

CLÁUDIA LÚCIA DE OLIVEIRA PINTO

**BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS PROTEOLÍTICAS DO LEITE CRU
REFRIGERADO GRANELIZADO DESTINADO À PRODUÇÃO DO
LEITE UHT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P659b
2004

Pinto, Cláudia Lúcia de Oliveira, 1959-
Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrige-
rado granelizado destinado à produção do leite UHT /
Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto. – Viçosa : UFV, 2004.
x, 97f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 82-93.

1. Leite - Bacteriologia. 2. Leite - Resfriamento. 3.
Leite - Armazenamento. 4. Leite - Controle de qualidade.
5. Bactérias psicrotróficas. 6. Enzimas proteolíticas. I. Uni-
versidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 637.1277

CLÁUDIA LÚCIA DE OLIVEIRA PINTO

**BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS PROTEOLÍTICAS DO LEITE CRU
REFRIGERADO GRANELIZADO DESTINADO À PRODUÇÃO DO
LEITE UHT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 3 de maio de 2004

Prof^ª. Célia Alencar de Moraes
(Conselheira)

Prof. Sebastião César Cardoso Brandão
(Conselheiro)

Prof. Nélcio José de Andrade

Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva

Prof^ª. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

Aos meus avós.

Aos meus pais.

Aos meus irmãos.

Ao Newton e aos nossos filhos Henrique, Nádia e Alexandre.

A todos os profissionais envolvidos na cadeia produtiva do leite.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, que, por meio de seus professores e funcionários, dedicaram a minha pessoa elevada estima.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, pelo incentivo em meus estudos.

À Fundação André Tozello.

À professora orientadora, Maria Cristina Dantas Vanetti, por sua valiosa colaboração e empenho na realização desta pesquisa.

À professora Célia Alencar de Moraes, pelos aconselhamentos, pela valiosa colaboração e pelo apoio constante.

Ao professor Sebastião César Cardoso Brandão, pelos aconselhamentos e pela valiosa colaboração.

Aos professores da UFV, Nélcio José de Andrade, José Benício Paes Chaves, José Mário Mezencio, pelas sugestões e pelo apoio.

À pesquisadora Margarida Maria Nascimento Figueiredo, ex-pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, pelo apoio e incentivo.

Ao pesquisador e colega de jornada profissional na EPAMIG, Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva, pelas sugestões e pelo apoio.

À diretoria da Cooperativa de Leite, que disponibilizou sua planta industrial para coleta de amostras de leite, e aos seus funcionários.

Aos caros amigos Maurílio Lopes Martins e Eliana Maurício Furtado Martins, pela colaboração constante.

Ao engenheiro de alimentos Rodrigo Cardoso, pela amizade e colaboração na condução desta pesquisa.

Ao professor Fernando Reis, da UFV, e à cara amiga Alcinéia.

Aos professores, Marluce Ribeiro, Maurício Dutra Costa, Tânia Fernandes, Valéria, da UFV, e Marco Antônio, da UFJF.

Aos professores Maurílio Alves Moraes e Everaldo Gonçalves de Barros, à Dra. Rita Maria Alves Moraes e ao João Paulo do Laboratório de Genética Molecular de Plantas-Proteína do BIOAGRO-UFV, pelo apoio nas análises de eletroforese.

Ao professor Marcos Tótola, da UFV, e sua esposa Cássia.

Aos pesquisadores Leônidas P. Passos, Maria Coletta Vidigal, da EMBRAPA-Gado de Leite, e Danielle Braga da EPAMIG CT/ILCT, pela colaboração.

Ao Newton Alexandre Camacho Gomide, meu esposo e companheiro, pelo apoio constante, e aos nossos filhos, Henrique, Nádia e Alexandre, pela compreensão e pelos sorrisos em todos os momentos.

Aos meus queridos irmãos, Pedro José, Miriam Aparecida, Sebastião e Maurício, companheiros de todas as horas em toda a minha vida e grandes incentivadores, e aos meus sobrinhos, Fernanda, Marcela, Monique, Renato e Rodrigo.

Ao pesquisador Sérgio Casadini Vilela, constante incentivador e amigo.

Aos amigos, Sr. Newton de Carvalho Gomide e Rita Camacho.

Ao Vasconcelos Reis Wakim, responsável pelo setor de informática do CTZM/EPAMIG, pelo apoio constante.

Às extensionistas Luciene e Cormarie da EMATER, Viçosa, MG, e à Adriana, atual Secretária Municipal de Agricultura e Meio Ambiente de Viçosa, MG.

Às pesquisadoras Maria José Granate e Cleide Ferreira Pinto, pelo apoio e estímulo.

À pesquisadora Evelise Oliveira Telles Ramos e Silva, pelo apoio e pela boa vontade.

Aos colegas do CTZM da EPAMIG, das áreas de administração, de pesquisa e de apoio, companheiros e incentivadores.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia da UFV, Esther, Uelinton, Cristiane, Elizete, Bruno, Patrícia, Simone, Agenor, José Reinaldo, José Carlos, Cesário, Sr. Paulo, Laura, Nilcéia e Aparecida, pelo convívio sempre positivo.

À Elenice, Betânia, Lucimar e Cecília, pelo constante apoio e incentivo;

À memória dos professores Edson Clemente dos Santos e José de Alencar, pelos bons exemplos e pelo incentivo.

À memória dos meus queridos pais, Maria de Lourdes e Sebastião, e dos meus queridos avós, Delphina e Pedro.

E, finalmente, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

BIOGRAFIA

Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, filha de Sebastião Ferreira Pinto e Maria de Lourdes Ferreira de Oliveira Pinto, é natural de Juiz de Fora, Minas Gerais, onde realizou os estudos básicos.

Em 1980, concluiu o Curso Técnico em Leite e Derivados, pelo Instituto de Laticínios Cândido Tostes – EPAMIG, e, em 1984, diplomou-se como Farmacêutica-Bioquímica pela Universidade Federal de Juiz de Fora. Realizou estágio na área de ensino, entre 1984 e 1985, na EPAMIG/Centro Tecnológico/ Instituto de Laticínios Cândido Tostes, em Juiz de Fora, MG.

Em 1986, foi admitida pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, para atuação nas áreas de ensino e pesquisa.

Foi admitida, em 1991, no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, nível de Mestrado, no Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concluindo o curso em abril de 1994.

Foi selecionada, em 1999, pela Comissão do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para o nível de Doutorado, no Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concentrando-se na área de Microbiologia de Alimentos, defendendo a tese em 03 de maio de 2004.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O sistema de granelização do leite cru refrigerado na fonte de produção e alguns aspectos de legislação.....	3
2.2. A estabilidade térmica do leite	5
2.3. Bactérias psicrotróficas contaminantes do leite	7
2.4. Proteólise e lipólise no leite e derivados	12
2.5. Influência da microbiota psicrotrófica sobre a qualidade do leite UHT	15
2.6. Resistência térmica de enzimas bacterianas à esterilização comercial.....	17
2.7. Adesão e formação de biofilmes por bactérias psicrotróficas ...	19
2.8. Métodos de controle da microbiota que afeta a qualidade do leite UHT	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Amostragem.....	24
3.2. Microbiota bacteriana característica de leite cru refrigerado granelizado.....	26
3.2.1. Lactofermentação	26
3.2.2. Contagens de bactérias mesofílicas	26
3.2.3. Contagem de bactérias psicrotróficas - isolamento e iden- tificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas	26
3.3. Análises estatísticas	27
3.4. Caracterização de bactérias psicrotróficas proteolíticas	27

3.4.1. Atividade de protease, lipase e lecitinase de bactérias psicrotróficas proteolíticas.....	27
3.4.2. Termoestabilidade de enzimas proteolíticas em sobrenadantes de culturas de bactérias psicrotróficas proteolíticas.....	28
3.4.3. Crescimento de isolados psicrotróficos proteolíticos em temperaturas de refrigeração, determinação do grau de proteólise e estabilidade térmica do leite.....	29
3.4.4. Efeito do crescimento de isolados psicrotróficos proteolíticos sobre as proteínas do leite.....	30
3.4.5. Adesão de bactérias psicrotróficas proteolíticas em superfície de aço inoxidável.....	31
3.5. Fatores de estabilidade de leite UHT.....	32
3.5.1. Determinação da massa de sedimentos.....	32
3.5.2. Grau de proteólise.....	33
3.5.3. Atividade proteolítica.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. Microbiota bacteriana característica de amostras de leite cru refrigerado granelizado.....	34
4.1.1. Lactofermentação.....	34
4.1.2. Contagem de bactérias mesofílicas e mesofílicas proteolíticas.....	35
4.1.3. Contagem de bactérias psicrotróficas - isolamento e identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas.....	38
4.2. Características das bactérias psicrotróficas isoladas de leite cru refrigerado granelizado.....	46
4.2.1. Atividade de enzimas hidrolíticas em diferentes temperaturas e produção de pigmentos fluorescentes.....	46
4.2.2. Adesão de bactérias psicrotróficas proteolíticas em superfície de aço inoxidável.....	48
4.2.3. Termoestabilidade de enzimas proteolíticas em sobrenadantes de culturas de bactérias psicrotróficas proteolíticas.....	50
4.2.4. Crescimento de <i>P. fluorescens</i> em temperaturas de refrigeração e grau de proteólise do leite.....	53
4.2.5. Efeito do crescimento de <i>P. fluorescens</i> sobre as proteínas do leite.....	61
4.3. Fatores de estabilidade de leite UHT.....	72
4.3.1. Sedimentos.....	72
4.3.2. Grau de proteólise.....	73
4.3.3. Atividade proteolítica.....	75
5. CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
APÊNDICE A.....	94
APÊNDICE B.....	96
APÊNDICE C.....	97

RESUMO

PINTO, Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, D.S. Universidade Federal de Viçosa, maio de 2004. **Bactérias psicotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite UHT.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Conselheiros: Célia Alencar de Moraes e Sebastião César Cardoso Brandão.

