

JEAN VICTOR DOS SANTOS EMILIANO

**EVALUATION OF *Staphylococcus aureus* MULTIPLICATION  
DURING THE PRODUCTION OF WHEY POWDER**

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*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

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

T

E53e  
2019  
Emiliano, Jean Victor dos Santos, 1994-  
Evaluation of *Staphylococcus aureus* multiplication during  
the production of whey powder / Jean Victor dos Santos  
Emiliano. – Viçosa, MG, 2019.  
vii, 51 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em inglês e português.

Orientador: Ítalo Tuler Perrone.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Soro de leite - Microbiologia. 2. Soro de leite -  
Deterioração. 3. *Staphylococcus aureus*. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa  
de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
II. Título.

CDD 22. ed. 664.001579

JEAN VICTOR DOS SANTOS EMILIANO

**EVALUATION OF THE MULTIPLICATION OF *Staphylococcus aureus* DURING THE PRODUCTION OF WHEY POWDER**

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: 19 de fevereiro de 2019.

---

Antônio Fernandes de Carvalho

---

Evandro Martins

---

Rosângela de Freitas

---

Isis Rodrigues Toledo Renhe

---

Ítalo Tuler Perrone  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por acordar todos os dias e me dar forças para enfrentar todos os obstáculos, me proporcionado amigos e por ter colocado pessoas abençoadas no meu caminho!

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (PPGCTA/DTA) pela oportunidade de realização da minha pesquisa. Em especial ao laboratório Inovaleite, pela oportunidade e condição dada a realização das pesquisas.

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) concessão de bolsas de estudo.

Ao meu orientador Ítalo Tuler Perrone por depositar em mim toda confiança durante todo percurso acadêmico, pelos ensinamentos, conselhos, carinho.

Aos meus coorientadores, Antônio Fernandes de Carvalho, Evandro Martins e Rosângela de Freitas, sempre receptivos, por toda ajuda, ensinamentos e pelo profissionalismo.

Aos meus pais, José Carlos Emiliano e Filomena Aparecida dos Santos Emiliano, pelas orações, pelo amor, apoio e toda dedicação, tornando possível a concretização dos meus sonhos. Aos meus irmãos José Carlos Emiliano Junior e Gustavo dos Santos Emiliano, meu muito obrigado por todo companheirismo e amor ao longo desses anos. Aos meus familiares pelas orações e todo carinho.

Aos professores e amigos (Os Mais) do Instituto Federal de Educação do Sudeste de Minas Gerais, *Campus* Rio Pomba, mesmo sendo ex-aluno, obrigado pelo carinho, por toda amizade.

As minhas grandes companheiras nessa jornada que me deram todo apoio ao longo da pesquisa, Mirian e Nataly, muito obrigado por cada palavra de conforto. As minhas estagiárias, Carolina, Malvina, Merlinda, a ajuda de vocês foi espetacular para realização deste trabalho. Aos amigos do inovaleite, agradeço a Deus pela amizade. Desejo muito sucesso a vocês!

A meus amigos de república pela paciência e convivência ao longo de toda trajetória.

A todos que de alguma forma me ajudaram, meu muito obrigado.

## **BIOGRAFIA**

Jean Victor dos Santos Emiliano, filho de José Carlos Emiliano e Filomena Aparecida dos Santos Emiliano, nasceu em Ubá, Minas Gerais, em 04 de janeiro de 1994.

Em fevereiro de 2012 iniciou o curso de graduação em Tecnologia de Laticínios, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Campus Rio Pomba, concluído em fevereiro de 2015.

Em março de 2017 iniciou o mestrado no Programa de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, concluindo em fevereiro de 2019.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1. JUSTIFICATIVA .....	1
2. OBJETIVOS .....	2
2.1. OBJETIVO GERAL .....	2
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	2
CAPÍTULO 1: MICROBIOLOGIA DE PROCESSOS DURANTE A PRODUÇÃO DE SORO EM PÓ: POTENCIAL RISCO DA PRESENÇA DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
1. INTRODUÇÃO .....	4
2. SORO DE LEITE .....	6
3. EFEITO DAS OPERAÇÕES UNITÁRIAS SOBRE A MICROBIOTA NO SORO DE LEITE DURANTE A PRODUÇÃO DE SORO EM PÓ .....	9
3.1. RESFRIAMENTO .....	10
3.2. TRATAMENTO TÉRMICO .....	10
3.3. CONCENTRAÇÃO .....	11
3.4. CRISTALIZAÇÃO DA LACTOSE .....	12
3.5. SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO .....	12
4. SURTOS DE INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ASSOCIADO A SORO DE LEITE .....	15
5. MEDIDAS DE CONTROLE .....	16
5.1. TEMPERATURA .....	16
5.2. MICRO-ORGANISMOS COMPETIDORES .....	16
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	21
ABSTRACT .....	33
1. INTRODUCTION .....	34
2. MATERIAL AND METHODS .....	36
2.1. MICROORGANISMS AND PREPARATION OF THE MIXED CULTURE .....	36
2.2. SIMULATION OF WHEY POWDER PRODUCTION WITH CONTAMINATION OF <i>S. aureus</i> IN THE RAW MATERIAL .....	36
2.3. LACTOSE CRYSTALLIZATION STEP .....	37
2.4. DETERMINATION OF <i>S. aureus</i> .....	39
2.5. DATA ANALYSIS .....	40
3. RESULTS AND DISCUSSION .....	41

3.1. CONDITION 1: WHEY CONTAMINATED WITH <i>S. aureus</i> .....	41
3.2. CONDITION 2: RECONTAMINATION OF THE FLUID MILK BY WHEY BIOFILMS .....	45
4. CONCLUSION.....	47
BIBLIOGRAPHIC REFERENCES.....	48

## RESUMO

EMILIANO, Jean Victor dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Avaliação da multiplicação de *Staphylococcus aureus* durante a produção de soro em pó.** Orientador: Italo Tuler Perrone.

O soro de leite já foi considerado uma matéria prima de aproveitamento oneroso para a indústria de lácteos e por este motivo era muitas vezes descartado no ambiente sem nenhum controle. Com as regulamentações ambientais rigorosas que proíbem o descarte inadequado no meio ambiente de produtos com alta demanda biológica de oxigênio, somado às comprovações científicas do alto valor nutricional dos constituintes do soro, esse produto passou a ser amplamente beneficiado e, atualmente, é requisitado como ingrediente na indústria de alimentos. O soro de leite não processado (cru) é altamente perecível, assim deve ser mantido refrigerado para preservar sua qualidade microbiológica. Este coproduto pode atuar como substrato para multiplicação de micro-organismos contaminantes, assim como *Staphylococcus aureus*, principalmente se for mantido em condições de armazenamento e temperatura favoráveis. Considerando que *S. aureus* é uma espécie microbiana patogênica, apresentando cepas produtoras de enterotoxina, o produto (soro em pó, por exemplo) e os alimentos fabricados com soro em pó como ingrediente podem apresentar esta substância ocasionando problemas de saúde pública. Durante o beneficiamento do soro em pó, várias são as etapas onde este microrganismo pode ser incorporado ao produto devido a falhas de processo, como deficiências nos processos higiênicos. A produção de soro em pó é dirigida pela qualidade da matéria-prima, condições utilizadas durante a fabricação do produto e contaminação pós-processamento. Portanto, durante e após o processamento, a eficácia no controle da temperatura, condições higiênicas satisfatórias, assegura a manutenção da qualidade do soro em pó.

## ABSTRACT

EMILIANO, Jean Victor dos Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Evaluation of *Staphylococcus aureus* multiplication during the production of whey powder.** Adviser: Italo Tuler Perrone.

In past years, whey exploitation has been considered onerous for the dairy industry. For this reason, it was often discarded in the environment without any control. Recently, the food industry became more interested in whey. It was due to the prohibition of inappropriate disposal of products with high biological oxygen demand by more strict environmental laws, summed to new scientific evidences about the high nutritional value of the whey constituents. Raw whey must be kept refrigerated to preserve its microbiological quality, once it is highly perishable. This co-product can act as substrate for the microorganism's multiplication, including *Staphylococcus aureus*, especially if the whey is maintained in favorable storage and temperature conditions. *S. aureus* is a pathogenic microbial species with enterotoxin producing strains. Therefore, the product (whey powder, for example) and foods manufactured with whey powder as an ingredient may present this substance, which causes public health problems. There are several steps during the production of whey powder and this microorganism can be incorporated into the product due to process failures, such as deficiencies in the hygienic processes. The production of whey powder is driven by the quality of the raw material, conditions used during product manufacturing and post-processing contamination. Therefore, during and after the processing, the effectiveness in the temperature control and satisfactory hygienic conditions ensure the maintenance of the quality of the whey powder.

# INTRODUÇÃO GERAL

## 1. JUSTIFICATIVA

O Estado de Minas Gerais é o maior produtor de leite e de queijos no Brasil, sendo por consequência o maior produtor de soro. O parque industrial do Estado foi ampliado nos últimos 10 anos, tendo sido feitos investimentos em plantas de secagem para produção de soro em pó. Destacam-se os investimentos realizados nas fábricas da Barbosa e Marques, Laticínios Porto Alegre, Kerry do Brasil, Cooperativa dos Produtores de Leite de Leopoldina – LAC, Itambé S/A e Lactalis. Desta forma, o Estado de Minas Gerais é potencial para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas ao processamento do soro.

No passado, o soro de leite já foi considerado uma matéria prima onerosa para indústria láctea. Hoje em dia, devido a rigorosas normas ambientais que proíbem o descarte em meio ambiente de produtos com alta demanda biológica de oxigênio, com a demonstração científica da qualidade nutricional de seus componentes (proteínas, lactose) o soro de leite é amplamente demandado como ingrediente ou como precursor de ingredientes.

Apesar das possibilidades encontradas pelo setor industrial na elaboração de novos produtos à base de soro de leite, esse coproduto ainda é negligenciado por grande parte dos pequenos e médios produtores rurais no Brasil. Desta maneira, o soro de leite recolhido em propriedades rurais apresenta baixa qualidade para processamento devido ao elevado número de micro-organismos deterioradores e patogênicos presentes na matéria-prima.

O soro em pó é amplamente empregado na indústria de alimentos como ingrediente na formulação de diversos produtos. Destaca-se a utilização do soro na produção de fórmulas infantis, nas quais objetiva-se aumentar o teor de lactose a valores próximos ao do leite materno (7,1%). A produção de fórmulas infantis é um forte mercado, atualmente principalmente visando à exportação para a China e em 2050 para a África.

O processo de produção do soro em pó depende da etapa de cristalização da lactose, na qual o produto concentrado permanece entre 4 a 24 h sob agitação em temperaturas próximas a 25° C. Sob estas condições pode ocorrer a formação de biofilmes bacterianos, em especial de espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. A literatura científica demonstra que a alta densidade populacional de espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus* pode promover a produção de enterotoxina estafilocócica em alimentos.

Poucos estudos sobre a presença de *S. aureus* em soro foram conduzidos até o momento devido à pouca importância dada a esse coproduto da produção de queijo. Entretanto, o crescente processamento do soro pela indústria de alimentos tem motivado pesquisas relacionadas à melhoria da sua qualidade microbiológica.

Essa dissertação está organizada da seguinte forma: primeiro, um capítulo trazendo uma revisão de literatura que apresenta e descreve sobre a microbiologia de processos durante a produção de soro em pó com o potencial risco da presença de *S. aureus*, destacando as principais operações unitárias na produção de soro em pó, trazendo também, dados relevantes sobre surtos de intoxicação alimentar e medidas de controle relacionado a esse patógeno. Em seguida, um capítulo dedicado à parte experimental do trabalho, em que o material e método, os resultados e discussão dos mesmos e as conclusões são trazidos sob a forma de um manuscrito de artigo, a ser submetido a um periódico de alto impacto na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos e por fim as conclusões gerais na qual se relacionou os principais resultados do trabalho com novas perspectivas para a área.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar em escala laboratorial a multiplicação de *S. aureus* durante a produção de soro em pó.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- i. Avaliar a contagem de células de *S. aureus* após a pasteurização, concentração a vácuo, cristalização da lactose e secagem por atomização.
- ii. Verificar através da curva de crescimento se *S. aureus* é capaz de multiplicar nas condições de cristalização da lactose (25° C / 12 h).
- iii. Analisar a formação de biofilme na etapa de cristalização nos tempos 4, 8 e 12 h.
- iv. Avaliar o potencial de biotransferência de *S. aureus* aderida em aço inoxidável para o meio de cultivo (soro de leite concentrado).

**CAPÍTULO 1: MICROBIOLOGIA DE PROCESSOS DURANTE A  
PRODUÇÃO DE SORO EM PÓ: POTENCIAL RISCO DA  
PRESENÇA DE *Staphylococcus aureus***

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de queijos no mundo foi de aproximadamente 862 mil toneladas no ano de 2018 alcançando um volume de 2,7 milhões de toneladas de soro de leite nesse ano (USDA, 2018). O soro de leite representa cerca de 85 % do volume total do leite utilizado durante a produção de queijos e contém aproximadamente 55 % dos nutrientes presentes na matéria prima (ALMEIDA, BONASSI & ROÇA, 2001).

Apesar do elevado volume de soro de leite produzido anualmente no Brasil, o seu beneficiamento requer a aplicação de tecnologias ainda não adaptadas à realidade nacional. O processo de industrialização do soro requer a utilização de instalações industriais complexas, o que demanda um investimento financeiro relevante e um volume mínimo de matéria-prima que justifique o investimento (ALVES, 2014).

