
A5	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,01
A6	0,13 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,23 ± 0,01
A7	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,01
A8	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,01
	Potencial Zeta		DLS			
	T0 (mV)	T90 (mV)	T0 (nm)	T90 (nm)		
A1	-13,95 ± 0,50	-14,98 ± 0,45	682,95 ± 72,33	578,95 ± 40,98		
A2	-10,10 ± 0,40	-9,98 ± 0,53	10,67 ± 0,33	9,28 ± 0,28		
A3	-9,70 ± 1,08	-4,53 ± 0,53	13,95 ± 0,40	12,05 ± 0,28		
A4	-10,60 ± 0,65	-10,73 ± 0,68	20,16 ± 0,65	22,13 ± 0,38		
A5	-10,20 ± 1,03	-9,95 ± 0,45	10,29 ± 0,22	11,1 ± 0,23		
A6	-9,78 ± 0,63	-10,10 ± 0,50	16,73 ± 0,55	17,38 ± 0,45		
A7	-9,19 ± 0,60	-9,60 ± 0,43	7,23 ± 0,19	7,08 ± 0,13		
A8	-10,47 ± 1,15	-9,58 ± 0,40	7,85 ± 0,11	7,4 ± 0,13		

Fonte: Autores (2023)

Na análise de tamanho de partícula (LS), o d₉₀ se mostrou mais eficiente para o monitoramento de ambos os processos de coagulação. Visto que representa 90 % do volume das partículas presentes no meio. Observamos também que a medida em que ocorre a diminuição do pH, ocorre também um aumento dos tamanhos das partículas (Silva, 2022).

É importante ressaltar que o dado medido por DLS é a intensidade de luz espalhada (flutuações da intensidade). As demais análises oferecidas pelo software (por número e por volume das partículas em solução) são feitas a partir da distribuição obtida pela intensidade, sendo esta a análise mais recomendada (Silva, 2022).

Segundo De Kruif e Holt (2003) as cargas negativas das micelas de caseína

conferem potencial zeta de aproximadamente -20 mV e são essenciais à estabilidade das micelas. Foi observada uma tendência pequena de diminuição do potencial zeta em algumas amostras, mas os valores se mantiveram próximos.

A amostra A1 apresentou valores mais discrepantes quando comparada as outras amostras nas análises acima, isso possivelmente se explica pela adição do tripolifosfato adicionado, que não foi dissolvido de maneira a se obter os resultados desejados.

5.5.6. Atividade enzimática.

Tabela 7. Atividade enzimática.

Amostras	T0	T90
A1	1302	2478
A2	1092	2814
A3	2100	3192
A4	2016	2898
A5	2478	2982
A6	2604	3150
A7	4074	2856
A8	4032	2604

Fonte: Autores (2023)

As amostras adicionadas com *P. Fluorescens* apresentaram um aumento na atividade enzimática, quando comparamos T0 E T90, porém esse aumento não foi suficiente para desestabilizar as micelas de caseína, como podemos identificar na análise de SDS-PAGE.

Na amostra A7, sem adição de fosfato, apenas PF 07A, essa atividade caiu, mostrando ser um comportamento sem justificativa. Na amostra A8, controle, amostra pura a atividade caiu ao longo do tempo, visto o tratamento térmico ter sido eficiente em relação ao número natural de bactérias ali presentes.

5.4.7. Visualização das amostras nos tempos T0 E T90.

Figura 6. Visualização das amostras no tempo T0 e no tempo 90.



Fonte: Autores (2023)

Na figura 6, temos a comparação visual das amostras no tempo 0 e no tempo 90. As amostras não apresentam diferenças visíveis quando observadas a olho nu, apenas A1 apresenta desde o primeiro momento coloração diferente em relação aos demais. O que se deve possivelmente ao blend utilizado (tabela 1), que alterou propriedades físicas e visual.

6. CONCLUSÃO

Com o presente estudo podemos concluir que a *P. fluorescens* 07A não apresentou forte atividade proteolítica no leite UHT reconstituído desnatado.

As amostras que tiveram a cepa isolada da bactéria 07A adicionada apresentaram alterações ao longo do tempo nas análises físico-químicas, mas a maioria se manteve dentro da faixa ideal. Na análise de SDS-PAGE podemos identificar com mais clareza nas imagens que durante 90 dias à temperatura de 25 °C a *P. fluorescens* não produziu enzimas proteolíticas o suficiente para modificar a caseína do leite.

Com isso, não é possível analisar com precisão a verdadeira eficácia dos blends de fosfatos adicionados.

Com a análise de atividade enzimática percebemos que houve atividade enzimática, porém está não foi forte o suficiente para desestabilizar a micela de caseína ao ponto de ser detectado na análise de eletroforese. O ideal é que o estudo seja repetido quando possível, detectando com mais eficiência a atividade proteolítica da cepa após tratamento térmico UHT.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, D. M.; Barach, J. T.; Speck, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. *Journal of Dairy Science*, v. 59, p. 823-37, 1976.