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de fatores determinados pela granelização do leite cru refrigerado na estabilidade do leite. Foram enfatizados os efeitos da temperatura de refrigeração e do tempo de estocagem na composição da microbiota contaminante do leite cru, na atividade proteolítica do leite, na atividade enzimática residual após tratamento UHT, bem como seu possível efeito na estabilidade do leite UHT. Amostras de leite cru coletadas em tanques de refrigeração, na fonte de produção e no silo de uma indústria processadora de leite UHT, foram analisadas quanto as suas características microbiológicas. Bactérias psicotróficas proteolíticas Gram-negativas e Gram-positivas foram isoladas do leite cru refrigerado, sendo o gênero *Pseudomonas* o mais frequentemente isolado, especialmente a espécie *P. fluorescens*. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas fermentadoras de glicose apresentaram predominantemente atividade proteolítica a 6,5, 21 e 35°C e bactérias Gram-negativas não-fermentadoras de glicose apresentaram um maior percentual de isolados com atividades associadas de proteases, lipases

e lecitinases a 6,5 e 21°C, ressaltando seu maior potencial deteriorador. A presença de atividade de enzimas proteolíticas termorresistentes foi observada em sobrenadantes de culturas de bactérias psicrotróficas proteolíticas. A capacidade de adesão a superfícies de aço inoxidável foi constatada em bactérias psicrotróficas proteolíticas Gram-positivas e Gram-negativas até uma densidade de 10^5 células por cm^2 , quando inoculadas em leite desnatado esterilizado a 7°C, por 48 horas. Observou-se o crescimento de *P. fluorescens* inoculado em leite desnatado a 2, 4, 7 e 10°C, constatando-se o aumento de sua população, do grau de proteólise e da velocidade específica máxima de crescimento com o aumento da temperatura de estocagem. O tempo, em dias, para a perda de estabilidade térmica dessas amostras foi maior a 2 e a 4°C, em relação a 7 e 10°C. Por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida observou-se que a temperatura e o tempo de estocagem influenciaram na hidrólise das frações de caseína e da albumina. As amostras de leite cru integral, coletadas assepticamente e usadas como controle, não diferiram quanto aos perfis eletroforéticos após seis dias de estocagem, nas temperaturas avaliadas, demonstrando a importância de investimentos para a implementação de práticas higiênicas de obtenção e conservação da matéria-prima. O tratamento UHT reduziu, em média, 93,2% da atividade proteolítica presente no leite cru integral usado como matéria-prima para o processamento do leite UHT, indicando a presença de atividade proteolítica residual de origem bacteriana e, ou, endógena. Observou-se o aumento da massa de sedimentos, do grau de proteólise e da atividade proteolítica durante a estocagem do leite UHT integral a 37°C, por 120 dias. Em nenhuma das amostras de leite UHT foram constatadas contaminações por bactérias mesofílicas e por bactérias mesofílicas esporuladas, além de indícios de gelificação. Todas as amostras permaneceram termicamente estáveis durante o período de validade do produto.

ABSTRACT

PINTO, Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, D.S. Universidade Federal de Viçosa, May 2004. **Proteolytic psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk raw milk for UHT milk production.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Committee Members: Célia Alencar de Moraes and Sebastião César Cardoso Brandão.

This work aimed at investigating the effect of variables determined for refrigerated bulk raw milk on milk stability. Emphasis was given to the effects of refrigeration temperature and storage time on raw milk's contaminant microbiota composition, proteolytic activity, residual enzymatic activity after UHT treatment as well as their possible effect on UHT milk stability. Samples of bulk raw milk, collected from cooling tanks at the production sites and from a silo of a UHT milk processing industry were analyzed for microbiological characteristics. Gram-negative and Gram-positive proteolytic psychrotrophs were isolated from the refrigerated raw milk, with the genus *Pseudomonas* being the most frequently isolated strain, especially the species *P. fluorescens*. Gram-positive and Gram-negative glucose-fermenting bacteria presented a predominantly proteolytic activity at 6.5, 21, and 35°C and Gram-negative non-glucose fermenting bacteria presented a higher percentage of isolates with activities associated to proteases, lipases, and lecithinase at 6.5 and 21°C, indicating their higher deteriorating potential. The presence of heat-resistant proteolytic

activity was observed in the supernatants of psychrotrophic bacterial cultures. The capacity to adhere to stainless steel surfaces was confirmed in Gram-positive and Gram-negative proteolytic psychrotrophics up to a density of 10^5 cells per cm^2 inoculated in sterilized skim milk at 7°C after 48 h of incubation. The maximum specific growth rate and the proteolytic activity of *P. fluorescens* inoculated in skim milk increased with increasing storage temperatures (2, 4, 7 and 10°C). Heat-stability loss (in days) for these samples was higher at 2 and at 4°C , in relation to 7 and 10°C . Temperature and storage time influenced the hydrolysis of casein and albumin. The raw whole milk samples, aseptically collected and used as control, showed no changes in the electrophoretic profiles after six storage days under the temperatures evaluated, showing the importance of investing on the implementation of hygienic practices of raw material acquisition and conservation. The UHT treatment reduced, on average, 93.2% of the proteolytic activity in the raw whole milk used as raw material for UHT milk processing, indicating the presence of residual proteolytic activity of bacterial and, or endogenous origin. Increased sediment mass, proteolysis degree, and proteolytic activity were observed during storage of UHT whole milk at 37°C , for 120 days. None of the UHT milk samples were found to be contaminated with sporulating mesophilic bacteria or showed signs of gelation. All the samples remained heat stable during shelf-life.

1. INTRODUÇÃO

O procedimento de estocagem do leite cru na fonte de produção, sob refrigeração, possui, como vantagens, a redução simultânea dos custos operacionais de produção e a redução da perda da matéria-prima pela atividade acidificante das bactérias mesofílicas. Entretanto, deve-se considerar que a conservação do leite cru em temperaturas de refrigeração, por períodos prolongados, pode resultar em perda de qualidade dos produtos lácteos associados ao crescimento e à atividade enzimática de bactérias psicrotróficas.

As proteases produzidas por bactérias psicrotróficas podem tornar o leite instável ao calor, provocar a coagulação durante a pasteurização, a gelificação do leite UHT (“Ultra High Temperature”), o desenvolvimento de vários sabores e odores indesejáveis, a redução do rendimento na produção de queijos e a ocorrência de textura anormal em alguns tipos de queijos. Portanto, se o leite cru é submetido a períodos de estocagem prolongados sob refrigeração, o controle de psicrotróficos na matéria-prima pode ser mais importante do que o realizado após o processamento.

Os procedimentos inadequados de higiene na cadeia produtiva do leite e a microbiota contaminante do ambiente são considerados as principais causas de contaminação dos produtos por microrganismos psicrotróficos deterioradores e, ou, patogênicos. A presença de microrganismos na forma de biofilmes em superfícies de contato com os alimentos pode levar a contaminações antes e após o processamento, causando problemas de saúde pública e de ordem

econômica. Bactérias relacionadas à formação de biofilmes incluem as deterioradoras, a exemplo de *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, e as patogênicas, como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, estirpes enteropatogênicas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

As temperaturas de refrigeração recomendadas para o armazenamento do leite na fonte de produção permitem o crescimento de bactérias psicrófilas, a produção e a atividade de suas enzimas.

No Brasil, não existe uma regulamentação específica sobre a qualidade microbiológica do leite cru para a fabricação de produtos lácteos específicos. Entretanto, com o conhecimento da qualidade do leite cru, pode-se prever a qualidade de produtos lácteos subsequentemente manufaturados, incluindo o leite UHT.

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de fatores determinados pela granelização do leite cru refrigerado na estabilidade do leite. Foram enfatizados os efeitos da temperatura de refrigeração e do tempo de estocagem na composição da microbiota contaminante do leite cru, na atividade proteolítica do leite, na atividade enzimática residual após tratamento UHT, bem como seu possível efeito na estabilidade do leite UHT.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O sistema de granelização do leite cru refrigerado na fonte de produção e alguns aspectos de legislação

A estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção iniciou-se em 1939, em grandes fazendas nas proximidades de Los Angeles, na Califórnia, expandindo-se posteriormente, de forma gradual, para outras regiões do Estado. Nos Estados Unidos, a grande mudança do sistema ocorreu no final da década de 50; na Inglaterra, no início da década de 70; e na Argentina, no final da década de 80 e início da década de 90. No Brasil, o início de sua implementação ocorreu na segunda metade da década de 90, sendo regulamentada em 2002 por meio da Instrução Normativa 51/2002 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002a, b).

A década de 90 representou para o Brasil um marco de divisão entre um modelo arcaico de produção de leite e a modernização dessa atividade econômica primária, com seus reflexos nos ganhos de produtividade, no início de um processo de competitividade com os produtos lácteos importados e na ampliação substancial da qualidade dos produtos oferecidos aos consumidores. A modernização do setor produtivo de leite e de seus derivados ocorreu a partir das primeiras regulamentações técnicas elaboradas para atender à uniformização de produtos circulantes entre os países do MERCOSUL, em 1992, e

que fixaram padrões de identidade e de qualidade dos produtos lácteos de maior interesse comercial (OLIVEIRA et al., 2000).