Grande parte do soro de leite gerado no Brasil tem origem nas operações de pequenas e médias queijarias e, apesar das possibilidades encontradas pelo setor industrial na elaboração de novos produtos à base de soro de leite, esse coproduto ainda é negligenciado por grande parte dos pequenos e médios produtores rurais no Brasil. Durante a produção de queijo, sob condições de manipulação e armazenamento insatisfatória, pode inferir-se que *S. aureus* pode se multiplicar nessas condições, conseqüentemente, a incidência deste patógeno em soro de leite também é elevada. Altas contagens microbianas em soro de leite são justificadas pela ineficiência das práticas higiênicas assim como a manutenção do soro em temperaturas desapropriadas de armazenamento (MONTEL *et al.*, 2014).

*S. aureus* é encontrado no ambiente na forma de biofilmes, assim como na pele e nas mucosas de humanos e animais (HAMADI *et al.*, 2014). A contaminação de produtos lácteos com este patógeno pode ocorrer diretamente pelo contato do leite com o animal infectado ou em razão de prática higiênica precária durante o processo de produção, distribuição e, ou estocagem. Por esses motivos, esse patógeno está frequentemente presente em produtos lácteos e no ambiente de processamento, muitas vezes, associado a surtos de intoxicação de origem alimentar.

O soro de leite pode funcionar como um substrato para *S. aureus*, sobretudo quando armazenado em temperaturas que favoreçam a multiplicação deste patógeno (COSTA, 2012; MEHLI *et al.*, 2017). Por esse motivo, a produção e acúmulo de enterotoxinas estafilocócicas em soro de leite é passível de ocorrer. Nos anos de 1950, a contaminação de leite em pó com enterotoxina estafilocócica era um problema significativo, muitas vezes causado pela

multiplicação de *S. aureus* e produção de enterotoxinas no leite cru antes do tratamento térmico ou no leite concentrado antes da secagem (ANDERSON & STONE, 1955; ARMIJO *et al.*, 1957).

Melhorias na higiene durante a manipulação e no controle da temperatura antes da secagem têm, em grande parte, eliminado este problema. Todavia em 1986, vários focos de contaminação foram associados ao consumo de leite em pó desnatado (CARVALHO *et al.*, 2016). Análise de amostras não apresentaram patógenos viáveis, mas enterotoxina estafilocócica tipo A e B foram encontrados em concentrações suficientemente elevadas para causar a doença (EL-DAIROUTY, 1989). Em 2000, foi relatado no Japão um grande surto de intoxicação alimentar ocasionado pelo consumo de leite em pó desnatado reconstituído. O surto foi causado por enterotoxinas estáveis ao calor produzidas por *S. aureus* (ASAO *et al.*, 2003).

A literatura científica demonstra que a alta densidade populacional de espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus* pode promover a produção de enterotoxina estafilocócica em alimentos. Contudo, trabalhos que buscam elucidar a presença de enterotoxina estafilocócica em soro concentrado e em pó não foram descritos até o momento. Dentro deste contexto, este capítulo tem como objetivo apresentar uma revisão bibliográfica da microbiologia de processos durante o processamento de soro em pó com destaque em *S. aureus*. O conhecimento gerado por essa abordagem permitirá a criação de estratégias de controle da multiplicação de *S. aureus* e da produção de enterotoxina estafilocócica em soro de leite.

## 2. SORO DE LEITE

Segundo o *Codex Alimentarius* (2003), o soro de leite pode ser definido como: “Produto lácteo líquido extraído da coagulação do leite utilizado no processo de fabricação de queijos, caseína e produtos similares. Pode ser apresentado na forma líquida, concentrada ou em pó” (BRASIL, 2013). O soro de leite é um coproduto da indústria de laticínios que representa a porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação de queijo ou da caseína (ALVES *et al.*, 2014). A composição do soro de leite é, em média, 93 % de água, 5 % de lactose, 0,7 a 0,9 % de proteínas, 0,3 a 0,5 % de gordura, 0,2 % de ácido láctico e pequenas quantidades de vitaminas (OLIVEIRA, BRAVO & TONIAL, 2012).

Em relação à classificação, o soro doce pode ser oriundo da coagulação enzimática do leite, em pH entre 6,2-6,4 pela adição de enzimas de origem microbiana, vegetal ou animal, como a quimosina por exemplo. O soro ácido é obtido durante a fabricação de queijos após a coagulação ácida do leite pela adição de ácidos láctico, acético, cítrico ou por meio de adição de fermento láctico, em pH menor que 6,0 (BRASIL, 2013). Os tipos de soro obtidos pelos dois diferentes processos de coagulação apresentam composições diferentes, como pode ser visto na Tabela 1.

**Tabela 1** - Composição típica de soro doce e ácido

Componentes	Soro doce (g/L)	Soro ácido (g/L)
Sólidos totais	63,0-70,0	63,0-70,0
Lactose	46,0-52,0	44,0-46,0
Proteína	6,0-10,0	6,0-8,0
Cálcio	04,0-0,6	1,2-1,6
Fosfato	1,0-3,0	2,0-4,5
Cloreto	1,1	1,1

Fonte: Adaptado de Kosseva *et al.* (2009).

A concentração de lactose é menor no soro ácido comparado ao soro doce, em virtude do processo de fermentação na produção de soro ácido, em que uma fração da lactose é transformada em ácido láctico durante a formação do coalho (ALVES *et al.*, 2014). Por outro lado, o soro ácido contém maior teor de cálcio e fósforo que o soro doce, associado à solubilização do complexo cálcio-fósforo existente nas micelas de caseína em pH ácido (ALVES *et al.*, 2014). No Brasil, a produção é constituída quase que exclusivamente de soro

doce, oriundo da fabricação de queijos por coagulação enzimática (muçarela, prato, minas frescal, e outros), que são os mais comercializados no país (CARVALHO *et al.*, 2007).

O soro de leite vem ganhando espaço no cenário de inovação em produtos lácteos, sendo adaptado a diferentes aplicações como ingrediente, justificando seu uso em diversos alimentos processados (CARDOSO, 2014). A *Mordor Intelligence* LLP divulgou um relatório revelando que a economia do soro de leite alcançou US\$ 1,8 milhões em 2014 e deverá atingir US\$ 2,7 milhões até 2020. Outro relatório, *Research and Markets* afirma que o mercado de soro de leite deverá crescer 5,5 % até 2019 (FIEP, 2018).

De acordo com Bieger e Rinaldi (2009), uma inovação tecnológica na cadeia de produção do leite é a transformação do soro de leite para insumo, levando-se em consideração a responsabilidade ambiental, que vem ganhando cada vez mais espaço nas indústrias. Esta mudança gera uma nova fonte de renda para o setor industrial convertendo o soro de leite em matéria-prima com destino a fabricação de outros produtos, justamente pelo seu alto teor de lactose e proteína melhorando a eficiência econômica das indústrias de laticínios.

Segundo Santos e Ferreira (2001), a procura do consumidor por produtos mais saudáveis, inovadores, seguros e de utilização prática tem contribuído para o crescimento da produção das bebidas lácteas. No Brasil, no ano de 2016, foram produzidos 1,19 milhões de toneladas de bebida láctea (MAPA, 2016) sendo uma alternativa para o aproveitamento do soro de leite, pois apresenta baixo custo, facilidade de processamento, além de ser possível o uso dos equipamentos já existentes na indústria (PINTADO *et al.*, 2001).

Outras alternativas incluem a fabricação de ricota, isolados proteicos e a produção de soro em pó destinado a fabricação de fórmulas infantis (CANCINO, ESPINA & ORELLANA, 2006). Segundo Perrone (2017), com o aumento no consumo de fórmulas infantis obtém-se demanda mundial crescente por lactose o que tem como consequência direta o maior interesse pela principal fonte de lactose: o soro.

O soro de leite é considerado um meio favorável para o desenvolvimento de micro-organismos devido a fatores como pH, alta atividade de água e quantidade significativa de nutrientes. Este coproduto possui uma microbiota muito diversificada podendo ser composta de micro-organismos deteriorantes, patógenos e até mesmo bactérias benéficas com grande importância tecnológica (MONTEL *et al.*, 2014). A diversidade microbiana pode ser influenciada pelas condições sanitárias do rebanho leiteiro, higiene ambiental e pessoal, equipamentos utilizados, e fatores relacionados ao manuseio, armazenamento, resfriamento

e processamento do soro de leite (MURPHY, MARTIN, BARBANO & WIEDMAN, 20016).

Este coproduto pode estar contaminado com micro-organismos provenientes de animais doentes (*Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Staphylococcus aureus*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*) ou ainda presentes em biofilmes, utensílios, equipamentos e ambiente de processamento (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Cronobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*) (CAN e ÇELIK, 2012; VISSERS e DRIEHUIS, 2009).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família Micrococcaceae e apresentam-se como cocos Gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 a 1,5 micrometro, imóveis, isoladas ou agrupadas em cachos e são anaeróbias facultativas (CHAPAVAL, 2003). Este patógeno é capaz de se desenvolver em uma ampla faixa de temperatura (7 °C a 48,5 °C, com temperatura ótima de 30 °C a 37 °C), pH variando entre 4,2 e 9,3, com ótimo entre 7 a 7,5 (SANTANA, BELOTI, ARAGON & MENDONÇAL, 2010).

Quanto à atividade de água ( $a_w$ ), os estafilococos são únicos em sua capacidade de se multiplicarem em alimentos com valores de atividade de água inferiores ao normalmente considerados mínimos para outras bactérias. O valor mínimo de  $a_w$  é 0,86, apesar de já ter sido relatada a multiplicação desses micro-organismos em alimentos com  $a_w$  de 0,83 (WONG *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2005).

*S. aureus* é um patógeno de grande preocupação em alimentos devido a capacidade de certas cepas produzirem enterotoxinas estafilocócicas que, uma vez ingeridas, podem levar a sintomas de distúrbios gastrintestinais, como vômitos, náuseas e cólicas abdominais (ARGUDÍN *et al.*, 2010; SCHELIN *et al.*, 2011). Apesar de melhorias notáveis nos procedimentos de segurança alimentar, a enterotoxina estafilocócica ainda figura como uma das principais causas de surtos de origem alimentar, frequentemente relacionados com a ingestão de leite e produtos lácteos contaminados (EFSA, 2016).

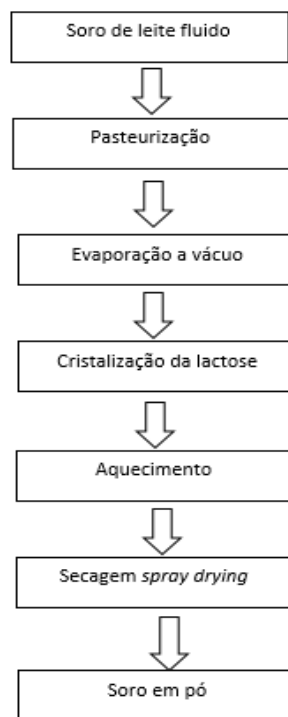
Estudos apontam que a incidência de *S. aureus* em queijos frescos produzidos na região de Minas Gerais pode ultrapassar a 90 % (LOGUERCIO e ALEIXO; FERREIRA *et al.*, 2011) e, apesar de não haver dados precisos, podemos sugerir que a incidência *S. aureus* em soro de leite é também elevada. As medidas simples como a adoção das Boas Práticas de Fabricação (BPF) seriam eficientes para reduzir a presença desse patógeno em queijos frescos e conseqüentemente no soro de leite (SPANU *et al.*, 2012).

### **3. EFEITO DAS OPERAÇÕES UNITÁRIAS SOBRE A MICROBIOTA NO SORO DE LEITE DURANTE A PRODUÇÃO DE SORO EM PÓ**

A microbiologia do processamento de leite e derivados é dirigida pela qualidade da matéria-prima, as condições utilizadas durante a fabricação do produto e a contaminação pós-processamento. A qualidade higiênico-sanitária do soro de leite cru assume importância primordial no processamento de soro em pó. Alguns micro-organismos esporulados e termodúricos podem sobreviver aos tratamentos térmicos e comprometer a qualidade do produto, sendo vulnerável à deterioração ou contaminação por agentes patogênicos ou toxinas microbianas (FERNANDES, 2009).

O soro de leite é um coproduto que exige refrigeração e manuseio adequado visando garantir sua qualidade microbiológica. Além disso, este coproduto pode ser preservado por meio da concentração por eliminação de água, utilizando-se calor ou tecnologia de membrana, seguido por secagem. Sendo assim, essas etapas conferem vantagens em termos de redução de custos de armazenamento e transporte, conveniência de uso, otimização de processos industriais, obtenção de produtos diferenciados e, em alguns casos, maior estabilidade (CARVALHO, 2016).

Uma vez recebido na usina de processamento, o soro de leite destinado à produção de soro em pó passa por uma série de operações que envolvem resfriamento, tratamentos térmicos, concentração e secagem (Figura 1). Essas operações permitem a inibição da multiplicação microbiana, remoção ou morte dos micro-organismos (VIÇOSA *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2011).



**Figura 1** - Fluxograma da produção de soro de leite em pó  
 Fonte: Adaptado Boschi *et al.* (2006)

### 3.1. RESFRIAMENTO

Após a obtenção, o soro de leite deve ser mantido sob refrigeração a 4 °C para controlar a multiplicação da microbiota presente até o tratamento térmico. Segundo Húngaro (2014), o declínio da temperatura ocasiona uma extensão do tempo de latência nos micro-organismos presente nos alimentos, culminando com o aumento do prazo de validade.