Alves, M, P.; Salgado, R. L.; Eller, M. R.; Vidigal, P. M. P.; Carvalho, A. F. Characterization of a heat-resistant extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* 07A shows that low temperature treatments are more effective in deactivating its proteolytic activity, *Journal of Dairy Science*, Volume 99, Issue 10, 2016.

AOAC. Método Oficial de Análise da Associação de Químicos Analíticos Oficiais. AOAC International, Arlington, 1996.

Baglinière, F.; Jardin, J.; Gaucheron, F.; Carvalho, AF; Vanetti, M. C. D.; Proteólise de micelas de caseína por protease termoestável secretada por *Serratia liquefaciens* leva à desestabilização do leite UHT durante seu armazenamento. *International Dairy Journal* , v.68, p.38-45, 2017.

Balke, M.; Kilian, J.; Steffens, C.; Soares, M. B. A.; Steffens, J. Avaliação do Processo de Obtenção de Leite em Pó pelo Processo de Secagem em Spray Dryer. Congresso de Engenharia Química. Florianópolis, 2014.

Boumpa, T.; Tsioulpas, A.; Grandison, A.; Lewis, M. J. Effects of phosphates and citrates on sediment formation in UHT goat's milk. *Journal of Dairy Research*, v. 75, p. 160–166, 2008.

Boumpa, T.; Tsioulpas, A.; Grandison, A.; Lewis, M. J. Effects of phosphates and citrates on sediment formation in UHT goat's milk. *Journal of Dairy Research*, v. 75, p. 160–166, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Gabinete do Ministro. Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996.

Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº68 de 12 de dezembro de 2006: Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da União. 2006.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 14 de 22/04/2013.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 53, de 01 de outubro de 2018. Determinação da atividade de água (A_w) de produtos de origem. LANAGRO/RS Laboratório de Produtos de Origem Animal/SLAV animal. Publicado em 23 de julho de 2014.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 53, de 01 de outubro de 2018. Regulamento Técnico Mercosul De Identidade E Qualidade Do Leite Em Pó. Publicado em: 16 de outubro de 2018, Edição: 199, Seção: 1, Página: 11-12, 2018.

Chen, L.; Daniel, RM; Coolbear, T. Detecção e impacto da protease e atividades de lipase em leite e leite em pó. *International Dairy Journal* , v.13, p. 255-275, 2003.

De Jonghe, V. A.; Coorevits, K.; Van Hoorde, W.; Messens, A.; Van Landschoot, P.; De Vos.; Heyndrickx, M. Influência das condições de armazenamento no crescimento de espécies de *Pseudomonas* em leite cru refrigerado. *Aplic. Ambiente. Microbiol.* 77:460-70, 2011.

De Kruif, C. G., Holt C. Casein micelle structure, functions, and interactions, em: *Advanced Dairy Chemistry - 1. Proteins. Part A*, pp. 233– 270. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney. Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA. 2003.

De Kruif, Cornelis G. et al. Casein micelles and their internal structure. *Advances in colloid and interface science*, v. 171, p. 36-52, 2012.

Dziezak, J. D. Phosphates improve many foods. *Food Technology*, v. 44, p. 80-92, 1990.

Federação internacional de leite. Leite: determinação de nitrogênio Contente. Bruxelas: 1993. 12 p. (fil 20b: 1993).

Fox, P. F.; Mcsweeney, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London, U.K: Blackie Academic and professional Press, 1998.

Fox, P.F.; Brodkorb, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance *International Dairy Journal*, v.18, p.677-684, 2008.

Gaucher, I.; Tanguy, G.; Fauquant, J.; Jardin, J.; Rousseau, F.; Roberto, B.; Madec, M.; Gaucheron, F. Proteólise de micelas de caseína por *Pseudomonas fluorescens* CNRZ 798 contribui para a desestabilização do leite UHT durante sua armazenar. *Dairy Science and Technology*, v. 91, p. 413-429, 2011.

Gaucheron, F. The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, v. 45 p. 473–483, 2005.

Horne, D. S. Casein micelle structure and stability, em: *Milk Proteins: expression to food*, New Zealand: Thompson A., Boland., Singh H. Elsevier Inc, 2009. p. 133-162

Horne, D.; Parked, T.; Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. IV Effects of forewarming. *Journal of Dairy Research*, v.48, p. 405- 415, 1981.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 1020.

ICMSF(International Commission on Microbiological Specifications for Foods). *Microrganismos de los alimentos. 1.Técnicas de análisis microbiológico*. Zaragoza: Acribia. 804p., 1994.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Tabelas de composição de

alimentos. Rio de Janeiro, 5 ed. 1999. 137p.