Em 1996, por iniciativa do Ministério da Agricultura, da Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite e de diversos representantes da comunidade científica, foi criado o “Programa Nacional de Melhoria de Qualidade do Leite” – PNMQL (OLIVEIRA et al., 2000). A justificativa econômica para a execução do PNMQL foi demonstrada em diagnósticos previamente realizados de perdas econômicas significativas na cadeia produtiva do leite pela condenação deste em decorrência da acidez elevada do leite, ocorrência de mastite no rebanho ou outras zoonoses, perdas de produtividade do rebanho, perdas no transporte, na transformação da matéria-prima, na produtividade industrial, perdas de qualidade do produto acabado em função da má qualidade da matéria-prima, falta de confiança do consumidor no produto brasileiro e o risco de que a sua imagem fosse prejudicada em razão da baixa qualidade. A consequência do diagnóstico feito no PNMQL foi o aperfeiçoamento da legislação federal, datada de 1952, provendo-a dos meios capazes de alavancar, juntamente com outras iniciativas dos setores público e privado, o desenvolvimento e a modernização do setor laticinista nacional.

De acordo com OLIVEIRA et al. (2000), espera-se que a mudança de maior impacto da nova legislação seja a substituição do leite cru “tipo C”, dentro de prazos predeterminados, por matéria-prima resfriada na propriedade rural e transportada a granel, até à indústria. Esta nova categoria de leite terá padrões de qualidade progressivos, com a expectativa de alcançar os padrões de qualidade do leite cru “tipo B”, resultando na fusão dos padrões de ambos os tipos de leite.

De acordo com a Resolução Normativa do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002a), no sistema de coleta a granel, os tanques de refrigeração por expansão direta devem ser dimensionados de forma tal que permitam a refrigeração do leite à temperatura igual ou inferior a 4°C, no período máximo de três horas após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade. Os tanques de refrigeração por imersão devem ser dimensionados de modo que permitam a refrigeração do leite à temperatura igual ou inferior a 7°C, também no período máximo de três horas, após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade. O uso coletivo de tanques de refrigeração a

granel, denominados de tanques comunitários, é admitido, desde que baseados no princípio de operação por expansão direta. Portanto, não são admitidos tanques de refrigeração comunitários que operem pelo sistema de imersão de latões. A temperatura máxima de conservação do leite é de 7°C na propriedade rural, em tanques comunitários, e de 10°C no estabelecimento processador. A localização do equipamento deve ser estratégica, facilitando a entrega do leite de cada ordenha no local onde o mesmo estiver instalado. Não é permitido acumular, em determinada propriedade rural, a produção de mais de uma ordenha para enviá-la, uma única vez ao dia, ao tanque comunitário.

A Instrução Normativa do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2002a) estabelece ainda que o tempo transcorrido entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento industrial, que irá beneficiá-lo, deve ser de, no máximo, 48 horas, independentemente de seu tipo; recomendando como ideal um período não superior a 24 horas. Posteriormente, o leite refrigerado é recolhido e transportado em caminhões providos de tanques isotérmicos até à indústria (BRASIL, 2002a). Entretanto, alguns aspectos do processo de granelização são preocupantes, como a utilização de tanques de refrigeração coletivos, o tempo de refrigeração e a temperatura máxima do leite na propriedade rural.

2.2. A estabilidade térmica do leite

A estabilidade térmica do leite é definida como o tempo necessário para que ocorra uma coagulação visível do leite a uma determinada temperatura e a um determinado pH. Portanto, a estabilidade térmica corresponde à capacidade do leite de resistir à coagulação pelo calor, indicando a sua aptidão para o processamento de produtos lácteos. Do ponto de vista tecnológico, torna-se importante a determinação das reações que influenciam a velocidade de coagulação térmica, logo os principais fatores que influenciam esta estabilidade incluem o tempo e a temperatura de tratamento térmico, o pH, o equilíbrio salino, a concentração natural de uréia, a estabilidade das micelas de caseína, o período de lactação, a alimentação deficiente do rebanho e mastite (WALSTRA e JENNES, 1984; SILVA e ALMEIDA, 1998).

A estimativa da estabilidade térmica do leite pela realização do teste do álcool ou do alizarol constitui um procedimento recomendado e previsto na

legislação para avaliar o efeito do tratamento térmico no leite cru, considerando que os fatores que afetam a estabilidade térmica e a estabilidade ao etanol são praticamente comuns (SILVA e ALMEIDA, 1998).

As caseínas constituem um grupo de fosfoproteínas específicas do leite, que se caracterizam por apresentar baixa solubilidade a pH 4,6. Elas estão na forma de micelas representadas por partículas interligadas, contendo maior proporção de proteína e uma concentração considerável de cálcio e de fosfato.

A existência e as propriedades das micelas de caseína são, em grande parte, responsáveis pela estabilidade dos produtos lácteos durante o aquecimento, concentração e armazenamento. Além disso, as micelas de caseína interagem com as interfaces de ar-água e gordura-água, sendo esta última uma interação especialmente importante na homogeneização, além de afetar determinadas propriedades, incluindo estabilidade e viscosidade dos produtos homogeneizados.

No leite não resfriado, grande parte da caseína apresenta-se como partículas mais ou menos esféricas, sendo que a maioria delas possui diâmetro variável entre 0,02 e 0,3 μm , compreendendo de 20 a 150.000 moléculas de caseína, contendo em matéria inorgânica, especialmente fosfato de cálcio, uma proporção aproximada de 8 g por 100 g de caseína. As partículas são volumosas, contendo maior concentração de água do que de caseína e, ainda, contêm pequenas quantidades de outras proteínas, incluindo as enzimas lácteas, lipase e plasmina, e parte da proteose-peptona. Toda a caseína está em solução quando a concentração, o pH e a força iônica são as características do leite, porém uma menor atividade de íons Ca^{2+} resulta na formação de agregados (WALSTRA e JENNES, 1984).

Os agregados, como as proteínas globulares, possuem uma porção central densa e hidrofóbica, onde se encontram a maioria das partes hidrofóbicas da molécula de caseína e capas hidrófilas externas, que contêm a maioria dos grupamentos ácidos (carboxílico e fosfórico) e alguns grupamentos básicos.

As submicelas correspondem a cada um dos pequenos agregados, caracterizando-se por apresentarem diversas moléculas de caseína em proporções diferentes, com relação molar das principais caseínas, aproximadamente de $\alpha_{s1}:(\beta+\gamma):\kappa:\alpha_{s2} = 8:8:3:2$, apresentando variabilidade em sua

proporção, especialmente a κ -caseína, e diferenças no grau de glicolisação e fosforilação das caseínas κ e α_{s2} , respectivamente. A κ -caseína encontra-se no leite, provavelmente, na forma de oligômero, contendo diversas moléculas unidas por ligações covalentes (-S-S-) e, como consequência, podem existir dois tipos de submicelas, com e sem κ -caseína (WALSTRA e JENNES, 1984).

As submicelas são ligadas por fosfato de cálcio amorfo e ésteres fosfatos. Assim, praticamente todas as regiões nas moléculas de caseína possuem mobilidade restrita. A porção carboxi-terminal da κ -caseína está, em sua maioria, na forma de filamentos flexíveis, orientados para o meio externo.

A fração κ -caseína (κ -CN) possui regiões de grande hidrofília orientando-se para o exterior, enquanto as demais frações orientam-se para o interior. Assim, a fração κ -CN atua como estabilizadora da micela, considerando-se que elas, independentemente da temperatura, apresenta solubilidade ao Ca^{2+} . Além disso, a fração κ -CN caracteriza-se por ser glicosilada, possuindo em sua estrutura ácido N-acetil-neuramínico, ácido glutâmico e ácido piroglutâmico. A estabilidade do complexo micelar caseínico é conferida pela repulsão espacial decorrente dos filamentos de κ -CN e repulsão entre os grupamentos carboxila que possuem carga negativa, glicopeptídeos hidrófilos e camada de solvatação. Dentre as proteínas do leite, as soroproteínas representadas pelas imunoglobulinas, soro albumina bovina, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina apresentam maior sensibilidade ao calor (WALSTRA e JENNES, 1984; SILVA e ALMEIDA, 1998).

2.3. Bactérias psicotróficas contaminantes do leite

A adoção da prática de estocagem sob refrigeração na fonte de produção praticamente elimina a deterioração do leite por bactérias mesofílicas (FAIRBAIRN e LAW, 1986). Entretanto, a manutenção do leite cru em temperaturas de refrigeração pode ocasionar problemas tecnológicos associados à seleção de bactérias psicotróficas (COUSIN, 1982). Esses organismos são capazes de se multiplicar a 7°C ou menos, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento (COUSIN, 1982). Para isto, eles possuem mecanismos de adaptação a baixas temperaturas que devem ser conhecidos e

considerados, o que pode auxiliar no controle do crescimento desses organismos no leite. A adaptação a baixas temperaturas é dependente de modificações dos lipídeos e das proteínas. Segundo RUSSELL (1990), as alterações nos lipídeos são importantes no mecanismo de regulação da fluidez e permeabilidade da membrana celular. De acordo com este autor, alterações nas proteínas são de natureza genotípica e são relacionadas às propriedades das enzimas e ao sistema de tradução.