A maioria das bactérias patogênicas que podem ser encontradas no soro de leite são inibidas pela temperatura de armazenamento (a 4 °C) do produto. *S. aureus*, patógeno identificado em soro de leite, apresenta capacidade de multiplicação em temperaturas entre 7 °C e 48 °C. Os limites de temperatura para a produção de enterotoxinas estafilocócicas não se sobrepõem aos da replicação deste patógeno, em geral, essas enterotoxinas são produzidos em alimentos a temperaturas que variam de 10 °C a 46 °C (BHUNIA, 2008, SCHELIN *et al.*, 2011), sendo assim, a refrigeração é capaz de inibir a multiplicação deste patógeno e a produção de enterotoxina estafilocócica em soro de leite.

### 3.2. TRATAMENTO TÉRMICO

O tratamento térmico tem objetivo de inativar micro-organismos patogênicos, deterioradores e enzimas (LEWIS *et al.*, 2009). É, normalmente, definido em função dos parâmetros cinéticos de resistência térmica de um determinado micro-organismo alvo,

geralmente patogênico e da sensibilidade ao calor na qualidade do produto. A vida útil do alimento pasteurizado é determinada pelo tratamento térmico aplicado, processo complementar de conservação e das condições de estocagem (LIMA *et al.*, 2016).

Segundo o *Codex Alimentarius* (2003), a pasteurização no soro de leite deverá ser realizada a 72 – 75 °C durante 15 a 20 segundos, seguida de refrigeração a 5 °C. Caso o soro seja imediatamente submetido ao processo de secagem ou evaporação a refrigeração poderá ser dispensada. O tempo de espera neste caso não deverá ser superior a 4 horas (BRASIL, 2013). Uma população microbiana pode ser capaz de resistir à pasteurização e permanecer no produto final. Esses micro-organismos são chamados de termodúricos e incluem espécies de *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Corynebacterium* (TOUCH *et al.*, 2009).

Nascimento *et al.*, (2012) encontraram resultados para amostras de soro de leite pasteurizado, apresentando contagem desse micro-organismo de  $1,2 \times 10^3$  UFC·mL<sup>-1</sup>. Santos *et al.*, (1999) avaliaram 167 amostras de leite pasteurizado submetidas à pesquisa de *S. aureus*, sendo que 24 dessas amostras apresentaram resultado positivo,  $> 1,9 \times 10^3$  UFC·mL<sup>-1</sup>. A eficiência da pasteurização é condicionada a fatores como tipo da matriz alimentar, densidade populacional do patógeno e variações genéticas do micro-organismo (HUCK, SONNEN, & BOOR, 2008).

### 3.3. CONCENTRAÇÃO

A concentração do soro de leite por evaporação a vácuo geralmente é aplicada como etapa intermediária para produção de soro em pó, já que a remoção da água por evaporação a vácuo requer menor energia do que por secagem em *spray drying* (WALSTRA *et al.*, 2006). Essa etapa possibilita a concentração do soro a teores de sólidos lácteos entre 50 % e 60 % (m·m<sup>-1</sup>) a temperaturas entre 45 e 70 °C (CARIC' *et al.*, 2009; SCHUCK *et al.*, 2010). A faixa de temperatura utilizada nos evaporadores não é suficiente para garantir a segurança microbiológica do produto o que torna necessária a aplicação do pré tratamento térmico como pasteurização.

De acordo com Walstra *et al.* (2001), as principais modificações causadas pela concentração do soro de leite são: redução da atividade de água; aumento da higroscopicidade; mudanças no equilíbrio salino; modificação na conformação das proteínas; aumento da pressão osmótica; aumento da viscosidade; saturação da solução e tendência a cristalização da lactose. No processamento de soro é fundamental que se busque

uma elevada concentração de sólidos lácticos ao final da evaporação, no intuito de minimizar o gasto energético na câmara de secagem, e, principalmente visando a saturação do produto em relação à lactose, o que favorecerá a etapa posterior de cristalização (PERRONE *et al.*, 2011).

#### 3.4. CRISTALIZAÇÃO DA LACTOSE

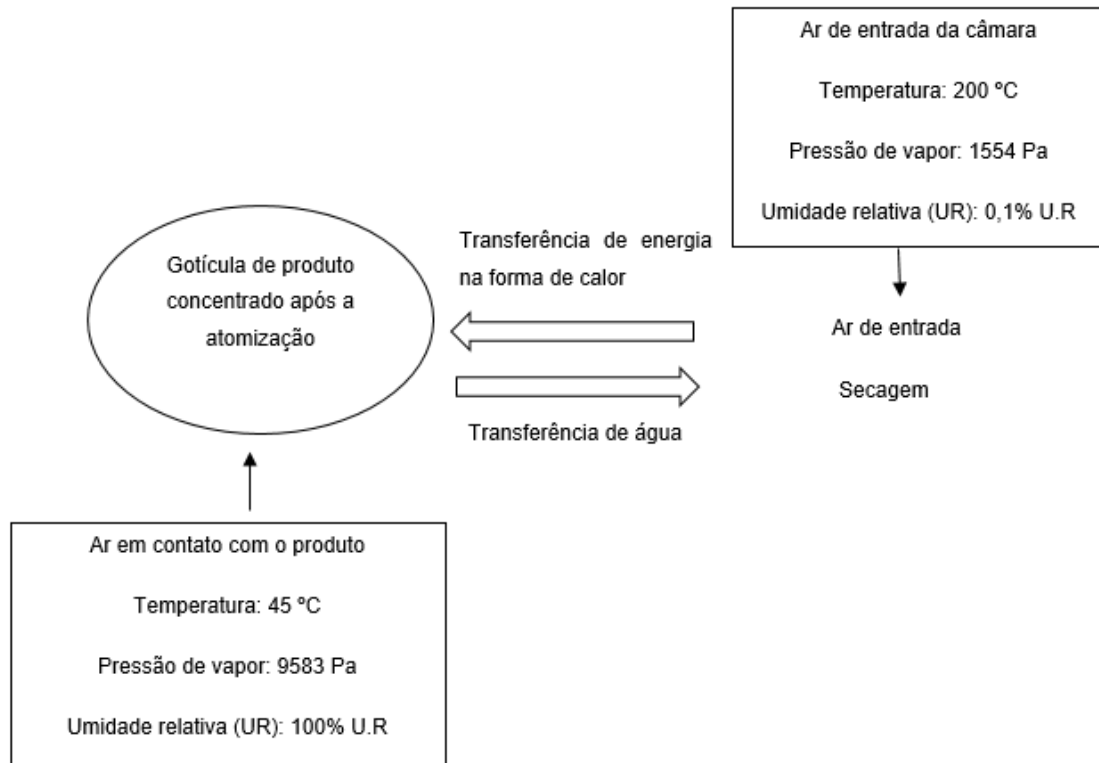
A cristalização do soro concentrado pode ser realizada ou não pela adição de núcleos de cristais, lactose microcristalina ou soro em pó, seguida de agitação e controle da temperatura (PERRONE, 2010). Segundo Masters (2002), o soro em pó, quando obtido sem prévia cristalização, é um pó muito fino, higroscópico e com grande tendência a agregação de partículas coloidais, o que se deve à presença de lactose em grandes concentrações na matriz em um estado vítreo ou amorfo, que ao submeter à remoção rápida do solvente em equipamentos como *spray dryer*, a lactose passa para um estado gomoso (transição vítrea), acarretando a agregação das partículas do pó (empedramento), fazendo-se portanto necessária a cristalização prévia da lactose.

No ponto de vista microbiológico, a cristalização da lactose é uma etapa crítica do processamento de soro de leite em pó uma vez que o produto é mantido em temperatura ambiente por longos períodos (4 a 24 h) sob agitação em temperaturas próximas a 25 °C (SIMEÃO, 2016). Sob estas condições pode ocorrer a formação de biofilmes bacterianos, em especial de espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus* com contagem acima de  $10^5$  UFC·cm<sup>2</sup> (JUNIOR *et al.*, 2011). Dessa maneira, uma recontaminação com *S. aureus* durante essa etapa pode comprometer a segurança microbiológica do soro em pó. Sabe-se que, em determinadas condições, os micro-organismos podem se depositar, aderir e interagir com as superfícies, iniciando o processo de multiplicação celular (HAMADI *et al.*, 2013). Compreender os processos de formação, estrutura e composição dos biofilmes microbianos é fundamental para desenvolver estratégias de controle efetivas e entender o risco que estes representam para a indústria de alimentos (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI, 2010).

#### 3.5. SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO

Na produção de soro em pó, várias técnicas podem ser empregadas na desidratação do soro fluido, entretanto, a secagem por atomização ou *spray drying* é amplamente utilizada na indústria de laticínios. O princípio da secagem de um líquido em *spray drying* consiste em pulverizar o produto no interior de uma câmara de secagem, na forma de pequenas gotículas, contendo uma corrente de ar quente (SILVA *et al.*, 2017).

Quando um produto é submetido a uma corrente de ar com baixa umidade relativa (pressão de 1554 Pa) e temperatura elevada (em média 200 °C), espontaneamente é formada uma diferença de temperatura e pressão parcial da água entre o alimento e o ar e, conseqüentemente, ocorrerá uma transferência de energia na forma de calor do ar para o produto e uma transferência de água do produto para o ar (SCHUCK *et al.*, 2010), conforme a Figura 2.



**Figura 2** - Princípio da secagem por atomização

Fonte: Adaptado de Schuck *et al.*, (2010)

Segundo Schuck (2009), esta etapa de atomização é diretamente responsável por conferir vantagens na produção de soro em pó pela secagem em *spray drying* como: curto tempo de secagem das gotículas do produto e de retenção das partículas em um ambiente com alta temperatura e produção de um pó desejado com grande estabilidade de armazenamento e transporte. Apesar do ar de secagem apresentar temperaturas elevadas (~200 °C), a água é evaporada rapidamente e as partículas atingem temperaturas relativamente baixas (~40 °C). Conseqüentemente, a secagem por atomização não é um procedimento que visa à eliminação de micro-organismos. O soro em pó possui atividade de água ( $a_w$ ) em torno de 0,2 que tem efeito bacteriostático sobre os micro-organismos presentes

no alimento. Portanto, o soro em pó é menos perecível que o produto fluido apresentando uma vida de prateleira mais longa devido à baixa atividade de água.

Segundo Bhunia *et al.* (2008), *S. aureus* é relativamente resistente à secagem. O valor mínimo de atividade de água para sua proliferação é 0,86 ou mesmo 0,83, podendo estar presentes no soro em pó e vir a se multiplicar no produto reconstituído. A enterotoxina estafilocócica é produzida a partir de um valor de  $a_w$  0,83 colocando em risco a saúde daqueles que irão consumir esse alimento (SCHELIN *et al.*, 2011).

#### 4. SURTOS DE INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ASSOCIADO A SORO DE LEITE

A ocorrência de surtos de intoxicação alimentar é um problema de saúde pública em todo o mundo (SANTANA *et al.*, 2010). *S. aureus* é um patógeno humano oportunista que representa riscos na área médica e no setor alimentar. Durante o processamento dos alimentos é possível ocorrer a contaminação por esse patógeno, seja por meio de indivíduos portadores assintomáticos ou por indivíduos que possuem algum tipo de infecção (TEIXEIRA *et al.*, 2008).

Dados recentes mostram que no período de 2007 a 2017, *S. aureus* foi diagnosticado como agente principal dos surtos de intoxicação alimentar ocorridos no Brasil, ocupando a terceira posição das bactérias patogênicas (BRASIL, 2017). A intoxicação alimentar causada por *S. aureus* resulta da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas no alimento (HENNEKINNE *et al.*, 2012). A presença de  $10^5$  UFC·g<sup>-1</sup> de *S. aureus* em alimentos é considerado de alto risco, pois a esta concentração algumas cepas apresentam capacidade de produzir enterotoxina (NECIDOVÁ *et al.*, 2012).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas termorresistentes (BUKOWSKI, 2018) e nos seres humanos originam sintomas como vômito e diarreia, dentre outros, sendo necessário menos de 1µg de toxina pura para desencadear os sintomas característicos de intoxicação estafilocócica (ZHANG *et al.*, 1998). Segundo Nader Filho *et al.*, (2007), uma média de 50% dos isolados de *S. aureus* têm capacidade de produzir uma ou mais enterotoxinas.

Um trabalho realizado por Normanno *et al.* (2005) revelou que 83,3 % dos isolados de *S. aureus* provenientes de amostras de ricota eram enterotoxigênicos, evidenciando o risco ao consumidor. Entre os alimentos causadores de surtos e casos de intoxicação estafilocócica destacam-se o leite cru, o leite pasteurizado e os queijos, sendo *S. aureus* o micro-organismo mais frequente nas investigações epidemiológicas (BORGES, 2008).

Wang *et al.* (2012) analisaram amostras de fórmulas infantis e 11,2 % delas foram positivas para *S. aureus* portadores de genes para enterotoxinas estafilocócicas clássicas. Se esses alimentos infantis contaminados com *S. aureus* enterotoxigênicos forem reconstituídos em baixa temperatura e armazenados a temperatura ambiente por um longo período, eles ainda podem tornar um risco para a saúde infantil. Um estudo recente demonstrou que *S. aureus* pode permanecer viável em produtos lácteos desidratados e produzirem enterotoxinas quando o alimento é reconstituído (BOGDANOVICOVA *et al.*, 2017).