International Organization for Standardization. ISO 22412: Particle size analysis - Dynamic light scattering (DLS). Geneve: ISO, 2017. Disponível em: . Acesso em: 20 jun. 2017.

International Standards Organization - ISO 8967, 2ª edição, 15 de dezembro de 2005 - Leite em pó e produtos de leite em pó Determinação da densidade aparente.

International Standards Organization - ISO. ISO 1736/IDF 009:2008. Dried milk and dried milk products. Determination of fat content. Gravimetric method (Reference method). Geneva, 2008. 14 p. (a)

Jay, J. M.; Loessner, M. J.; Golden, D. A. Modern Food Microbiology. 7º ed. Springer Science and Business Media, Inc., New York, p. 395-409, 2005.

Kaliappan, S.; Lucey, J. A. Influence of mixtures of calcium-chelating salts on the physicochemical properties of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, v.94, p. 4255–4263, 2010.

Kelly, A. L; Datta, N.; Deeth, H. C. Thermal processing of dairy products. Taylor: Francis Group LLC. 2006. p 265-298.

Lewis, M. J. The measurement and significance of ionic calcium in milk – A review. *International Journal of Dairy Technology*, v.64, p. 1-13, 2011.

Lucey, J. A.; Horne, D. S. Milk salts: technological significance, in: *Advanced Dairy Chemistry – 3. Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, New York, USA: Springer Science Business Media, LLC, 2009. p 351-389.

Machado, S. G.; Baglinière, F.; Marchand, S.; Coillie, E. V.; Vanetti, M. C. D.; De Block, J.; Heyndrickx, M. A biodiversidade da microbiota produzindo enzimas resistentes ao calor responsáveis pela deterioração em leite bovino e produtos lácteos. *Frente. Microbiol.* 8: 30, 2017.

Martins, M. L.; Araújo, E. F.; Matovani, H. C.; Moraes, C. A.; Vanetti, C. A. Detecção do gene apr em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado. *Int. J. Microbiol Alimentar*. pp. 203 – 211, 2005.

Mckellar, R.C.; Shamsuzzamao, K. José, C. S.; Cholette, H. Influência de ferro (III) e pioverdina na produção de proteinase e lipase extracelular por *Pseudomonas fluorescens* B52. *Arco. Microbiol.* 147:225-230, 1987.

McPhee, J.D.; Griffiths, M. W. Bactérias psicrotróficas. *Pseudomonas* spp. Na Enciclopédia de ciências do leite. Fuquay, J. W.; Fox, P. F.; Mcweeney, P. L. H. editores. Imprensa Acadêmica. 379-383. 2011.

Melo Junior, A. S. Influência da contagem de células somáticas e micro-organismos psicrotróficos na gelificação e sedimentação do leite UAT. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, p.77, 2005.

Morita, R.Y. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39:144–167, 1975.

Nero, L.A.; Da Cruz, A.G.; Bersot, L.S. Produção, Processamento e Fiscalização de Leite e Derivados. Editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, 2017.

Netto, G; G. Efeito da pré-incubação de *pseudomonas fluorescens* em diferentes temperaturas de refrigeração sobre a hidrólise de caseína no leite desnatado pasteurizadomicrofiltrado. Viçosa, 2012.

Nicodème, M.; Grill, J. P.; Humbert, G.; Gaillard, J. L. Extracelular atividade proteásica de diferentes cepas de *Pseudomonas*: dependência de atividade proteolítica em condições de cultura. *J. Appl. Microbiol.* 99:641-8, 2005.

Nielsen, S. S. Rheological principles for food analysis. In Food analysis, (2nd ed., pp. 553–569). AspenPublishers , 1998.

O'Connell, J. E.; Saracino, P.; Huppertz, T. Influence of ethanol on the heat induced coagulation of milk. *Journal of Dairy Research*, v. 73, p. 312-317, 2006.

Pastorino, J.; Hansen, C. L.; McMahon, D. J. Effect of sodium citrate on structure-function relationships of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.3113–3121, 2003.

Perrone, T. I.; Carvalho, A. F.; Pereira, J. P. F.; Stringueta, P. C.; Silva, P. H. F. Leite em pó desnatado, soro em pó e misturas de leite e soro em pó obtidos em minispray dryer: análise de isoterma e aplicação do modelo de bet. Cândido Tostes, 2011.

Pinheiro, A. J. R.; Mosquim, M. C. A. V. Apostila: Processamento de leite de consumo. Departamento de Tecnologia de Alimentos. UFV: Viçosa, 1991.

Pinto, C. L. O. Bactérias psicotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção de leite UHT. Tese Universidade Federal de Viçosa. 97 p, 2004.

Prakash, S.; Datta, N.; Lewis, M.; Deeth, H.; Reducing fouling during UHT treatment of goat's milk. *Milchwissenschaft*, v. 62, p. 16-19, 2007.