A concentração de lipídeos na maioria das bactérias, está entre 2 e 5%, sendo que a maior parte ou todo o seu conteúdo é localizado na membrana celular. Uma grande parte dos microrganismos psicotróficos sintetiza lipídeos neutros e fosfolipídeos com maior proporção de ácidos graxos insaturados quando crescem em temperaturas baixas (JAY, 1996). As modificações do conteúdo de ácidos graxos na membrana da célula microbiana, induzidas por baixas temperaturas, sugerem que essas alterações estejam associadas a mecanismos fisiológicos da célula. O aumento do grau de insaturação dos ácidos graxos leva a um decréscimo no ponto de fusão do lipídeo. Portanto, o aumento da síntese de ácidos graxos insaturados a baixas temperaturas tem como função manter o lipídeo em estado líquido, permitindo que a membrana continue exercendo sua atividade. Este conceito é conhecido como “teoria da solidificação de lipídeos” (JAY, 1996). Essa modificação não é observada em espécies do gênero *Pseudomonas*, considerando que espécies psicotróficas desse gênero já contêm de 59 a 72% de lipídeos insaturados em sua membrana, o que lhes confere maior versatilidade em relação à maioria dos microrganismos (JAY, 1996).

Para a preservação de fluxo metabólico a baixas temperaturas, é necessária uma adaptação da estrutura da enzima para que ela possa manter sua capacidade catalítica eficiente. As enzimas adaptadas ao frio são, em geral, caracterizadas por apresentarem alta atividade específica a baixas temperaturas (GERDAY et al., 1997; CHESSA et al., 2000; GERDAY et al., 2000).

A estrutura tridimensional de enzimas extracelulares e intracelulares de bactérias psicotróficas e psicofílicas tem sido elucidada pelo uso de técnicas de modelagem de proteínas ou por cristalografia com raios-X (RUSSEL et al., 1998). Os resultados desses estudos demonstram que a maioria das alterações encontradas consiste em um decréscimo na força de ligação entre os

grupamentos hidrofóbicos e do número de ligações iônicas. Outras variáveis que podem ser potencialmente envolvidas na adaptação de proteínas ao frio têm sido discutidas e parecem ser específicas de algumas enzimas, como o decréscimo de resíduos de prolina e de arginina, um aumento nos resíduos de glicina ou nas interações com o solvente, além de uma melhor acessibilidade do sítio catalítico do substrato (RUSSEL et al., 1998). Algumas dessas modificações, entretanto, também se originam de condições ambientais e de mutagênese sítio-direcionadas. GOVERDE et al. (1998) constataram em um mutante de *Yersinia enterocolitica*, restrito na capacidade de crescer a 5°C, que esta bactéria requer a expressão do gene que codifica para a produção de fosforilase polinucleotídeo, para crescimento a baixas temperaturas.

SVINGOR et al. (2001) estudaram a estabilidade térmica, flexibilidade conformacional e parâmetros cinéticos da enzima purificada 3-isopropilamato desidrogenase (IPMDH) da bactéria psicrófila *Vibrio* sp. expressa em *Escherichia coli*. Esta enzima, adaptada ao frio, é altamente homóloga com IPMDHs de outros organismos, como de *E. coli* e *Thermus thermophilus*, uma bactéria termofílica. Os autores constataram que as enzimas de *E. coli* e *T. thermophilus* são ativas apenas à temperatura ambiente, apresentando redução da flexibilidade conformacional e da atividade específica com o decréscimo da temperatura. Entretanto, a IPMDH do *Vibrio* apresentou atividade razoável abaixo da temperatura ambiente, com atividade residual ainda bem alta para realização das suas funções fisiológicas. A estratégia de adaptação ao frio, nesse caso, foi alcançada pela síntese desta enzima ainda extremamente eficiente à baixa temperatura, mesmo com a redução parcial de sua atividade.

De acordo com GERDAY et al. (1997), a estrutura tridimensional das enzimas α -amilase, β -lactamase, lipase e subtilisina vem sendo comparada com a de seus homólogos e parece que a adaptação molecular a baixas temperaturas reside no enfraquecimento das interações intramoleculares e, em alguns casos, no aumento da interação com o solvente, levando a uma estrutura molecular mais flexível, capaz de realizar a catálise com baixo gasto de energia. A compensação térmica das enzimas adaptadas ao frio é alcançada por meio do aumento da eficiência catalítica. A otimização dos fatores catalíticos pode dar origem a uma estrutura altamente flexível, que apresenta

modificações conformacionais durante a catálise (FELLER e GERDAY, 1997; RUSSEL, 1997; RUSSEL et al., 1998).

Além das modificações celulares para a manutenção da fluidez da membrana e da atividade enzimática, outros mecanismos são reconhecidos como importantes para o crescimento de bactérias a temperaturas baixas. A síntese de solutos compatíveis e a manutenção da integridade estrutural de macromoléculas e de grupos de macromoléculas, incluindo os ribossomos e outros componentes que afetam a expressão gênica, são exemplos de estratégias para a adaptação a temperaturas baixas. A resposta específica ao frio, que é comum a bactérias relacionadas com alimentos, é representada pela indução da síntese de proteínas, denominadas de “Proteínas do Choque Frio” (CSPs), que são proteínas pequenas, com massa molecular de 7 kDa, envolvidas na estrutura do mRNA, na síntese de proteína e, ou, proteção ao congelamento (JAY, 1996; RUSSEL, 1997; WOUTERS et al., 2000; CAVICCHIOLI et al., 2000; KODA et al., 2000).

A microbiota psicrotrófica de importância na indústria de laticínios inclui espécies de bactérias Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* e bactérias Gram-positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp. (COUSIN, 1982; WALKER, 1988; GARCÍA-ARMESTO e SUTHERLAND, 1997; RYSER, 1999). Dentre os microrganismos que sobrevivem à pasteurização, espécies do gênero *Bacillus* são predominantes, especialmente *B.licheniformis* e *B.cereus* (COLLINS, 1981; COUSIN, 1982; MATTA e PUNJ, 1996; MATTA e PUNJ, 1999).

Muitos desses psicrotróficos produzem enzimas termorresistentes que podem reduzir a qualidade e a vida de prateleira do leite termicamente tratado e de produtos lácteos fabricados com leite contaminado (SPECK e ADAMS, 1975; FOX, 1981; COUSIN, 1982; FAIRBAIRN e LAW, 1986); por essa razão, eles são considerados organismos deterioradores significativos.

Espécies do gênero *Bacillus* podem causar problemas sensoriais no leite UHT, interferindo em sua qualidade durante o armazenamento a 22 e a 37°C, principalmente pelo desenvolvimento de rancificação e por secretarem proteases, lipases e fosfolipases extracelulares de termorresistência

comparável à resistência térmica das enzimas produzidas por espécies do gênero *Pseudomonas* (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997).

TERADA et al. (1982), ao avaliarem 154 espécies de microrganismos isolados de amostras de leite cru, quanto à produção de proteases em leite desnatado e em caseína, a 5, 20 e 30°C, constataram atividade proteolítica por espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Alcaligenes*, mesmo a 5°C. Dentre as bactérias psicrótróficas contaminantes, *Pseudomonas* constitui o gênero encontrado com maior frequência no leite e em derivados mantidos sob refrigeração (COUSIN, 1982; ENEROTH et al., 1998; URAZ e ÇITAK, 1998; ENEROTH et al., 2000a,b; WIEDMANN et al., 2000), embora não representem mais do que 10% da microbiota de amostras de leite cru recém-ordenhados (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997). Essa bactéria é conhecida por secretar proteases extracelulares resistentes aos tratamentos de pasteurização e UHT (GRIFFITHS et al., 1981; PATEL et al., 1983).

A contagem de bactérias Gram-negativas em leite estocado sob refrigeração pode atingir valores de 10^3 a 10^6 UFC mL⁻¹, antes do processamento (COUSIN, 1982). ENEROTH et al. (1998) constataram, após quatro dias de estocagem de amostras de leite cru, a 4°C, contagens de 10^6 a 10^7 UFC mL⁻¹, sendo que as bactérias Gram-negativas foram isoladas de todas as amostras nas quais predominaram espécies de *Pseudomonas*.

O gênero *Pseudomonas* inclui espécies que se caracterizam por apresentar um curto tempo de geração, entre 0 e 7°C, e uma temperatura mínima de crescimento baixa, de até -10°C (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997). A contaminação dos produtos lácteos por este microrganismo pode originar-se do suprimento de água de qualidade inadequada, deficiências de procedimentos de higiene na fonte de produção e, ou, na indústria de laticínios (THOMAS et al., 1966; SOLER et al., 1995; JAY, 1996; ENEROTH et al., 2000a, b).

WIEDMANN et al. (2000), ao submeterem isolados de *Pseudomonas* spp. provenientes de leite à caracterização molecular e fenotípica, constataram que, em cinco grupos de *Pseudomonas* spp., aqueles incluídos nos grupos B (*P. fluorescens*) e E (*P. fluorescens* ou possivelmente *P. fragi*) continham alta frequência de isolados com atividades de protease, de lipase e de lecitinase. De acordo com os autores, as estirpes incluídas nestes grupos constituem organismos representantes da microbiota deterioradora, de particular

preocupação para a indústria de laticínios e de alimentos, especialmente *P. fluorescens*. Estes autores constataram ainda que somente dois, de 22 isolados pertencentes aos grupos A e D (*P. putida*), exibiram atividade proteolítica e, ou, lipolítica. Esses resultados estão de acordo com os relatados por Swart et al. (1990), citados por WIEDMANN et al. (2000), que observaram que em 44 dos isolados de *P. putida* provenientes de leite cru, 43 foram negativos para atividade proteolítica e lipolítica.