## 5. MEDIDAS DE CONTROLE

### 5.1. TEMPERATURA

Entre os fatores que afetam o comportamento microbiano em alimentos, a temperatura é de fato a mais importante. Os estafilococos são micro-organismos mesófilos com temperatura de crescimento entre 7 e 47,8 °C e podem produzir enterotoxina estafilocócicas termoresistentes a temperaturas entre 10 e 46 °C, com temperatura ótima entre 40 e 45 °C. *S. aureus* geralmente é destruído por tratamentos térmicos, como a pasteurização, mas suas enterotoxinas estafilocócicas, termoestáveis, permanecem ativas nos alimentos tornando-se um risco para a saúde pública (CARMO *et al.*, 2002). A intoxicação alimentar por *S. aureus* ocorre após consumo de alimentos contaminados submetidos a tratamento térmico inadequado ou mantidos sob condições favoráveis à multiplicação deste patógeno e possível produção da enterotoxina (ALMEIDA e FRANCO, 2003).

Em estudo de Haryani *et al.*, (2003), o armazenamento do soro de leite a 4 °C demonstrou ser eficaz para inibir multiplicação de *S. aureus* e para a extensão da vida de prateleira, mostrando ser efetivo para inibição de enterotoxina estafilocócica já que a produção de enterotoxina ocorre a temperaturas entre 10 °C a 46 °C (BHUNIA, 2008; SCHELIN *et al.*, 2011). Portanto, a manutenção a baixas temperaturas pode ser usada no controle da produção de enterotoxinas em alimentos (ASPERGER, 1994).

O armazenamento a temperatura de refrigeração é uma das formas mais importantes de retardar a atividade metabólica microbiana nos alimentos. No entanto, a sensibilidade celular ao estresse pelo frio depende de muitos fatores, incluindo temperatura, taxa de resfriamento/congelamento, meio de cultura e tempo de armazenamento (BEALES, 2004).

### 5.2. MICRO-ORGANISMOS COMPETIDORES

*S. aureus* é considerado um micro-organismo pouco competidor e apresenta maior risco em alimentos onde a microbiota contaminante foi inativada ou inibida. Este micro-organismo é capaz de se adaptar a diferentes ecossistemas (TOMASINI *et al.*, 2014). Apesar da aplicação de tecnologias modernas e conceitos de segurança na indústria de alimentos, ainda há muitos problemas relacionados à contaminação de alimentos por patógenos alimentares (CICCIO *et al.*, 2015). Alternativas para aumentar a conservação e segurança de

alimentos envolvem o uso empírico de micro-organismos e, ou seus produtos para a conservação de alimentos (ROSS, MORGAN, & HILL, 2002).

Estudos comprovam que as bactérias do ácido lático desempenham um importante papel na produção de alimentos. Este grupo microbiano favorece características sensoriais e tecnológicas, além de promoverem a conservação dos alimentos, devido à competição e inibição da microbiota deteriorante e/ou agentes patogênicos (JACOBSEN *et al.*, 1999; NAIDU e CLEMENS, 2000; MADERA *et al.*, 2003).

O ácido lático e outros subprodutos do metabolismo das bactérias lácticas, incluindo peróxido de hidrogênio, diacetil, acetoína, reuterina, reuteriicina, peptídeos antifúngicos e bacteriocinas agem como bioconservantes. A ação ocorre pela alteração das propriedades intrínsecas dos alimentos e inibem micro-organismos deterioradores (MAGNUSSON, 2001; DEEGAN *et al.*, 2006), como por exemplo *S. aureus* em produtos lácteos (CHIODA *et al.*, 2006). Além de inibir o crescimento bacteriano, tem sido demonstrado que as bactérias lácticas podem interferir na expressão gênica de patógenos de origem alimentar como *S. aureus*, impedindo a produção de enterotoxinas estafilocócicas (EVEN *et al.*, 2009; CRETENET *et al.*, 2011; SERIDAN *et al.*, 2012).

A capacidade de inibição dos patógenos demonstrada por muitas linhagens de bactérias lácticas é uma das características mais importantes atribuídas a estes micro-organismos. Do ponto de vista da ciência e tecnologia de alimentos está diretamente relacionada à capacidade de produzir e tolerar elevadas concentrações de metabólitos, favorecendo a competição com outros micro-organismos num dado ecossistema. (JIN *et al.*, 1997; WALKER e DUFFY, 1998; CLOSE, 2000).

De acordo com Martins (2012), bactéria láctica tem mostrado eficiência quando se trata da inibição de micro-organismos patogênicos em produtos lácteos. A utilização de culturas starter e o monitoramento da fermentação podem reduzir significativamente a presença de patógenos, como *S. aureus*, em queijos frescos e, conseqüentemente no soro de leite.

Na indústria alimentícia vários tipos de superfícies entram em contato com alimentos, incluindo equipamentos, utensílios e acessórios usados nas etapas de processamento, e durante o armazenamento, podendo contribuir para contaminação cruzada por patógenos e recontaminação de alimentos, comprometendo a segurança microbiológica, aumentando assim o risco de doenças transmitidas por alimentos (KYUN *et al.*, 2019).

A limpeza e a sanitização na indústria alimentícia são de fundamental importância no controle microbiológico dos alimentos e visa, sobretudo, a segurança e a qualidade dos mesmos, a fim de evitar perdas econômicas devido à deterioração e contaminação dos produtos por micro-organismos (KUDA *et al.*, 2008).

O procedimento de higienização pode ser realizado utilizando diferentes produtos químicos, incluindo detergentes e sanitizantes (MAUKONEN *et al.*, 2003). A efetividade do detergente pode ser restringida pela presença de material orgânico, incluindo gorduras, carboidratos e proteínas. Além disso, pH, temperatura, dureza da água, inibidores químicos, concentração e tempo de contato também são fatores importantes que influenciam a ação dos sanitizantes. Entre os principais agentes sanitizantes utilizados na indústria de alimentos, encontram-se o cloro, peróxido de hidrogênio, iodo ozônio e ácido peracético (BREMER *et al.*, 2002; KUDA *et al.*, 2008). A higienização é um procedimento que envolve diferentes etapas, visando obter o grau de sanitização e limpeza adequadas em todo ambiente, reduzindo, assim, os micro-organismos presentes a um número compatível ao produto.

Um composto químico muito utilizado na indústria de alimentos é o hipoclorito de sódio (SREY *et al.*, 2013). É um potente agente oxidante que interfere com a síntese de DNA e reage com as proteínas intracelulares, parede celular e componentes da matriz extracelular (RUSSEL, 2003). Para inativar o micro-organismo, a solução de hipoclorito de sódio deve ser capaz de penetrar e ganhar acesso às células microbianas promovendo a inativação e a remoção do mesmo (SOUZA *et al.*, 2014).

Toté *et al.* (2010) avaliaram o efeito inibitório de diferentes biocidas sobre a viabilidade celular e o biofilme de *S. aureus* e, dentre os biocidas analisados, o hipoclorito de sódio mostrou-se efetivo, tanto na redução da viabilidade das células aderidas quanto na remoção da matriz do biofilme.

Meira *et al.* (2012) verificaram o efeito de ácido peracético e hipoclorito de sódio sobre a redução do número de células de *S. aureus* em biofilmes pré-formados em superfícies de aço inoxidável e os resultados mostraram que o ácido peracético foi mais eficaz na redução de células viáveis presentes na estrutura do biofilme. Nas condições avaliadas, ambos os desinfetantes diminuíram as contagens de células aderidas às superfícies, entretanto, não foram eficientes para a completa remoção das células de *S. aureus* do biofilme.

Para Immig (2013), a higienização na indústria alimentícia é de extrema importância no controle microbiológico dos alimentos e visa, sobretudo, a segurança e a qualidade dos

mesmos, a fim de evitar perdas econômicas devido à deterioração e contaminação dos produtos por micro-organismos.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qualidade microbiológica do soro em pó está diretamente relacionada à microbiota presente na matéria prima, ou por contaminação durante e após o processamento. Na produção de soro em pó, uma série de operações são utilizadas visando reduzir a multiplicação de micro-organismos, inativar ou remover os contaminantes presente no produto. Contudo, refrigeração em condições inapropriadas, tratamento térmicos insuficientes, são causas da contaminação por *S. aureus* em soro em pó. Portanto, fica evidenciada a necessidade de controle microbiológico das indústrias laticinistas quando o objetivo é utilizar os soros lácteos na elaboração de produtos alimentícios.

Poucos estudos da presença de *S. aureus* em soro de leite foram conduzidos até o momento. Entretanto, o crescente processamento do soro pela indústria de alimentos tem motivado pesquisas relacionadas à melhoria da sua qualidade microbiológica.

Como perspectiva, obtém-se uma necessidade de outros estudos para compreender melhor a microbiologia de processos de soro em pó, visto que este produto vem sendo amplamente empregado na indústria de alimentos como ingrediente na formulação de diversos produtos, em destaque, utilização do soro na produção de fórmulas infantis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, K. E. de; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. de O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo Minas Frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 187-192, 2001.

ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo minas frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., e coliformes fecais. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 111, p. 79-85, 2003.

ALVES, M.P. **Aplicação da tecnologia de separação por membranas no beneficiamento do soro de leite**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Viçosa, MG, p.117, 2013.

ALVES, M.P.; PERRONE, I.T.; SOUZA, A.B.; STEPHANI, R.; PINTO, C.L.O.; CARVALHO, A.F. Estudo da viscosidade de soluções proteicas através do analisador rápido de viscosidade (rva). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, p. 77-88, 2014.

ANDERSON, P.H.R.; STONE, D.M. *Staphylococcus* food poisoning associated with spraydried milk. **Journal of Hygiene**, v. 53, p. 387,1955.

ARMIJO, R.; HENDERSON, D.A.; TIMOTHEE, R.; ROBINSON, H.B. Food Poisoning outbreaks associated with spray-dried milk. An Epidemiologic study. **American Journal of Public Health**, v. 47, p. 1093, 1957.

ASAO, T., KUMEDA, Y., KAWAI, T., SHIBATA, T., ODA, H., HARUKI, K. Anextensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: Estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**, v. 130, p.33-40, 2003.

ASPERGER, H. *Staphylococcus aureus*. Group of Experts A10/11. The significance of pathogenic microorganisms in raw milk. **International Dairy Federation**, Brussels. p.24-42,1994.

BHUNIA, A. **Foodborne microbial pathogens – mechanisms and pathogenesis**. New York: Springer, 2008. 276p.

BIEGER, A.; RINALDI, R. N. **Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná**. Congresso Da Sociedade Brasileira De Economia, Administração e Sociologia Rural. Porto Alegre, p. 47, 2009.

BORGES, M. F. ***Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados**: revisão. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos: UFPR, v. 26, n. 1, p. 71-86, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos. (2013). Disponível em <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresentaodadosgerais.pdf>. Acesso em 30 de novembro de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 ago. 2005. Disponível em: Acesso em: 20 de novembro. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº16 de 23 de agosto de 2013. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de soro de leite**. Brasília, DF, 2013.

BREMER, P. J.; MONK, I.; BUTLER, R. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Flavobacterium* spp. biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. Letters. **Applied Microbiology**, v. 35, p. 321-325, 2002.

CAN, H. Y.; ÇELIK, T. H. Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *Staphylococcus aureus* in Turkish cheeses. **FoodControl**, v. 24, p. 100-103, 2012.

CANCINO, B.; ESPINA, V.; ORELLANA, C. **Whey concentration using microfiltration and ultrafiltration**. **Desalination**, v. 200, n. 3, p. 557-558, 2006.

CARDOSO, G. S. **Avaliação físico-química e microbiológica do leite cru refrigerado e soros dos queijos minas frescal e mussarela estocados sob diferentes temperaturas**. Tese

(Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, f. 125, 2014.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R. *et al.* Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw milk in Brasil. **Food Microbiol.**, v.19, p.9-14, 2002.

CARVALHO, A.F.; MARTINS, E.; RODRIGUES, R.C.; SCHUCK, P.; PERRONE, I.T. Tecnologia de lácteos concentrados e desidratados: o estado da arte da microbiologia de processo. **Revista Indústria de Laticínios**, n. 121, p. 70-73, 2016.

CARVALHO, B. M. A. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. REDVET - **Revista electrónica de Veterinária**, v. 8, n. 6, p. 1-7, 2007.

CARIC', M.; AKKERMAN, J. C.; MILANOVIC', S.; KENTISH, S. E.; TAMIME, A. Y. Technology of evaporators, membrane processing and dryers. **Dairy powders and concentrated products**. 1 st ed. Chichester: Blackwell, 2009. cap. 3, p. 99-148.

CHIODA, T. P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; GARCIA, G. R.; MACRI, S. F.; TROVO, K. P.; MEDEIROS, A. A. Inhibition of the growing of *Listeria monocytogenes* in Minas frescal cheese elaborated with *Lactobacillus acidophilus* culture. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 121-124, 2006.

CLOSE, W. H. Producing pigs without antibiotic growth promoters. *Advanced in Pork Production*, Edmonton, v. 11, p. 47-56, 2000.

COSTA, W. N. **Análise físico-química de queijo minas padrão, comercializados em feiras livres na cidade de Goiânia**. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Química Industrial) – Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 30 f, 2012.