Rajmohan, S.; Dodd, C. E. R.; Waites, W. M. Enzimas de isolados de *Pseudomonas fluorescens* envolvida na deterioração de alimentos. *J. Appl. Microbiol.*93:205-213, 2002.

Rasolofo, E.A. D.; St-Gelais.; LaPointe, G.; Roy, D. Análise molecular da estrutura e dinâmica da população bacteriana durante o armazenamento refrigerado de leite não tratado e tratado. *Int. J. Microbiol Alimentar*. 138:108-18, 2010.

Ribeiro, M. E. R; Barbosa, R. S.; Fischer, V.; Stumpf Junior, W.; Barros, L. Método de determinação de cálcio iônico no leite bovino. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 18 p. 2010. (Documento 321).

Rodrigues, E. K. F. R. Alterações nas propriedades físico-químicas do leite esterilizado adicionado de estabilizantes durante a estocagem. 2012.

Samaržija, D.; Zamberlin, Š.; Pogačić, T. Bactérias psicotróficas e qualidade do leite

e produtos lácteos. *Mljekarstvo* . 62:77-95, 2012.

Silva, P. H. F. Leite UHT: Fatores determinantes para sedimentação e gelificação. Juiz de Fora, MG, 2004.127p.

Silva, P. H. F. Leite UHT: fatores determinantes para a sedimentação e gelificação 2003. 147f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - UFLA, Lavras, MG.

Silva, F. L.; Oliveira. B.; Maurício, E. F.; Gomes, E. R.; Perrone, I. T.; Carvalho, A. F.; Stephani, R. Monitoramento da distribuição do tamanho das partículas do leite integral e desnatado durante os processos de coagulação ácida ou enzimática. 2022.

Singh, H. Heat stability of milk. *International Journal of Dairy Technology*, v. 57, n. 2-3, p. 111-119, 2004.

Singh, H. Heat stability of milk. *International Journal of Dairy Technology*, v. 57, p.111-119, 2004.

Sørhaug, T.; Stepaniak, L. Psicotróficos e suas enzimas no leite e laticínios: aspectos de qualidade. *Tendências Food Sci. Technol.* 8:35-41, 1997.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO. NEPA/UNICAMP. T113. V.II. 2 ed. Campinas, 2006. 113 p.

Tanaka, M.; Suzuki, T.; Kotb, S.; Kamiya, Y. Relation of Calcium Activity in Milk and Milk Production of Holstein Cows in Hot Season. *AsianAustralian Journal Animal Science*. v. 24, p.1372 – 1376, 2011.

Tsioulpas, A.; Koliandris, A.S.; Grandison, A.S.; Lewis, M. J. Effects of stabiliser addition and in-container sterilisation on selected properties of milk related to casein micelle stability. *Food Chemistry* v.122, p.1027–1034, 2010.

Tsioulpas, A.; Koliandris, A.S.; Grandison, A.S.; Lewis, M. J. Effects of stabiliser addition and in-container sterilisation on selected properties of milk related to casein micelle stability. *Food Chemistry* v.122, p.1027–1034, 2010.

Udabage, P.; Mckinnon, I.R.; Augustin, M. A. A.Effects of Mineral Salts and Calcium Chelating Agents on the Gelation of Renneted Skim Milk. *Journal Dairy Science*, v. 84, p. 1569–1575, 2001.

Udabage, P.; McKinnon, I. R.; Augustin, M. A. A. Efeitos de sais minerais e agentes quelantes de cálcio na gelificação de leite desnatado coalho. *Diário Dairy Science* , v. 84, p. 1569-1575, 2001.

United States Department of Agriculture. Dairy: world markets and trade. United States: Author: Author. Retrieved from <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/fas/dairymarket//2010s/2012/dairy-market-12-14-2012>.

Vianna, P. C. B.; Walter, E. H. M.; Dias, M. E. F.; Faria, J. A. F.; Gigante, M. L. Effect of addition of CO₂ to raw milk on quality of UHTtreated milk. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 4256-4262, 2012.

Walstra, P.; Wouters, J. T. M.; Geurts, T. J. *Dairy Science and Technology*. 2nd ed. Taylor e Francis Group, USA, 2006.

Wehr H. M. W.; Frank, J. F. *Standard Methods for The Examination of Dairy Products*. In: American Public Health Association. 17th, Washington, 2004.

Woods, R.G.; Burger, M.; Beven, C.; Beacham, I. R. O aprX – lipA operon de *Pseudomonas fluorescens* B52: uma análise molecular de produção de metaloproteases e lipases. *Microbiologia* . 147:345-354, 2001.

Ye, R.; Harte, F. Casein maps: effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl₂ on the particle size of reconstituted casein micelles. *Journal of dairy science*, v. 96, n. 2, p. 79-805, 2013.