2.4. Proteólise e lipólise no leite e derivados

A deterioração de amostras de leite cru, mantidas sob refrigeração, ocorre principalmente em função da atividade de proteases e lipases. As enzimas proteolíticas de natureza bacteriana agem, em sua maioria, sobre a κ -caseína, resultando na desestabilização das micelas de caseína e na coagulação do leite, de forma análoga à quimosina (FAIRBAIRN e LAW, 1986; Recio et al., 2000). Esta categoria de enzimas é relacionada a problemas tecnológicos, incluindo a gelificação do leite UHT, a formação de aminoácidos durante a maturação de queijos e o desenvolvimento de sabor amargo em leite e em produtos lácteos. A lipólise resulta da ação de lipases naturais e, ou, microbianas. Estas enzimas têm a propriedade de hidrolisar triglicérides, constituintes da gordura, em ácidos graxos de cadeia curta, incluindo os ácidos butírico, capríco, caprílico e cáprico, principais responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis no leite. As lipases podem ser responsáveis pela rancificação em queijos (CHEN et al., 2003). Mesmo em concentrações baixas, as proteases degradam as proteínas e as lipases degradam os lipídeos, causando defeitos em produtos de vida de prateleira longa, incluindo o leite UHT e o leite em pó, onde as enzimas são preservadas, podendo ser reativadas após a reconstituição (CELESTINO et al., 1997).

A proteólise do leite bovino pode também ser atribuída à atividade de proteases naturais do leite. A ocorrência de proteólise pela atividade de proteases nativas termoestáveis é relacionada principalmente com a atividade de plasmina, uma serina protease e seu precursor inativo, o plasminogênio (HUMBERT et al., 1982; BASTIAN e BROWN, 1996). Segundo descrição de BASTIAN e BROWN (1996), a plasmina em leite desnatado não foi afetada

pelas condições de pasteurização e 30 a 40% de sua atividade foi mantida após processamento UHT. Plasmina e plasminogênio ocorrem, concomitantemente, no leite. A termoestabilidade da plasmina é dependente do pH. Em valores de pH baixos e neutros a enzima é estável à pasteurização, mas em valores de pH elevado ela é rapidamente inativada. De acordo com MUIR (1996), alguma atividade de plasmina pode estar presente após o processamento do leite em temperatura ultra-alta, por exemplo a 140°C por 3 segundos. Plasmina, plasminogênio e ativadores de plasminogênio encontram-se associados às micelas de caseína e às membranas dos glóbulos de gordura e concentrações mais elevadas destas substâncias são encontradas na fração caseínica do leite em relação às concentrações existentes no soro e na gordura (BASTIAN e BROWN, 1996). A plasmina hidrolisa principalmente a β -caseína e α_{S2} -caseína e, em menor extensão, α_{S1} -caseína, enquanto a κ -caseína é resistente à hidrólise por esta enzima (RECIO et al., 2000).

As concentrações de plasmina presentes no leite são muito baixas (14 a 75 $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$). A relação de plasmina para plasminogênio é, na maioria dos casos, de 1:5. Também estão presentes no leite substâncias termolábeis inibidoras de plasmina. Como consequência, o potencial de degradação do sistema plasmina-plasminogênio no leite depende do balanço entre enzima ativa e seus precursores e inibidores (POLITS et al., 1992). Em função da baixa concentração de plasmina no leite, problemas tecnológicos não se manifestam em produtos de vida de prateleira curta; entretanto, em concentrações moderadas, a atividade desta enzima pode ser deletéria para produtos de vida longa de prateleira.

KOHLMANN et al. (1991c) concluíram que a gelificação do leite UHT ocorre mesmo em baixa concentração de plasmina quando constataram a ocorrência de gelificação do produto adicionado de plasmina na concentração de 0,15 mg L^{-1} , com 90 dias de estocagem, à temperatura ambiente. A gelificação foi acompanhada de um aumento da viscosidade e a plasmina agiu, preferencialmente, sobre as α e β -caseínas.

FAJARDDO-LIRA e NIELSEN (1998) verificaram que o sistema plasmina-plasminogênio do leite pode ser afetado pelo rompimento da micela de caseína por atividade de proteases de *Pseudomonas*. Isto resultou na

liberação de plasmina ligada à caseína para o soro, o que pode comprometer de forma negativa o processo de fabricação de queijos, considerando a importância da plasmina no desenvolvimento de características sensoriais no produto, incluindo sabor, odor e textura (FOX, 1989). Portanto, as proteases bacterianas atuam tanto diretamente como indiretamente sobre a qualidade do leite e derivados.

A microbiota psicrotrófica no leite constitui um fator importante para assegurar a qualidade de alguns produtos lácteos. Entretanto, resultados da literatura mostram que a contaminação do leite por bactérias psicrotróficas proteolíticas é freqüente e de difícil controle. ADAMS et al. (1975) observaram a presença de bactérias psicrotróficas produtoras de proteases resistentes ao tratamento térmico de 149°C, por 10 segundos, em 70 a 90% das amostras de leite cru avaliadas. Essas proteases foram ativas na concentração de caseína e no pH característico do leite, a 25 e a 45°C. O aumento da susceptibilidade do leite esterilizado à ação de proteases, durante o período de estocagem, foi também observado. ADAMS et al. (1976) concluíram que um grau de proteólise detectável não requer uma alta população de psicrotróficos ao registrarem um decréscimo de 10 a 20% na concentração de κ -caseína, após dois dias de estocagem a 5°C, na presença de 10^5 UFC mL⁻¹ de *Pseudomonas* spp. GILLIS et al. (1985) constataram diferença significativa no grau de proteólise entre amostras de leite cru com diferentes contagens de microrganismos mesofílicos. Nas amostras com contagem total inferior a 10^4 UFC mL⁻¹, foi verificado um grau de proteólise significativamente menor quando comparado às amostras com contagem padrão entre 10^5 UFC mL⁻¹ e 10^6 UFC mL⁻¹.

Na indústria de queijos, os produtores possuem problemas de perdas de rendimento em decorrência da atividade de proteases bacterianas sobre a caseína. COUSIN (1982) constatou um aumento considerável do nitrogênio total em soros de leites inoculados com bactérias psicrotróficas, sugerindo que a atividade metabólica dessas bactérias pode afetar o rendimento de queijos. Além disso, este autor descreve que o rendimento de queijos ácidos, fabricados com leite inoculado com psicrotróficos, diminuiu com o aumento da concentração inicial de células, resultado este associado à degradação de proteínas e de lipídeos. De acordo com SØRHAUG e STEPANIAK (1997), as

técnicas de manuseio de leite cru podem resultar em altas contagens de psicotróficos antes da fabricação de queijos que, por meio de suas atividades proteolíticas e lipolíticas, produzem substâncias indesejáveis ao produto. Segundo descrição destes autores, a adição de protease de *P. fluorescens*, na concentração de 5 ng mL⁻¹, ao leite usado para fabricação de queijo Quark, reduziu a qualidade do produto quanto ao sabor e aroma, após três semanas de estocagem a 7°C.

As taxas de fermentação das bactérias do ácido láctico, durante a produção de queijos e de iogurte, também podem ser afetadas pelo crescimento de psicotróficos (RICHTER, 1979; FAIRBAIRN e LAW, 1986). Em alguns casos, a ação das proteases produzidas por bactérias psicotróficas resulta em aumento dos teores de peptídeos e de aminoácidos livres que estimulam o crescimento das bactérias do ácido láctico (COUSIN e MARTH, 1977). Por outro lado, a lipólise resultante da ação de lipases, também produzidas por psicotróficos, aumenta a concentração de ácidos graxos livres, que podem inibir as bactérias do ácido láctico (STOFER e HICKS, 1983). Portanto, se amostras de leite cru são submetidas a períodos de estocagem prolongados, sob refrigeração, o controle de psicotróficos na matéria-prima pode ser mais importante do que o realizado após o processamento.

As lipases produzidas por psicotróficos são mais importantes que as proteases no desenvolvimento de defeitos no sabor e aroma em queijos; isto porque as proteases são solúveis em água e são perdidas no soro, enquanto as lipases são adsorvidas pelos glóbulos de gordura, ficando retidas na massa do queijo (FOX, 1989).

2.5. Influência da microbiota psicotrófica sobre a qualidade do leite UHT

O leite fluido disponível no mercado brasileiro inclui o leite pasteurizado, o leite UHT ("ultra-alta temperatura") e o leite aromatizado. O leite UHT é definido como o leite homogeneizado, submetido a 130 a 150°C, por 2 a 4 segundos, mediante processo térmico de fluxo contínuo, resfriado imediatamente a uma temperatura inferior a 32°C e envasado, sob condições assépticas, em embalagens previamente esterilizadas e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997). Desta forma, o produto, do ponto de vista bacteriológico, é

estável à temperatura ambiente por vários meses (TETRA PAK, 1996). Entretanto, durante o aquecimento do leite ocorrem reações químicas dependentes da temperatura de aquecimento. O valor Q_{10} expressa o aumento na velocidade destas reações quando a temperatura é aumentada em 10°C (WALSTRA e JENNES, 1984). De acordo com descrição de SILVA (2003), muitas reações químicas têm o valor de Q_{10} de até três, enquanto a velocidade de desnaturação de uma proteína globular do leite pode aumentar em 100 vezes ou mais. O autor destaca que o estudo do binômio tempo e temperatura é importante para a definição do tratamento térmico, para que este seja suficiente para a inativação dos microrganismos patogênicos e enzimas, além de promover alterações mínimas sobre as características físico-químicas e nutricionais do leite.