CRETENET, M.; NOUAILLE, S.; THOUIN, J.; RAULT, L.; STENZ, L.; FRANÇOIS, P.; HENNEKINNE, J.; PIOT, M.; MAILLARD, M. B.; FAUQUANT, J.; LOUBIÈRE, P.; LE LOIR, Y.; EVEN, S. *Staphylococcus aureus* virulence and metabolism are dramatically affected by *Lactococcus lactis* in cheese matrix. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, p. 340–351, 2011.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocin: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058- 1071, 2006.

SANTANA, E. H. W. de; BELOTI, V.; ARAGON, L. C.; MENDONÇA, M. B. O. C. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

EVEN, S.; CHARLIER, C.; NOUAILLE, S.; BEN ZAKOUR, N.; CRETENET, M.; COUSIN, F. J.; GAUTIER, M.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; LOUBIÈRE, P., LE LOIR, Y. *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 4459–4472, 2009.

FERNANDES, RHEA. Microbiology handbook dairy products. Leatherhead. **Publishing Cambridge**, p. 30-45, 2009.

FERNANDES, S. M., FUJIMOTO, G., SCHNEID, I., KABUKI, D. Y., KUAYE, A. Y. Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. **International Dairy Journal**, v.38, p.16-23, 2014.

FERREIRA, R. M.; SPINI, J. C. M.; CARRAZZA, L. G; SANT'ANA, D. S.; OLIVEIRA, M. T.; ALVES, L. R.; CARRAZZA, T. G. Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo Minas frescal artesanal. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5, 2011.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. Processos de separação por membranas. **Série Escola Piloto em Engenharia Química**, COPPE/UFRJ. Rio de Janeiro: e-papers, p. 180, 2006.

HAMADI, F., ASSERNE, F., ELABED, S., BENSOUDA, S., MABROUKI, M., LATRACHE, H. Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. **Food Control**, v.38, p.104- 108, 2014.

HARYANI, S.; DATTA, N.; ELLIOTT, A. J.; DEETH, H. C. Production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, n.1, p. 15-20, 2003.

HENNEKINNE, J.-A.; BUYSER, M.-L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**. v.36, n.4, p.815-836, 2012.

IMMIG, J.O. **Higienização na Indústria de Alimentos**. Porto Alegre, 2013

JACOBSEN, C. N.; NIELSEN, V. R.; HAYFORD, A. E.; MØLLER<sup>1</sup>, P. L.; MICHAELSEN, K. F.; PÆRREGAARD, A.; SANDSTRÖM, B.; TVEDE, M.; JAKOBSEN, M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp.* by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 11, p. 4949-4956, 1999.

JIN, L. Z.; HO, Y. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Science Journal, New Zealand**, v. 53, n. 4, p. 351-363, 1997.

JUNIOR, A. C. **Atuação de óleos essenciais sobre biofilme de *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável e polipropileno**. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, - Universidade Federal de Lavras, Lavras MG, p. 74, 2011.

KOSSEVA, M. R. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 5, p. 437-447, 2009

KUDA, T.; YANO, T.; KUDA, M. T. Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 988-993, 2008.

LEWIS, M.J.; DEETH, H.C. Heat Treatment of Milk. **Milk Processing and Quality Management**, p. 168-204, 2009.

LOGUERCIO, A.P, ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**. p.1063-1067, 2001.

MADERA, C.; GARCÍA, P.; JANZEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J. E. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to

phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 86, n. 3, p. 213-222, 2003.

MAGNUSSON, J.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1-5, 2001.

MARQUES, S. C.; REZENDE, J. G.; ALVES, L. A.; SILVA, B. C.; ALVES, E.; ABREU, L. R de.; PICCOLI, R. H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 538-543, 2007.

MARTINS, E. **A associação De Bacteriocinas e Bactérias Lácticas Para Inibição de *Staphylococcus aureus* em Queijo Minas Frescal**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de microbiologia, p.12, 2012.

MASTERS, K. Spray Drying in Practices. Denmark: SpraydryConsult. **International ApS**, 2002. 464 p.

MAUKONEN, J.; ÄTTÖ, J.; WIRTANEN, G.; RAASKA, L.; MATTILASANDHOLM, T.; SAARELA, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p.327-356, 2003.

MEHLI, L.; HOEL, S.; THOMASSEN, G. M. B.; JAKOBSEN, A. N.; KARLSEN, H. The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. **International Dairy Journal**, v. 65 p. 20- 27, 2017.

MEIRA, Q. G. S.; BARBOSA, I. M.; ATHAYDE, A. J. A. A.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, v. 25, p. 469-475, 2012.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Relatórios de produtos por UF. Brasília: MAPA, 2016.

MONTEL, M.-C., BUCHIN, S., MALLET, A., DELBES-PAUS, C., VUITTON, D.A., DESMASURES, N. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. **Journal Food Microbiology**. p.136-154, 2014.

MURPHY, S.C., MARTIN, N.H., BARBANO, D.M., WIEDMANN, M., Influence of raw milk quality on processed dairy products: how do raw milk quality test results relate to product quality and yield. **Journal of Dairy Science**. p.10128-10149, 2016.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JR., O. D.; OLIVEIRA, R. P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1.316-1.318, 2007.

NAIDU, A. S.; CLEMENS, R. A. Probiotics. **Natural food antimicrobial systems**. Boca cap. 17, p. 431-462, 2000.

NECIDOVÁ, L.; JANŠTOVÁ, B.; KARPÍŠKOVÁ, R. Dynamics of staphylococcal enterotoxin production in model experiments simulating the fresh cheese environment. **Acta Veterinaria Brno**, v. 81, p. 391–396, 2012.

NASCIMENTO, I. R.; SANTOS, D.G. **Avaliação da qualidade microbiológica do soro de queijo coalho artesanal no Município Nossa Senhora da Glória/SE**. In: VII CONNEPI-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação. 2012

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P. Coagulase positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 73-79, 2005.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277–284, 2010.

PERRONE, I.T.; SHUCK, P.; SILVEIRA, A. C. P.; CARVALHO, A. F. Soro de leite em pó: the whey to do it. **Revista Industria de Laticínios**. São Paulo: v.121. p.65-70, 2016.

PERRONE, I, T.; PEREIRA, J. P. F.; CARVALHO, A. F. Aspectos tecnológicos da fabricação de soro em pó: uma revisão. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, Mai/Jun, nº 380, 66: 23-30, 2011.

PINTADO, M. E.; MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X. Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. **Food Science And Technology International**,v. 7, n. 2, p. 105-116, 2001.

ROSA, V. P. **Efeitos da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas frescal**. Dissertação: (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP,141f. 2004.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 3-16, 2002.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MORAES, L. B.; GUSMAO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I – Micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.145-154, 2001.

SANTANA, E.H.W. **Determinação do perigo de consumo do leite cru relacionado a intoxicação estafilocócica**. Londrina, PR. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Londrina - UEL; 2006.

SANTOS, J. P. V.; FERREIRA, C. L. de L. F. Alternativas para o aproveitamento de soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 3, p. 44-50, 2001.

SCHELIN, J.; WALLIN-CARLQUIST, N.; COHN, M. T.; LINDQVIST, R.; BARKER, G. C.; RÅDSTRÖM, P. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, v.2, n.6, p.580-592, 2011.

SCHUCK, P. Understanding the factors affecting spray-dried dairy powder properties and

behaviour. Dairy-derived ingredients – **Food and nutraceutical uses**. Woodhead Publishing, 2009. p. 24-50.

SCHUCK, P.; JEANTET, R.; CARVALHO, A.F. **Cristalização da lactose e secagem de soro**. Ciência e tecnologia de leite e derivados Universidade Federal de Viçosa, 2010.

SERIDAN, B.; SOUZA, M. R.; NICOLI, J. R.; CARMO, L. S.; MENEZES, L. D. M., OLIVEIRA, D. L. S.; ANDRADE, E. H. P. Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 465-470, 2012.

SILVA, C.R. **Thermodynamic characterization of two pilot spray dryers and evaluation of the effect of high molecular weight compounds on traditional and lactose-free dairy mixes**. 2017. 124p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) -Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2017.

SIMEÃO, MOISÉS. **Influência do tipo de cristalizador na cinética de cristalização do soro de leite concentrado**. 2016. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

SOUZA, E. L.; MEIRA, Q. G. S.; DE MEDEIROS BARBOSA, I.; ATHAYDE, A. J. A. A.; DA CONCEIÇÃO, M. L.; DE SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, p. 67–75, 2014.

SPANU, V.; SPANU, C.; VIRDIS, S.; COSSU, F.; SCARANO, C.; DE SANTIS, E. P. L. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 53–57, 2012.

SREY S.; Jahid, I.K. e Ha S.D. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**, vol. 31, n. 2, p. 572–585, 2013.

TEIXEIRA, L. M.; SANTOS, K. R. N.; BUERIS, V.; TRABULSI, L. R.; TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Staphylococcus aureus*. **Microbiologia**. 5.ed. Cap. 20, p. 175-182, 2008.

TOMASINI A, FRANCOIS P, BP HOWDEN, FECHTER P, ROMBY P, CALDELARI. A importância dos RNAs reguladores em *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetctis and Evolution**, 21 p. 616–626, 2014.

TOTÉ, K.; HOREMANS, T.; VANDEN BERGHE, D.; MAES, L.; COS, P. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, p. 3135–3142, 2010.

TOUCH, V.; DEETH, H.C. Microbiology of Raw and Market Milks. **Milk Processing and Quality Management**, p.48-71, 2009.

USDA – United States Department of Agriculture/ Foreign Agricultural Service Approved by the World Agricultural Outlook Board/USDA (2003) – Dairy: World Markets na Trade 2017. Disponível em: <https://usdasearch.usda.gov/search?utf8=%E2%9C%93&affiliate=usda&query=leite>  
Acesso em: 20 novembro 2018.

VISSERS, M.M.M.; DRIEHUIS, F. On-Farm Hygienic Milk Production, **Milk Processing and Quality Management**, p.1-22, 2009.

WALKER, W. A.; DUFFY, L. C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. **Journal Nutritional Biochemistry, Lexington**, v. 9, n. 12, p. 668-675, 1998.

WALSTRA, P.; WOUTERS, JTM.; GEURTS, TJ. Milk Powder, in **Dairy Science and Technology**, 2nd ed., USA, p. 517-522, 2006.

WALSTRA, Pieter, *et al.* **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 2001.

WANG, X. *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from powdered infant formula milk and infant rice cereal in China. **International Journal of Food Microbiology**, 153, 142–147, 2012.

ZHANG S.; IANDOLO, J.J.; STEWART, G.C. The Enterotoxin D Plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **FEMS. Microbiology Letters**, v.168, p. 227–233, 1998.

**CAPÍTULO 2: EVALUATION OF *Staphylococcus aureus*  
MULTIPLICATION DURING THE PRODUCTION OF WHEY  
POWDER**

**Evaluation of *Staphylococcus aureus* multiplication during the production of whey powder in small scale**

Jean Victor dos Santos Emiliano<sup>a</sup>; Evandro Martins<sup>a</sup>; Rosângela de Freitas<sup>a</sup>; Antônio Fernandes de Carvalho<sup>a</sup>; Italo Tuler Perrone<sup>the</sup>

Federal University of Viçosa- Department of Food Technology- DTA. Laboratory of Milk and Derivatives (Inovaleite), Viçosa- Minas Gerais, Brazil<sup>at</sup>

[jeanvictorif@gmail.com](mailto:jeanvictorif@gmail.com)<sup>a</sup>; [evandrombi@yahoo.com.br](mailto:evandrombi@yahoo.com.br)<sup>a</sup>; [rosdfreitas@yahoo.com.br](mailto:rosdfreitas@yahoo.com.br)<sup>a</sup>; [afc1800@yahoo.com](mailto:afc1800@yahoo.com)<sup>a</sup>; [italotulerperrone@gmail.com](mailto:italotulerperrone@gmail.com)<sup>a</sup>

Corresponding author: Department of Food Science and Technology. Laboratory of Milk and Derivatives (INOVALEITE), 101, UFV- Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Tel: 3138991800

e-mail: [italotulerperrone@gmail.com](mailto:italotulerperrone@gmail.com)

## ABSTRACT

Whey can act as a substrate for *Staphylococcus aureus*, especially when stored under favorable conditions for its multiplication. Hence, products made from whey can carry staphylococcal enterotoxins leading to public health problems, with special attention to infant formulas, considering that children constitute a group of risk. Therefore, the aim of this study was to evaluate the multiplication of *S. aureus* during the production of whey powder in laboratory scale. Whey was inoculated with  $10^6$ UFC·mL<sup>-1</sup> of the *S. aureus* mixed culture at the beginning of the processing and the persistence of the microorganism after pasteurization and vacuum evaporation was evaluated. The recontamination of whey by biofilms was also evaluated. After pasteurization, *S. aureus* population on the serum was  $10^3$  UFC·mL<sup>-1</sup>, which proves that the binomial 72 ° C / 20 s was not efficient to guarantee the innocuity of the material. Population of  $10^2$  UFC·mL<sup>-1</sup> of *S. aureus* was found in the whey after vacuum concentration. The microorganism was able to multiply in concentrated whey during the crystallization of lactose, which infers that it is possible to form a biofilm during this stage. Confocal microscopy analysis confirmed the presence of adhered cells after 4 h of process ( $10^3$  UFC·cm<sup>2</sup>). After 12 h of incubation, the number of adhered cells was approximately  $10^5$  UFC·cm<sup>2</sup>. As for the potential of biotransfer, the sessile cells of *S. aureus* in stainless steel were able to return to the planktonic phase. After spray drying, it was verified that the *S. aureus* population in the powder was  $10^3$  UFC·g<sup>-1</sup>. The results obtained in laboratory scale points to the need of quality assurance systems to control the steps of industrial whey powder production.