O leite UHT foi introduzido no Brasil em 1972 e, entre 1990 e 2002, o consumo deste produto aumentou de 187 milhões para 4,2 bilhões de litros/ano (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA, 2003). Este aumento trouxe como consequência a redução do percentual do mercado de leite pasteurizado comercializado em sacos plásticos, de 75 para 26,1% entre 1995 e 2002 (RIOS, 2003). O processo UHT conquistou o mercado brasileiro de forma rápida durante a década de 90, o que pode ser atribuído ao tipo de embalagem, que é percebida pelo consumidor como de qualidade superior em relação às embalagens plásticas usadas no envase de leite pasteurizado. Além disso, o produto garante uma vida útil de vários meses, não requerendo refrigeração durante o transporte, distribuição, no ponto de venda ou em domicílio; resultando em uma considerável economia de energia. Sendo a refrigeração desnecessária, o leite UHT torna-se mais apropriado para o abastecimento das regiões do país onde a distribuição e a refrigeração são deficientes.

Os programas para assegurar a qualidade de produtos UHT diferem, consideravelmente, daqueles para produtos pasteurizados, pois a maioria dos defeitos que limitam a aceitabilidade de produtos UHT, após longo tempo de estocagem, resultam de alterações físicas, químicas e enzimáticas (DUNKLEY e STEVENSON, 1987; DATTA e DEETH, 2001). A gelificação do leite UHT durante a estocagem constitui o fator mais limitante de sua vida de prateleira. Os fatores de produção do leite que influenciam sobre a qualidade do leite cru e possuem efeito sobre a gelificação do leite UHT incluem a idade do animal, o

estágio de lactação, mastite, qualidade microbiológica da matéria-prima, temperatura de estocagem, uso de aditivos e conteúdo de gordura. A gelificação é caracterizada pela formação de um gel durante o período de estocagem do produto, constituído por uma matriz protéica tridimensional iniciada por interações entre a proteína do soro β -lactoglobulina e a κ -caseína da micela de caseína, durante o tratamento térmico a temperaturas elevadas. Estas interações resultam na formação de um complexo entre a β -lactoglobulina e a κ -caseína (ENRIGHT et al., 1999). O mecanismo aceitável para explicar a gelificação é baseado em um processo constituído de duas etapas. Na primeira etapa, o complexo β - κ dissocia-se da micela de caseína devido à degradação de múltiplos sítios âncoras sobre a κ -caseína e na segunda etapa, esses complexos se agregam dentro de uma matriz tridimensional. Um gel, na forma de um creme, é formado quando uma concentração crítica do complexo β - κ é alcançada. Os fatores significativos que influenciam o início da gelificação incluem: o tipo e, ou, severidade do tratamento, a proteólise durante a estocagem, o estágio de lactação, a contagem de células somáticas, a qualidade microbiológica do leite cru, a sazonalidade, a temperatura de estocagem, o uso de aditivos e o conteúdo de gordura (AULDIST et al., 1996; DATTA e DEETH, 2001).

O crescimento de bactérias psicrotróficas no leite cru predispõe as proteínas a efeitos deletérios quando o leite é submetido a tratamentos térmicos em temperaturas ultra-elevadas. GILLIS et al. (1985) constataram a atividade de enzimas termorresistentes de bactérias psicrotróficas que reduziram a qualidade e a vida útil do leite UHT. Estes autores também observaram que a qualidade microbiológica de amostras de leite cru influenciou no grau de proteólise do produto acabado, sendo que maiores valores foram observados quando a matéria-prima apresentava contagens entre 10^5 e 10^6 UFC mL⁻¹. Após o tratamento UHT, ocorreu um decréscimo da atividade proteolítica.

2.6. Resistência térmica de enzimas bacterianas à esterilização comercial

O controle da atividade enzimática de bactérias psicrotróficas no leite cru pode ser importante, especialmente em produtos esterilizados de vida de prateleira longa. As proteases termorresistentes produzidas por bactérias

psicrotróficas do gênero *Pseudomonas* são metaloproteases alcalinas que requerem os cátions divalentes Ca^{+2} e Zn^{+2} para sua estabilidade e atividade e são ativas sobre a caseína, especialmente sobre a κ -caseína (FAIRBAIRN e LAW, 1986; KOHLMANN et al., 1991a; RAO et al., 1998).

As proteases, lipases e fosfolipases produzidas por bactérias psicrotróficas, principalmente por *Pseudomonas*, são estáveis a altas temperaturas e resistem à pasteurização e ao tratamento UHT, mas não são ativas acima de 50 a 60°C. Essas enzimas exibem temperatura ótima na faixa de 30 a 45°C, possuem uma baixa energia de ativação e, portanto, são mais ativas entre 4 e 7°C do que as enzimas de microrganismos mesofílicos (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997).

De acordo com Mitchell et al. (1986), a termorresistência não pode ser relacionada somente com as semelhanças na sequência de aminoácidos da proteína, mas também com a força de estabilização das interações entre o Ca^{2+} e a proteína, que confere proteção parcial contra a desnaturação da enzima. A função do Ca^{2+} presente nas proteases bacterianas parece ser a de estabilizar a conformação nativa da molécula que pode ser afetada pela adição de EDTA ou tratamento em resina trocadora de cátion. Os íons Ca^{2+} e Zn^{2+} são requeridos para a atividade ótima da protease de *Pseudomonas* MC60 a 45°C, mas somente o Ca^{2+} restaurou o efeito de inativação a altas temperaturas (JENSEN et al., 1980; GOBBETTI e CORSETTI, 1995). Os fatores que estabilizam as enzimas termorresistentes de bactérias psicrotróficas, descritos por SØRHAUG e STEPANIAK (1997), incluem pontes salinas, pontes de hidrogênio, sítios de ligações Ca^{2+} e a presença de um centro hidrofóbico expandido.

A inativação de 90% da atividade de proteases extracelulares produzidas por *Pseudomonas* pode ser alcançada a 72°C, por 4 a 5 horas ou a 120°C por 7 minutos (ADAMS et al., 1975); entretanto estes tratamentos são considerados altamente prejudiciais às características do leite.

Bactérias psicrotróficas isoladas de produtos de laticínios produziram proteases e lipases resistentes aos tratamentos térmicos de 77°C, por 17 segundos, e de 140°C por 5 segundos (GRIFFITHS et al., 1981).

MITCHELL e EWINGS (1985) constataram o desenvolvimento gradual de sabores indesejáveis quando proteases purificadas de estirpes de *P. fluorescens* foram adicionadas ao leite UHT. O sabor amargo e problemas

de textura em queijos, causados por atividade de proteases de psicrotróficos, ocorrem quando a contagem de psicrotróficos no leite é de 10^6 a 10^8 UFC mL⁻¹.

2.7. Adesão e formação de biofilmes por bactérias psicrotróficas

Na indústria de laticínios, os procedimentos inadequados de higiene, limpeza e de sanificação dos equipamentos e a microbiota contaminante do ambiente de processamento são considerados as principais causas de contaminação dos produtos por microrganismos deterioradores e patogênicos (SOLER et al., 1995). A presença de microrganismos acumulados na forma de biofilmes em superfícies de contato com os alimentos pode levar a contaminações antes e após o processamento, causando deteriorações ou enfermidades de origem alimentar (ZOTTOLA, 1994; AUSTIN e BERGERON, 1995; ZOTTOLA, 1997). As células em biofilmes são, no mínimo, 500 vezes mais resistentes a agentes antibacterianos (LE MAGREX et al., 1994; COSTERTON et al., 1995). Portanto, o estudo da adesão e formação de biofilmes por bactérias psicrotróficas proteolíticas nas superfícies dos equipamentos e nos utensílios usados na fonte de produção, no transporte e no processamento de leite cru granelizado refrigerado é relevante e permite a confirmação de focos de contaminações pela identificação dos microrganismos envolvidos e pela estimativa da extensão da contaminação.

A adesão de bactérias patogênicas e deterioradoras, incluindo as bactérias psicrotróficas produtoras de enzimas termorresistentes, em superfícies sólidas, e a conseqüente formação de biofilmes constituem uma das preocupações atuais da indústria de laticínios. Microrganismos relacionados a processos de adesão e formação de biofilmes podem, eventualmente, causar problemas de saúde pública e de ordem econômica. Dentre as espécies deterioradoras formadoras de biofilmes estão incluídos os gêneros *Pseudomonas*, *Micrococcus* (CRIADO et al., 1994; HOOD e ZOTTOLA, 1995; SAUER et al., 2002; SHIRTLIFF et al., 2002) e *Enterococcus faecium* (ANDRADE et al., 1996; ANDRADE et al., 1998). Espécies de bactérias patogênicas incluem *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* O:157:H7 e *Staphylococcus aureus* (HOOD e ZOTTOLA, 1995; SHIRTLIFF et al., 2002).

A adesão microbiana e a formação de biofilmes em superfícies de produção, processamento e conservação de alimentos ocorrem em decorrência da deposição de nutrientes nas superfícies dos utensílios e nos equipamentos, quando do emprego de procedimentos de limpeza, de sanificação e de monitoramento inadequados (ZOTTOLA, 1994; MURPHY et al., 1998).

Portanto, os procedimentos de higienização empregados na cadeia produtiva do leite, incluindo as etapas de produção, estocagem na fonte de produção, transporte e armazenamento nos silos industriais constituem pontos críticos para a obtenção de uma matéria-prima de qualidade, que satisfaça as exigências da legislação e que não comprometa a qualidade dos produtos lácteos.