**Key Words:** Whey, evaporation, crystallization, drying, biofilm

## 1. INTRODUCTION

Whey may be defined as "fluid milk product obtained during the manufacture of cheese, casein or similar products, being presented in liquid form, concentrated or powdered" (*Codex Alimentarius*, 2003). This co-product is mainly collected from cheese production and it is estimated that about 2.7 million tonnes of liquid whey were produced in 2018 (USDA, 2018).

The fluid whey has an average composition of 0.8 % (m·v<sup>-1</sup>), protein, 4.5 % (m·v<sup>-1</sup>) lactose and 0.5 % (m·v<sup>-1</sup>) fat; which may act as a substrate for the development of pathogenic and spoilage bacteria (Oliveira *et al.*, 2012). Although this co-product has a potential risk of transmitting pathogenic microorganisms, few studies have been devoted to characterizing the microbiota of whey or whey-based foods (Desconsi *et al.*, 2014; Teixeira, 2007). The lack of information in this sense can be partly explained by the fact that the processing of fluid whey is a relatively recent practice, that begun in the mid-1970s (Pagno, 2009), and by the existence of few reports of food-borne outbreaks involving serum-based products. However, in the past year a major recall of food products containing whey contaminated with *Salmonella* alerted the regulatory agencies and industry to a more rigorously control of the microbiological quality of whey powder (FDA, 2018).

Although the microbiology of whey is poorly explored in the literature, it can be inferred that the pathogenic microorganisms frequently found in cheesemaking environments such as *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* may also be present in the fluid whey (Feitosa *et al.*, 2003; Perin *et al.*, 2017). Considering the high incidence of *S. aureus* in samples of fresh and mature cheeses (Loguercio & Aleixo 2001; Ferreira *et al.*, 2011; Can, 2012; Lee *et al.*, 2015), whey is also expected to have a high incidence of this pathogen.

*S. aureus* is a microorganism normally found in the skin of the animal, hands of manipulators and in the processing environment in the form of biofilms (Hamadi *et al.*, 2014). Thus, *S. aureus* can be transferred from milk to whey during cheese manufacturing or even directly transferred by contact of the whey with the hand of poorly sanitized manipulators or equipment containing pathogen biofilms (Necidová, Janštová, & Karpíšková, 2012; Can & Çelik, 2012).

The presence of *S. aureus* in whey powder is permitted on a count of up to 10<sup>2</sup> UFC·g<sup>-1</sup> as described in the *Codex Alimentarius* and specific technical regulations, as

Technical Regulation of the Identity and Quality of Whey (Brazil, 2013) and Regulation CE 2073/2005 (CE, 2005). Although the microorganism does not cause any disease when ingested in its vegetative form, counts greater than  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> in the fluid serum can produce heat-resistant enterotoxins that cause food poisoning (Necidová *et al.*, 2012).

The consumption of food contaminated with enterotoxins does not normally lead to the death of the individual; however, children, elderly, and immunocompromised persons may have more severe symptoms and complications that lead to death (CVE, 2013). Thus, products containing whey powder such as infant formulas, geriatric formulas or dairy products intended for persons undergoing medical treatment must be free from staphylococcal enterotoxins.

During the production of whey powder, the fluid serum undergoes a series of unitary operations of heating and concentration that aim to eliminate or limit the multiplication of this and other pathogens in the product (Viçosa *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011). However, a systematic evaluation of the whey powder processing in reducing the *S. aureus* population has not been described in previous studies. Considering the potential risk of this pathogen to public health, the objective of this work was to assess the persistence of *S. aureus* during the steps of whey powder processing.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. MICROORGANISMS AND PREPARATION OF THE MIXED CULTURE

The preparation of the bacterial stock was carried out according to the methodology proposed by Pereira *et al.* (1994). The cultures of *S. aureus* (Table 1) were stored in ultra-freezer at -62 °C in Eppendorf tubes containing *Brain Heart Infusion* (Sigma Aldrich®, Germany) and 60 % glycerol (v·v<sup>-1</sup>).

Cultures of *S. aureus* were in *Brain Heart Infusion* broth (Sigma Aldrich®, Darmstadt, Germany) and incubated at 35 °C ± 2 °C for 24 h. to obtain a culture with approximately 10<sup>8</sup> UFC·mL<sup>-1</sup>. Subsequently, the mixed culture was standardized for approximately 10<sup>6</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> of *S. aureus*.

**Table 1.** Microorganisms used and their respective origin

Bacteria	Origin	Enterotoxin produced	Origin
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Human injury	SEK	ATCC *
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Clinical isolate	SEA, SEB, SEC	ATCC *
<i>S. aureus</i> ATCC 700698	Patient with pneumonia	SEA	ATCC *
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	Clinical isolate	SEA, SEB, SEC, SED	ATCC *

\*=American Type Culture Collection

The *S. aureus* strains described in table 1 were selected considering their biofilm formation capacity, staphylococcal enterotoxin production and reports of its presence in dairy products (Feitosa *et al.*, 2017; Palaniappan *et al.*, 2015; Zurita *et al.*, 2010).

### 2.2. SIMULATION OF WHEY POWDER PRODUCTION WITH CONTAMINATION OF *S. aureus* IN THE RAW MATERIAL

Whey fluid was aseptically prepared by dilution of 135 g of whey powder (Lactosul®, Piranhas, Goiás, Brazil) in 165 ml of autoclaved distilled water. After complete solubilization of the powder, the reconstituted whey powder was heat treated (72 °C/ 20 s), cooled to room temperature and inoculated under sterile conditions with 10<sup>6</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> of the *mixed S. aureus* culture. An initial *S. aureus* population of 10<sup>6</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> in the reconstituted whey powder was predicted based on works describing a population of *S. aureus* between 10<sup>3</sup> and 10<sup>8</sup> UFC·g<sup>-1</sup> in cheeses (Castro *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2013; Borges *et al.*, 2003).

In order to evaluate the bactericidal potential of the pasteurization, vacuum evaporation concentration and spray drying steps, reconstituted whey powder inoculated with the *S. aureus* mixed culture was pasteurized at 72°C / 20s in a water-bath (Figure 1). Then, the fluid serum was concentrated at 65 °C for 20 min on the rotary evaporator Marconi®(model MA 120/2057, São Paulo, Brazil) up to 50 °Brix, determined in a digital refractometer Biobrix® (model 2WAJ-D – Ideal Lab, Paraná, Brazil) .

The crystallization of lactose in the concentrated whey occurred immediately after the end of the vacuum evaporation according to protocol defined by Simeon *et al.* (2017). Approximately 300 mL of concentrated whey was packed in glass beaker (diameter 37.0 cm, height 12.5 cm), cooled to 25 °C and kept under stirring for 12 h with the aid of a magnetic bar at 500 rpm.

The whey concentrate was heated to 40 °C and fed into a single-stage laboratory *spray dryer* (model MSDi 1.0, Labmaq, São Paulo, Brazil) with a nozzle atomizer, at a rate of 1.0 kg·h<sup>-1</sup>. The drying parameters were: inlet air temperature 170 °C and outlet air 100 °C. The high outlet air temperature aimed to provide an extreme drying condition in order to enhance the heat treatment suffered by *S. aureus*. The whey powder collected in the cyclone was packaged under sterile conditions.

Samples were collected for *S. aureus* enumeration after pasteurization, vacuum concentration, lactose crystallization and spray drying stages. The experiment was conducted in triplicates.

### 2.3. LACTOSE CRYSTALLIZATION STEP

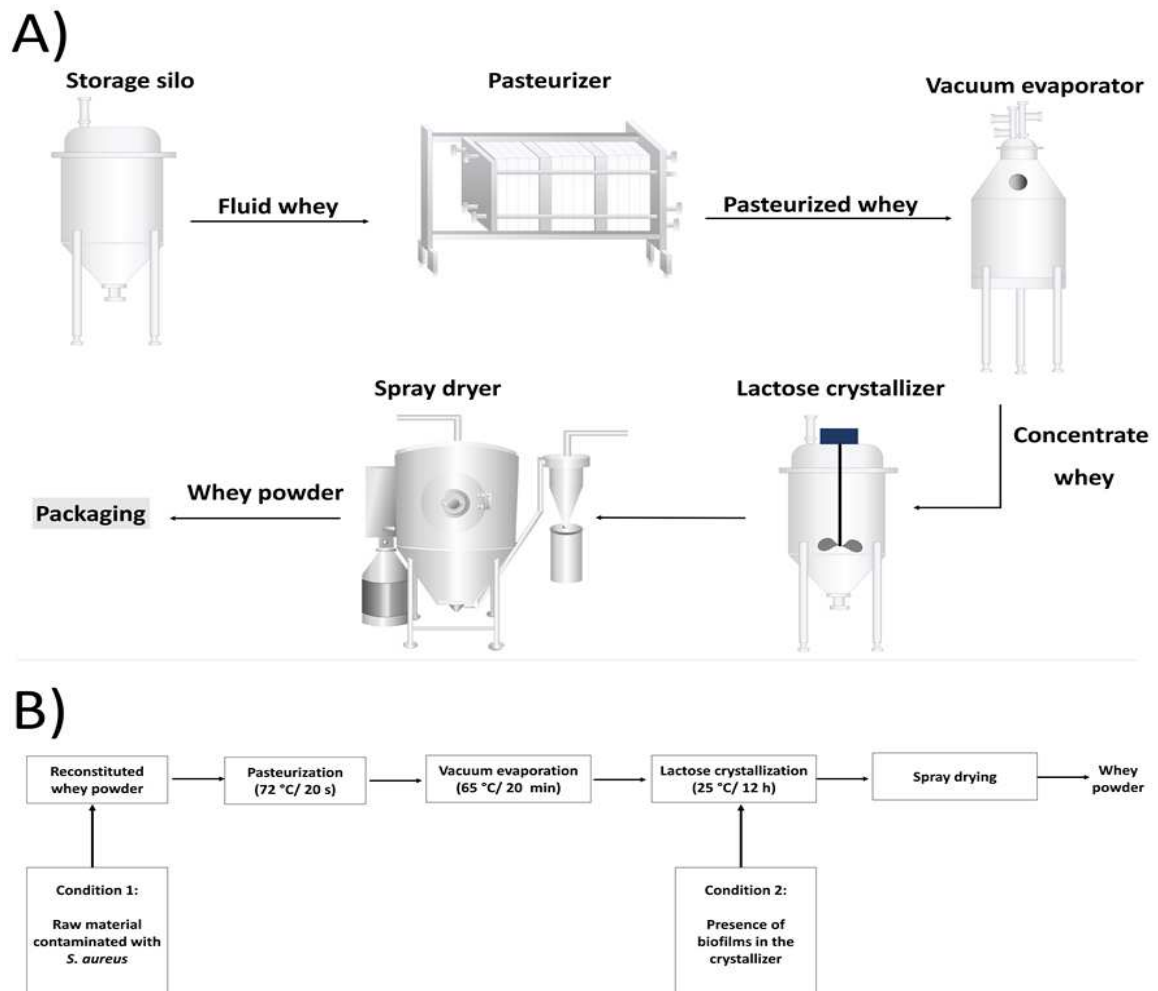
Lactose crystallization is a critical step in the processing of whey powder since the product is kept at room temperature for long periods. Thus, the contamination with *S. aureus* during this step may compromise the microbiological safety of whey powder.

In order to evaluate the multiplication of *S. aureus* during the crystallization of lactose, reconstituted whey powder was processed according to the flowchart shown in figure 1 with intentional contamination of the whey concentrate with a population of approximately 10<sup>3</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> of the mixed culture of *S. aureus*. During the crystallization step, aliquots of the concentrated whey were periodically collected for the determination of viable cells of *S. aureus*.

To evaluate the ability of biofilm formation by *S. aureus* during the crystallization of lactose, stainless steel AISI 304 coupons (2 cm x 2 cm x1 mm) previously sanitized and

sterilized according to Rossoni and Gaylarde (2000) were added to the whey concentrate. Throughout the crystallization, the coupons were aseptically removed and washed with 0.85 % saline solution ( $m \cdot v^{-1}$ ) for the removal of not adhered cells.

For the biofilms observation, the coupons were washed twice by immersion in phosphate-buffered saline (PBS, 0.2 M, pH 7.2) and incubated in the absence of light for 15 min in a mixture of  $20 \mu g \cdot mL^{-1}$  of propidium iodide (PI) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) and  $2 \mu g \cdot mL^{-1}$  of fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) in PBS (0.2 M, pH 7.2) prepared immediately before the use. After incubation, the coupons were washed another time by immersion in PBS and analyzed in confocal laser scanning microscope model LSM 510 META (Zeiss, Germany) using the Argon laser with wave-length of 458 and 514 nm (Wang *et al.*, 2012).



**Figure 01** - Flowchart of whey powder production. Production of whey powder on an industrial scale (A). Production of whey powder in laboratory scale (B).