O estudo das interações entre bactérias e as superfícies em ambientes específicos de produção e processamento de alimentos constitui a medida mais efetiva para prevenir a formação de biofilmes e para a sua remoção (WONG, 1998). De acordo com MITTELMAN (1998), a prevenção do desenvolvimento de biofilmes constitui a chave para o seu controle e a combinação de adequadas técnicas de limpeza, o emprego de tratamentos com associação de agentes oxidantes e compostos tenso-ativos e o monitoramento freqüente das superfícies são importantes para um programa efetivo de manutenção.

Segundo HOOD e ZOTTOLA (1995), vários fatores contribuem para a adesão de uma bactéria à determinada superfície e dependem não só da fisiologia do microrganismo, mas também da natureza do substrato. Estes autores observaram que o número de células aderentes de *S. typhimurium*, *E. coli* O:157:H7, *P. fragi* e *P. fluorescens* aumentou com o tempo em superfície de aço inoxidável, porém o meio de cultura em que os autores observaram maior aderência foi diferente para cada microrganismo.

Em resultados constatados por SUÁREZ et al. (1992), ao avaliarem a capacidade de adesão de bactérias psicrótróficas isoladas de leite cru a diferentes tipos de materiais usados para a construção de equipamentos de laticínios, incluindo o aço inoxidável, a borracha e o vidro, foi observado um maior grau de aderência pelas bactérias Gram-negativas em relação às bactérias Gram-positivas. MURPHY et al. (1998) também constataram a predominância de bactérias Gram-negativas na maioria das amostras analisadas, ao

monitorarem superfícies de contato de equipamentos em indústrias de laticínios.

Além das células vegetativas, os esporos bacterianos também são envolvidos em processos de adesão. MARTINS (2001) constatou que esporos de isolados de leite UHT foram capazes de aderir à superfície de aço inoxidável, sendo que a adesão aumentou com o tempo. No entanto, este autor observou que a eficiência do ácido peracético aumentou com o número de esporos aderidos, sugerindo que a presença de fissuras e ranhuras na microtopografia da superfície do aço inoxidável poderia proteger os esporos, quando aderidos em números baixos. Dentre os microrganismos contaminantes do leite, o *Bacillus sporothermodurans* possui a característica de resistir ao tratamento térmico durante a produção de leite pelo sistema UHT. Uma concentração deste microrganismo, superior a 10^2 UFC mL⁻¹, faz com que o produto fique em desacordo com os padrões vigentes (BRASIL, 1997).

Uma das características que devem ser consideradas quando as células bacterianas encontram-se aderidas a superfícies é a sua maior resistência à ação de sanificantes. Nesta condição, substâncias poliméricas extracelulares representam uma barreira de proteção que compromete a atividade de compostos sanificantes oxidantes e não-oxidantes (LE MAGREX et al., 1994; MITTELMAN, 1998). Além disso, de acordo com os dados de ANDRADE et al. (1998), a resistência das bactérias em biofilmes pode variar em função do tipo de microrganismo. Estes autores observaram uma maior resistência de esporos de *B. sporothermodurans*, aderidos à superfície de aço inoxidável, em relação às células de *Enterococcus faecium* aderidas, nas mesmas condições, à ação de solução de ácido peracético, na concentração de 60 mg L⁻¹, por 2 minutos, constatando que o valor D para esporos de *B. sporothermodurans* é de 2,3 minutos e para *E. faecium*, de 7 segundos.

2.8. Métodos de controle da microbiota que afeta a qualidade do leite UHT

A qualidade do leite UHT é influenciada pela qualidade bacteriológica da matéria-prima na fonte de produção, pela contaminação dos tanques de refrigeração, pelo aumento da temperatura durante o transporte, pelo tempo de transporte, pela contaminação na indústria e pelo tratamento do leite após o

processamento. Todos estes fatores estão inter-relacionados, sendo de máxima importância utilizar como matéria-prima um leite de alta qualidade bacteriológica (GUINOT-THOMAS et al., 1995; ENEROTH et al., 1998; ENEROTH et al., 2000a).

Técnicas comuns para eliminar menor ou maior parte da microbiota do leite incluem a termização (60 a 66°C, 5 a 20 segundos), a pasteurização (72°C, 15 segundos), a microfiltração, a centrifugação e também o tratamento UHT. A microfiltração e a centrifugação, em grau variável, também removem esporos bacterianos (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997).

O controle da contaminação e crescimento de psicrotróficos no leite cru pode ser conseguido por meio da aplicação de procedimentos, incluindo a sanitização (CHAMPAGNE et al., 1994), a refrigeração (GRIFFITHS et al., 1987), a injeção de CO₂ (CHAMPAGNE et al., 1994), a termização (GRIFFITHS et al., 1981), a adição de peróxido de hidrogênio (CHAMPAGNE et al., 1994), o uso de sorbato (GILLILAND e EWELL, 1983) e a inoculação de bactérias do ácido láctico (JUFFS e BABEL, 1975; GILLILAND e EWELL, 1983; GUINOT-THOMAS et al., 1995).

Não existe, no Brasil, uma regulamentação específica sobre a qualidade microbiológica do leite cru destinado à fabricação de leite UHT e de outros produtos lácteos. O método padrão para controle do grau de contaminação de psicrotróficos em leite preconiza condições de incubação por 10 dias, a 7°C (FRANK et al., 1992), o que inviabiliza o direcionamento do leite, em tempo hábil, ao processamento do produto mais adequado. Com base nos dados da literatura, é imprudente a fabricação de produtos a partir do leite em que a contagem de psicrotróficos tenha excedido a $5,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, considerando a possibilidade de produção de enzimas extracelulares e termorresistentes.

O controle prático da qualidade da matéria-prima para a produção do leite UHT é limitado ao uso da termização ou resfriamento. Quando a qualidade do leite cru é satisfatória ou o período de estocagem é superior a 48 horas, a termização, aliada ao resfriamento e à estocagem do leite a 4°C, é a opção preferida (MUIR, 1996). Além destes procedimentos, a manipulação das condições de processamento e estocagem, concomitante ou não com o uso de aditivos, também pode controlar ou minimizar a atividade proteolítica, seja ela de origem bacteriana ou de plasmina; pode impedir a dissociação do complexo

β - κ da micela de caseína; e, finalmente, pode inibir interações que, subsequentemente, facultam a formação da rede de proteínas responsável pela gelificação do leite UHT.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa-MG. As amostras de leite cru refrigerado granelizado e de leite UHT integral, processado pelo sistema indireto, foram coletadas em uma Indústria de Laticínios localizada na Zona da Mata Mineira, receptora e processadora de, aproximadamente, 200.000 litros de leite por dia. Esta empresa conta com uma rede de fornecedores de matéria-prima composta de 230 tanques individuais e 90 tanques coletivos, com capacidade variando de 250 a 3.000 litros/tanque, atendendo a, aproximadamente, 1.000 cooperados. Um percentual aproximado de 98% do leite é recebido pela empresa de forma granelizada.

3.1. Amostragem

O número de amostras coletadas foi determinado com base na Norma ABNT NBR 5429 (1985), que estabelece um mínimo de 18 amostras para os 230 tanques individuais e nove amostras para os 90 tanques coletivos. Porém, foi coletado um total de 33 amostras em tanques individuais e 12 amostras em tanques coletivos. Para a coleta, manuseio e manutenção das amostras, seguiu-se o procedimento da Federação Internacional de Laticínios (IDF, 1985).

Amostras de 200 mL de leite cru refrigerado, estocado por, aproximadamente, 48 horas em tanques de refrigeração individuais e coletivos, foram coletadas em frascos de vidro esterilizados, aleatoriamente, em diferentes propriedades rurais durante a estação da seca (maio a agosto de 2002). A temperatura do leite foi medida no momento da coleta. A procedência da água usada nos procedimentos de higienização e o seu tratamento foram investigados. Após a coleta, as amostras foram imediatamente colocadas em banho de gelo, com temperatura inferior a 4°C, e transportadas ao Laboratório de Microbiologia da UFV para a realização da prova de lactofermentação e determinação da contaminação por bactérias mesofílicas, mesofílicas-proteolíticas, psicrotróficas, psicrotróficas-proteolíticas e contagem de *Pseudomonas* spp.

Na estação chuvosa (janeiro a fevereiro de 2003), foram realizadas três repetições, coletando-se, em semanas e horários diferentes, amostras do leite cru refrigerado no silo industrial, do leite pasteurizado nos tanques de estocagem e do leite UHT após o envase. As amostras de leite cru foram avaliadas quanto aos mesmos critérios microbiológicos adotados na análise do leite coletado em tanques de refrigeração individuais e coletivos, além da determinação da atividade proteolítica, segundo LINDEN et al. (1982). Após a pasteurização do leite, também foram coletadas amostras representativas nos tanques de alimentação do sistema UHT, para a determinação da atividade proteolítica. Posteriormente, foi coletada, de forma seqüencial, uma caixa de leite UHT, contendo 12 unidades de 1 litro. O produto foi armazenado a 37°C, por 120 dias, período este correspondente ao seu prazo de validade. Em intervalos de 24 dias, as amostras de leite UHT foram avaliadas quanto ao grau de proteólise, atividade proteolítica e taxa de sedimentação, resistência à cocção e observações quanto a indícios de gelificação. A contagem de bactérias mesofílicas e mesofílicas esporuladas foi realizada nas amostras de leite UHT no início e no final do período de estocagem, após o aquecimento das amostras a 80°C, por 10 minutos. O plaqueamento das amostras, aquecidas e não-aquecidas, foi feito em ágar padrão para contagem em placas, com incubação a 35°C, por 48 horas.