Source: Adapted Boschi *et al.* (2006)

#### 2.4.DETERMINATION OF *S. aureus*

The enumeration of *S. aureus* for both simulations (sections 2.2 and 2.3) was performed using the surface plating technique as recommended by ISO 6888-2 (ISO, 1999). Briefly, 1 mL of reconstituted whey powder, 1 mL of reconstituted whey concentrate or 1 g of whey powder was diluted in 9 mL of peptone water 0.1% (m·v<sup>-1</sup>). Serial decimal dilutions were performed using the same diluent. 20 µL of the appropriate dilutions were deposited on the agar surface *Baird Parker* (BP) (Acumedia®, Furlab, Brazil) by microdroplet technique (Morton, 2001). Plates were incubated at 35 ± 2 °C for 24-48 h and drops with colonies numbers between 8 and 80 were considered for counting.

The *S. aureus* enumeration was expressed in UFC·mL<sup>-1</sup> or UFC·g<sup>-1</sup> according to equation 1:

$$UFC \cdot mL^{-1} \text{ ou } UFC \cdot g^{-1} = \frac{M \cdot D}{V_A} \quad (1)$$

Where:

M: mean plate count (UFC)

D: dilution held

V<sub>A</sub>: volume of the aliquot used in the plating (mL)

In order to quantify the adherent cells in the form of biofilm, coupons was added in 300 mL of whey concentrate and sonicated for 20 min using ultrasound (Branson® 150, Model UC-6, EUA) 40 kHz and power of 160 W (Malheiros *et al.*, 2010). Coupons were removed under sterile conditions and serial dilutions of the concentrate in peptone saline solution (0.1% m·v<sup>-1</sup>) were deposited on agar BP surface as described above. The counting of the viable cells in biofilm was expressed in log UFC·cm<sup>2</sup> as indicated by Equation 2 (Careli *et al.*, 2009):

$$UFC \cdot cm^2 = \frac{(V_A - V_D) \cdot M \cdot D}{A} \quad (2)$$

Where:

V<sub>D</sub>: volume of the diluent used in the rinsing (mL)

V<sub>A</sub>: volume of the aliquot used in the plating (mL)

M: average count obtained on the plates (UFC)

D: dilution performed

A: coupon area (cm<sup>2</sup>)

The methodology described by Boari *et al.* (2009) with adaptations was used to evaluate the biotransferential potential of the cells adhered to the coupons to the whey concentrate. After 12 h of lactose crystallization, a coupon was withdrawn and immersed in a new sterile milk serum. Plankton cell counting was performed to determine the biotransfer potential from the cells adhered to the coupon to the environment. For this purpose, aliquots were removed and serially diluted in peptone water 0.1% (m·v<sup>-1</sup>), plated by the microdroplets technique on agar BP and incubated at 35 °C ± 2 °C for 24-48 h. The results were expressed in log UFC·mL<sup>-1</sup>. The ability of sessile cells to release and contaminate the sterilized substrate is considered as a potential for biotransfer (Oliveira *et al.*, 2010)

## 2.5. DATA ANALYSIS

The experiment was performed in triplicates. Descriptive statistics data analyses were performed as well as arithmetic mean and standard deviation with the aid of the Microsoft Excel® program.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Whey powder production was simulated on a laboratorial scale respecting time/temperature binomials (figure 1) commonly used by dairy industry. The moments of *S. aureus* inoculation into the whey were defined by two conditions possible to occur in an industrial processing line:

- 1) Raw material (fluid whey) contaminated at the beginning of processing;
- 2) Recontamination of fluid whey after the steps involving heating (pasteurization and vacuum evaporation).

Considering whey prevention from the production of cheeses contaminated with *S. aureus*, the condition 1 simulates a feedstock with an initial charge of  $10^6$  UFC· mL<sup>-1</sup> of the pathogen, which is reasonable based on previous studies that indicate that the *S. Aureus* population in cheeses can reach  $10^8$  UFC·g<sup>-1</sup> (Freitas *et al.*, 2013; Borges *et al.*, 2003).

Condition 2 simulates the recontamination of whey concentrate during the crystallization stage of lactose in which the serum remains at room temperature for long periods (Figure 1). Accidental contamination of concentrated whey with *S. aureus* may occur in this step due to the release of biofilms formed in tubing or on the crystallizer surface itself.

#### 3.1. CONDITION 1: WHEY CONTAMINATED WITH *S. aureus*

On an industrial scale, the fluid whey stored under refrigeration is pasteurized in the plate heat exchanger (72 °C/ 20s) and then concentrated to 50 °Brix in a vacuum evaporator. The concentrated whey is destined to the crystallization tank with controlled agitation for prior crystallization of lactose before spray drying (Masters, 2002).

Pasteurization refers to the heat treatment that aims to eliminate all the pathogenic microbiota and part of the deteriorating microorganisms present in the raw material (Ren *et al.*, 2008). Since *S. aureus* is a mesophilic microorganism and not described in the literature as thermophilic (Gleeson *et al.*, 2013), there is evidence that pasteurization is efficient to eliminate this pathogen.

To simulate the laboratory-scale pasteurization step, reconstituted whey powder inoculated with  $10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup> of the mixed culture of *S. aureus* was added in an Eppendorf tube 1 mL and heated at 72 ° C for 20 s in a water bath. Upon completion of the heat treatment, the tube was cooled in an ice bath and the enumeration of *S. aureus* was performed.

After pasteurization, *S. aureus* population in the serum was  $10^3$  UFC·mL<sup>-1</sup>, which proves that the binomial 72 °C / 20s was not efficient to guarantee the innocuity of the material (Figure 2). This result is in agreement with other studies that demonstrated that pasteurization may not effectively completely eliminate *S. aureus* population. The efficiency of this thermal treatment is conditioned to factors such as type of food matrix, population density of the pathogen, and genetic variations of the microorganism (Huck, Sonnen, & Boor, 2008).

Nascimento *et al.* (2012) found similar results for samples of pasteurized whey, presenting counts of this microorganism at  $1.2 \times 10^3$  UFC·mL<sup>-1</sup>. Santos *et al.* (1999) evaluated 167 samples of pasteurized milk submitted to the research of *S. aureus*, with 24 of these samples presenting a positive result  $> 1.9 \times 10^3$  UFC·mL<sup>-1</sup>.

Following processing, whey is concentrated in a vacuum evaporator and can reach temperatures of 65 °C for 20 minutes. Considering that this temperature can also lead to the death of *S. aureus* cells, such cumulative heat treatment should be effective in eliminating the population of the pathogen remaining from pasteurization.

After concentration of whey under controlled laboratory conditions, it was confirmed that a *S. aureus* population of  $10^2$  UFC·mL<sup>-1</sup> remained present in the serum concentrate (Figure 2). Although this result indicates failures in the safety of the product and point to the need for more severe thermal treatments in the processing of serum powder, a population of *S. aureus* around  $10^2$  UFC·mL<sup>-1</sup> does not pose a risk to consumer health. As described on literature reports, the production of staphylococcal enterotoxins occurs in food matrices with populations of *S. aureus* larger than  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> or UFC·g<sup>-1</sup> (Necidová *et al.*, 2012). Asao *et al.* (2003) verified that staphylococcal enterotoxin type A was only detected in reconstituted powdered milk when the *S. aureus* population reached levels of  $10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup>.

Anuniação *et al.* (1994) inoculated enterotoxin producer *S. aureus* strains at levels of  $10^2$  and  $10^4$  UFC·mL<sup>-1</sup> in pasteurized milk for cheese production. The enterotoxin was only detected in the cheese prepared with milk inoculated with  $10^4$  UFC·mL<sup>-1</sup>, after being maintained for 5 hours at 27 °C. When inoculating  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup> of *S. aureus* in goat's milk for the manufacture of cheese, Rozand *et al.* (1996) obtained enterotoxin B production from the 5th and 12th days, only in the treatments with  $10^5$  and  $10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup>.

Although *S. aureus* levels after vacuum evaporation do not pose a risk to public health, this microorganism can multiply during the crystallization of lactose reaching

potential for staphylococcal enterotoxin production. The multiplication of pathogen in food matrices such as milk, cheese cakes, creams, and meats, is well characterized in previous studies, but the development of *S. aureus* in concentrated whey has not yet been documented (Xing *et al.*, 2016; Lima, 2005; Peresi *et al.*, 2004; Rapiniet *al.*, 2002).

To verify if *S. aureus* is capable of using whey as a substrate, a growth curve was constructed employing the conditions used for the lactose crystallization. Note that in the culture incubated at 25 °C for 12 h, the growth curve shows lag, logarithmic and stationary phases well defined (Figure 3). However, the presence of lag and stationary phases was not observed in the culture of *S. aureus* in whey concentrate (Figure 3).

The growth rates of mixed culture *S. aureus* in BHI and whey were 0.42 and 0.04 (log UFC·mL<sup>-1</sup>)·h<sup>-1</sup>, respectively (Figure 3). After 12 h of incubation under stirring conditions simulating the industrial crystallization of lactose, a population of 10<sup>6</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> was found in the serum. As previously described, this population is worrisome because it presents a risk of production of thermoresistant enterotoxins that may persist in the final product (Necidová *et al.*, 2012).

Following processing, whey concentrate with crystallized lactose is subjected to spray drying. In industrial processes, the serum is injected into the drying chamber through a spray nozzle where it is dispersed in small droplets. The mist formed by the concentrated serum is brought into contact with a stream of heated air which promotes the instantaneous removal of water (Schuck *et al.*, 2010). The consequence of this is the formation of a particulate material (whey powder) with low water activity (~0.20) (Patel *et al.*, 2010).

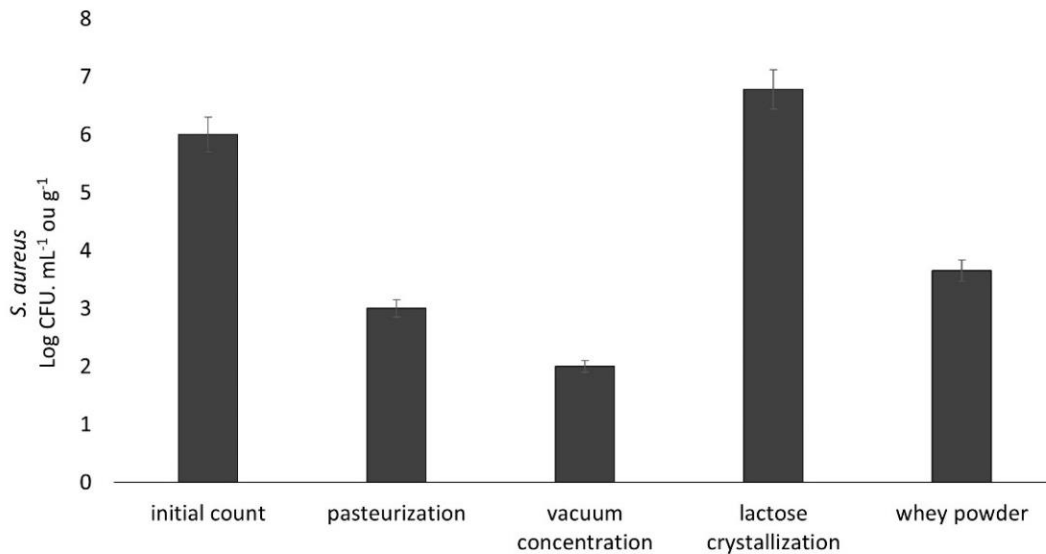
Although the drying process using of high inlet air temperatures (170 °C), the serum dehydration process occurs in a short period of time (30 to 90 s) (Schuck, 2002). Thus, evaporation of water occurs rapidly at reduced temperatures (~ 45 °C) and does not cause significant thermal stresses on the microorganism (Cebrián *et al.*, 2017).

Taking into account the concentrated whey presents solids between 50 and 60% and after drying solids between 97 and 99%, the final population in the whey powder is expected to be 10<sup>2</sup> UFC·g<sup>-1</sup>. However, after drying, it was found that the *S. aureus* population in the whey powder was 10<sup>3</sup> UFC·g<sup>-1</sup> (Figure 2).

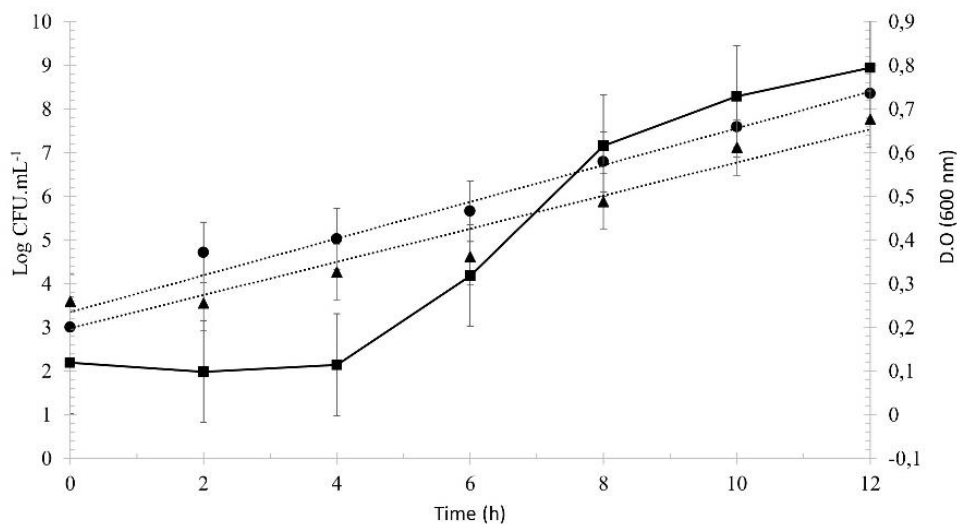
The levels of *S. aureus* found in the final product (10<sup>3</sup> UFC·g<sup>-1</sup>) do not present any risks to the consumer mainly due to the low *a<sub>w</sub>* which limits the multiplication of the pathogen and consequent production of enterotoxin. However evaluating the processing

history, the *S. aureus* population reached counts of  $10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup> (Figure 2) presenting a real risk of enterotoxin production.

Despite of the relatively low counts of whey powder, especially considering the high contamination load of the raw material, the product is outside the microbiological standards recommended by Commission of the European Communities, Regulation 2073/2005 (maximum of  $10^2$  UFC·g<sup>-1</sup>).



**Figure 2.** Number of viable cells (log UFC. mL<sup>-1</sup>) during stages of whey powder production.



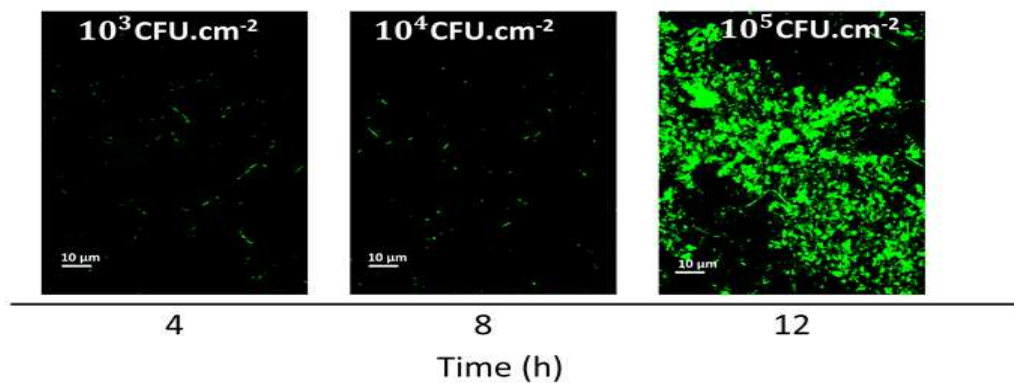
**Figure 3.** Growth curve of *S. aureus* at 25 °C/ 12 h. Growth curve in whey in log UFC· mL<sup>-1</sup> (●). Growth curve by optical density at 600 nm (▲). Growth curve in BHI broth by optical density at 600nm (-■-).

### 3.2. CONDITION 2: RECONTAMINATION OF THE FLUID MILK BY WHEY BIOFILMS

Various studies point *S. aureus* as a biofilm forming microorganism in stainless steel surfaces (Zouagh *et al.*, 2019; Rosmaninho *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2007) suggesting that this pathogen may be present in food processing environments. The formation of *S. aureus* biofilms in stainless steel using milk matrix has already been reported (Hamadi *et al.*, 2014; Boari 2009; Allignet *et al.*, 2001). However, the capacity of biofilm formation in environments containing whey has not yet been investigated.

In the previous section, it was demonstrated that *S. aureus* is capable of multiplying in concentrated whey during the lactose crystallization, which justifies the inference that it is possible the formation of biofilm during this stage. To evaluate *S. aureus* adhesion ability during the lactose crystallization, whey concentrated at 50 ° Brix and inoculated with approximately  $10^3$  UFC·mL<sup>-1</sup> of *S. aureus* was added of stainless steel coupons and maintained at 25 °C for 12 h under stirring.

Through the confocal microscopy analysis it was possible to observe the presence of adhered cells after 4 h of process ( $10^3$  UFC·cm<sup>-2</sup>) (Figure 4). At 12 h of incubation the number of cells adhered was approximately  $10^5$  UFC·cm<sup>-2</sup> (Figure 4) which can be characterized as a biofilm (Ronner & Wong, 1993; Wirtanen *et al.*, 1996). This result indicates that during the crystallization step in industrial scale, *S. aureus* can adhere to the surface of the crystallizer forming biofilm which acts as focus of the raw material recontamination.



**Figure 4.** Adhesion and biofilm formation during lactose crystallization step in

In a process condition in which the crystallizer has not been sanitized from one batch to another or has been precariously sanitized, the cells of the biofilm may be peeled off and contaminate the new whey free from *S. aureus*. To simulate this scenario, 2 stainless steel

coupons containing *S. aureus* biofilm formed at 25 °C for 12 h were inoculated into 300 ml of concentrated whey. The serum added of the coupons was maintained under lactose crystallization conditions and after 12 h of process an aliquot was collected to determine the biotransfer potential of the pathogen. It was found that *S. aureus* cells were able to migrate from the stainless steel surface to the concentrated whey and a final population of  $10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup> was reached at the end of the crystallization.

Concentrated serum recontaminated with *S. aureus* by biotransference was dried in spray dryer and the resulting powder had a count of  $10^3$  UFC·g<sup>-1</sup> of *S. aureus*. Again, the final product is outside the microbiological parameters allowed by Regulation 2073/2005 and the high population density of the pathogen during the crystallization of lactose enables the production of enterotoxins in the product.

#### 4. CONCLUSION

In this study it was evidenced that whey has nutritional composition favorable to the multiplication of *S. aureus*, which had not yet been documented in previous studies. Due to the facility with which this pathogen develops in the raw material, a high contamination of the fluid whey or flaws in the hygiene of equipment can allow the pathogen multiplication during the whey powder processing. The consequence of this is a final product with marginal microbiological quality and risks of carrying staphylococcal enterotoxins.

Reports of serum contamination with *S. aureus* have been reported in recent years, but this number is expected to increase due to the large growth in the world market for whey powder. This pioneering study presented two possible conditions of contamination occurrence in an industrial production line of whey powder and our results point to the need to control the raw material and adequate hygiene of the processing plant. This study may serve as a basis for the identification of critical control points in quality assurance programs applied to whey industries.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- Allign J *et al.*, (2001). *Staphylococcus* strains carry derminants known to be in volved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the ica operon involved in biofilm formation. *Infection and immunity*,69 ,712-718.
- Boari al (2009). Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 29,886-895.
- Borges, M.F. *et al.* Microrganismos patogênicos e em queijo de coalho produzido no Ceará, Brasil. (2003). *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*,21, 31-40.
- Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos (2015). <http://u.sude.gov.br/imagens/pdf/2015/novembro/09/Apresentadados DTA2015.pdf>. Acessado em: 03 de fevereiro de 2019.
- Can, H. Y.; Çelik, T. H. (2012). Dection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *S.aureus* in Turkish cheeses. *FoodControl*, 24, 100-103.
- Careli, R.T., *et al* (2009). The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthic polymers, and stainless steel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 171 – 176.
- Castro, V. C. *et al.* (2007). Pesquisa de coliformes e *Staphylococcus* coagulase positivo em queijo minas frescal comercializado em Teresina: Anais do congresso de pesquisa e inovação da rede norte nordeste de educação tecnológica, 55, 202-207.
- Cebrián *et al.*, (2016). Influência do crescimento e temperatura de tratamento naesistência de *Staphylococcus aureus* a campos elétricos pulsados: relação com a fluidez da membrana *Innovative Food Sci. Emerg. Technol*, 37,161 – 169.
- Desconsi, A. C.; Izário Filho, H. J, Salazar, R. F. S. dos. (2014).Avaliação físico-química e microbiológica do soro de leite concentrado obtido por osmose inversa. *Revista Ambiental e Água*, Taubaté, 9, 1-5.
- Ferreira *et al.*, (2015). *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo Minas frescal artesanal. *Publicações em Medicina Verinária e Zootecnia*, 5, 25-29.

Freitas, W. C.; Travassos, A. E. R.; Maciel, J. F. (2003). Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho produzidos no estado da Paraíba. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 15, 35-42.

Gleeson *et al.*, (2013). Revisão de fontes potenciais e controle de bactérias termodúricas em leite a granel. *Journal of Agricultural and Food Research*, 52, 217 - 227.

Hamadi, F. *et al.*, (2014). Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk. *Food Control*, 38, 104- 108.

Herrera *et al.*, (2007). Cinética de adesão e desprendimento de várias cepas de *Staphylococcus aureus* sob três diferentes condições experimentais. *Microbiologia de alimentos*, 24, 585 – 591.

International Organization of Standardization “ISO” (1999) No. 6888-1 microbiologia de alimentos e alimentos para animais - preparação de amostras de teste, suspensão inicial e diluições decimais para exame microbiológico - parte 2: regras específicas para a preparação de carne e produtos cárneos. 1-5.

Jr. Huck, M. Sonnen, KJ Boor (2008). Rastreamento de bactérias resistentes ao calor, deterioração do leite fluida e resfriamento de leite, da fazenda ao produto embalado. *Journal of Dairy Science*, 91, 1218 - 1228.

Lee, Heeyoung *et al.* (2015). Avaliação quantitativa do risco microbiano para *Staphylococcus aureus* em queijo natural e processado na Coreia. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021500483X#!>>. Acesso em: 03 fevereiro de 2019.

Loguercio, A. P, Aleixo, J. A. G. (2001) . Microbiologia de queijo tipo frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, 23, 1063-1067.

Malheiros, P.; Casarin, L. S.; Serraglio, L.; Tondo, E. C. (2010). Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and poly hylene and their disinfection, *Food Control*, 298–301.

Masters, K. (2002). *Spray Drying in Practices*. Denmark: SpraydryConsult International ApS, 2002. 464

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. (2013). Projeto de Instrução Normativa e seu Anexo que estabelecem os padrões de identidade e qualidade de soro de leite. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: 11 abr. 2013. Portaria em consulta pública – Válida até 10/05/2013.

Morton, R. D. (2001). Aerobic plate count. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. *American Public Health Association*. 66 – 67.

Nascimento, Irinéia Rosa; Santos, Danielle Gomes (2012). Avaliação da qualidade microbiológica do soro de queijo coalho artesanal no Município Nossa Senhora. 34, 13-18.

Necidová, L.; Janštová, B.; Karpíšková, R. (2012). Dynamics of staphylococcal enterotoxin production in model experiments simulating the fresh cheese environment. *Acta Veterinaria Brno*, 81, 391–396.

Oliveira, M. M. M.; Brugnera, D. F.; Piccoli, R. H. (2010). Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 277–284. ISSN 0073-9855.

Palaniappan et al., S. (2015). A diferença de temperatura entre um microorganismo e um meio líquido durante o aquecimento por microondas. *Jornal de Processamento de Alimentos e Preservação*, 15, 225-230.

Peresi, J. T. M. et al., (2004). Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto-SP. *Revista Inst. Adolfo Lutz*, 63, 232-237.

Perin, L. M., Moraes, P. M., Almeida, M. V., Nero, L. A. (2017). Interference of storage temperatures in the development of mesophilic, psychrotrophic, lipolytic and proteolytic microbiota of raw milk. *Revista Ciências Agrárias*, 333-342.

Rapini, L.S. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Listeria* sp. e *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo tipo coalho. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 327, 60-65.

Rodrigues, et al., (2017). Efeitos do óleo essencial de orégano e carvacrol em biofilmes de *Staphylococcus aureus* a partir de superfícies de contato com alimentos. *Controle de Alimentos*, 1237-1246.

- Ronner, A. B.; Wong, A. C. L. (1993). Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. *Journal of Food Protection*, 56, 750-758.
- Rosmaninho *et al.*, (2007). Superfícies modificadas de aço inoxidável destinadas a reduzir a contaminação da incrustação de incrustações por componentes do leite. *Revista de Engenharia de Alimentos*, 80, 1176 – 1187.
- Rossoni, E. M. M.; Gaylarde, C. C. (2000). Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*. 81–85.
- Rozand, C. V (1996). Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 271-280.
- Santos, ES. (1999). Psicrotóxicos: Consequência de sua presença em leites e queijos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 129- 138.
- Schuck. P. (2002). Spray Drying of dairy products: state of the art. *Lait*. 82, 375–382.
- Spanu, V. *et al.* (2012). Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 53–57.
- USDA- United States Department of Agriculture/ Foreign Agricultural Service Approved by the World Agricultural Outlook Board/USDA- Dairy: Word Marks (2018): <https://usdasearch.usda.gov/search?utf8=%E2%9C%93&affiliate=usda&query=leite>. Acessado em 30 de janeiro de 2019.
- Viçosa, G. N.; Moraes, P. M.; Yamazi, A. K.; Nero, L. A. (2010). Enumeration of coagulase and thermonuclease positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: an evaluation of BairdParker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the P rifilm™ Staph Express count system. *Food Microbiology*, 27, 447- 452.
- Wang, X. *et al.* (2012). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from powdered infant formula milk and infant rice cereal in China. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 142–147.

Wirtanen, G. *et al.* (1996). Microbial evaluation of the bio transfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *Journal of Food Protection*, 59, 727-733.

Wolf *et al.*, (2008). Proteomic analysis of antioxidant strategies of *Staphylococcus aureus*: Diverse responses of diferente oxidants. *Journal of Proteomics*. 3139-3159.

Xing *et al.*, (2016) Prevalência e caracterização de *Staphylococcus aureus* isolado de plantas de processamento de leite em pó de cabra. *Controle de Alimentos*, 59, 644 – 650.

Zurita, Jeann e; Mejía, Carlos; Guzmánblanco, Manuel. (2010). Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à m icilina na América Latina. Brazilian. *Journal Of Infectious Diseases*, 14, 1-7.