3.2. Microbiota bacteriana característica de leite cru refrigerado granelizado

3.2.1. Lactofermentação

As amostras de leite cru refrigeradas foram submetidas à prova de lactofermentação, com o objetivo de verificar o tipo de microbiota mesofílica predominante no leite, com base no aspecto, odor e tipo de coágulo formado, após incubação a 37°C, por 24 a 48 horas (BRAMLEY e McKINNON, 1990).

3.2.2. Contagens de bactérias mesofílicas

Diluições decimais das amostras do leite cru foram realizadas e plaqueadas em Ágar Caseinato para Métodos Padronizados – SMCA, para contagem de bactérias mesofílicas e mesofílicas-proteolíticas viáveis, após a incubação, a 35°C, por 48 horas (FRANK et al., 1992).

3.2.3. Contagem de bactérias psicotróficas - isolamento e identificação de bactérias psicotróficas proteolíticas

Diluições decimais das amostras do leite cru foram plaqueadas em SMCA para contagem de bactérias psicotróficas e psicotróficas-proteolíticas viáveis, com incubação a $6,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por 10 dias. A contagem de *Pseudomonas* spp. foi realizada após 72 horas de incubação, a 22°C, em agar base para *Pseudomonas* CM559 (Oxoid), adicionado de cetrimida ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$), fucidina ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$) e cefalosporina ($50,0 \text{ mg L}^{-1}$) (suplemento seletivo SR 103E, Oxoid®).

Foram selecionadas de três a quatro colônias de isolados com halos de clarificação e, ou, de precipitação da caseína no meio de cultura SMCA das maiores diluições. Os isolados foram conservados congelados a -80°C , em caldo tripticaseína e soja – TSB, adicionado de 20% de glicerol. Quando necessário, a ativação dos isolados foi feita em caldo TSB, com incubação a 25°C, por 48 horas.

Inicialmente, os isolados foram caracterizados quanto à morfologia, atividades de oxidase e catalase e reação de Gram. O metabolismo fermentativo da glicose foi pesquisado nos isolados Gram-negativos em meio Rugai

modificado por Pessoa e Silva (MBiolog Diagnósticos Ltda.). Os isolados que se apresentaram como Gram-negativos não-fermentadores de glicose foram avaliados quanto à produção de pigmentos fluorescentes, após o crescimento em SMCA, com o auxílio de uma lâmpada ultra-violeta Spectroline, Modelo CA-160, com irradiação em comprimento de onda de 365 nm. Estes isolados foram identificados empregando-se os sistemas API 20 E ou API 20 NE (API, LA Balme Lês Grottes e Dickinson) e Bac Tray (Difco®). Para a identificação dos isolados Gram-positivos e a confirmação de identificação de alguns Gram-negativos, foi empregado o Microbial Identification System – MIS, versão 4.0.

3.3. Análises estatísticas

Os dados referentes às contagens microbianas nas amostras dos diferentes grupos de microrganismos foram analisados comparando-se as médias entre tanques individuais, coletivos e no silo industrial, por meio da análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade. Além disso, foi realizada uma análise descritiva do percentual de amostras coletadas em tanques individuais, coletivos e no silo industrial quanto ao grau de contaminação pelos grupos de microrganismos avaliados, agrupando-as em diferentes faixas de contagens.

A análise das variáveis da massa de sedimentos, do grau de proteólise e da atividade proteolítica, em função do tempo estocagem, a 37°C, por 120 dias, foi realizada por meio da análise de Regressão Linear Simples.

Empregou-se, para as análises estatísticas, o Sistema de Análise Estatística - SAS (1996).

3.4. Caracterização de bactérias psicrotróficas proteolíticas

3.4.1. Atividade de protease, lipase e lecitinase de bactérias psicrotróficas proteolíticas

Os isolados psicrotróficos proteolíticos foram avaliados quanto à capacidade de produzirem também lipases e lecitinases, enzimas hidrolíticas importantes na deterioração do leite e derivados. A atividade proteolítica foi avaliada em ágar SMCA (FRANK et al., 1992), enquanto, para verificação da presença

das atividades de lipases e de lecitinases, foram usados ágar Tributirina e ágar Tripicaseína e Soja - TSA, suplementados com 5% de suspensão de gema de ovo, respectivamente (VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1992). Os isolados foram inoculados na superfície dos respectivos meios com o auxílio de uma agulha de platina e incubados na temperatura de 6,5°C, por 10 dias, e nas temperaturas de 21 e 35°C, por 72 horas. Após o período de incubação, verificou-se a presença de halo de clarificação e, ou, precipitação da caseína para proteólise, clarificação para lipólise e clarificação ou precipitação da lecitina para lecitinase, nos respectivos meios.

3.4.2. Termoestabilidade de enzimas proteolíticas em sobrenadantes de culturas de bactérias psicrotróficas proteolíticas

A atividade proteolítica em sobrenadantes de isolados psicrotróficos proteolíticos foi realizada conforme técnica descrita por Ewings et al. (1984), com modificações. As culturas puras foram cultivadas em 4 mL de Caldo Infusão de Cérebro e Coração - BHI, a 22°C, por 48 horas. Posteriormente, foram reinoculadas em caldo BHI, na proporção de 0,25%, e incubadas por 48 horas. Após este período de incubação, foram centrifugadas a 3.000 g, por 20 minutos. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi adicionada a tubos de aço inoxidável (7,4 x 127 mm), com paredes de espessura de 0,25 mm, climatizados em banho de óleo a 100°C. A amostra foi tratada por 30 segundos e, após este tempo, foi imediatamente resfriada em banho de água gelada por um minuto. Amostras submetidas a este tratamento térmico e amostras controle (não submetidas ao tratamento térmico) foram avaliadas quanto à atividade de proteases, misturando-se: 1 mL de solução de azocaseína (Sigma, Chemical Co-St Louis, MO, USA) 0,5% (p/v), dissolvida, por aquecimento, em tampão Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,5 e filtrada em papel de filtro Whatman n.1; 1 mL de Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹, pH 7,5 e 0,2 mL de amostra. Após incubação a 37°C, por duas horas em banho-maria, com circulação (Thermomix BM 18 BU de Braun Biotech Internacional), adicionou-se à mistura de reação igual volume de ácido tricloroacético - TCA a 10% (p/v), seguindo-se de transferência dos tubos para banho de gelo, por 15 minutos. Para os controles de cada reação, o TCA foi adicionado antes da adição da amostra. As amostras foram clarificadas

por centrifugação a 5.000 g, por 10 minutos, e a absorvância do sobrenadante foi medida a 366 nm, em espectrofotômetro Micronal, modelo B 582. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir um aumento na absorvância em $0,01 \text{ h}^{-1}$. A termoes- tabilidade foi definida como a capacidade do sobrenadante em reter pelo menos 50% da atividade em relação às amostras não submetidas ao trata- mento térmico (EWINGS et al., 1984).

3.4.3. Crescimento de isolados psicrotróficos proteolíticos em tempe- raturas de refrigeração, determinação do grau de proteólise e estabilidade térmica do leite

Dentre os isolados das amostras de leite refrigerado granelizado, foram selecionados aqueles codificados como 07A e 041, procedentes de diferentes amostras de leite cru refrigeradas. Estes isolados foram caracterizados quanto ao crescimento e à atividade proteolítica em diferentes temperaturas de refrigeração (HULL, 1947).

Os experimentos de crescimento foram conduzidos em alíquotas de 6 mL de leite desnatado reconstituído - LDR 12%, esterilizadas a 121°C , por 15 minutos, e inoculadas em duplicata com, aproximadamente, 10^4 UFC mL^{-1} de cada isolado. Preliminarmente, os isolados haviam sido ativados, por duas vezes consecutivas, em LDR 12%, a 25°C , por 24 horas. As amostras, incubadas estaticamente a 4, 7 e 10°C , em estufas do tipo B.O.D, modelo 347 CD (FANEM), foram analisadas em intervalos de 24 horas. As amostras incubadas a 2°C foram avaliadas a cada 48 horas. Diluições apropriadas foram plaqueadas em ágar nutriente, pela técnica de microgotas. O experimento foi conduzido em três repetições. O tempo de geração (g) e a velocidade específica máxima de crescimento (μ) foram determinados para cada um dos isolados nas diferentes temperaturas avaliadas (BROCK et al., 1994). As amostras de leite foram também submetidas ao teste de estabilidade térmica, a 72°C , por 15 segundos, em banho-maria, com circulação (Thermomix BM 18 BU de Braun Biotech Internacional), quando se observou a formação de coágulos.

3.4.4. Efeito do crescimento de isolados psicrotróficos proteolíticos sobre as proteínas do leite

Os efeitos do crescimento dos isolados 07A e 041, sobre as proteínas do leite, foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE, com modificações do método de LAEMMLI (1970), em Sistema Mini-Protean® II, Bio-Rad, com fonte Power Pac 300 - Bio-Rad.

Volumes de 100 mL de leite cru, ordenhado em condições assépticas, foram inoculados com, aproximadamente, 10^6 UFC mL⁻¹ dos isolados 07A ou 041. As amostras foram incubadas, estaticamente, em estufas do tipo B.O.D., a 2, 4, 7 e 10°C, e analisadas imediatamente, após a inoculação, e com 1, 2, 4 e 6 dias de estocagem, para observação do efeito do crescimento dos isolados sobre as frações caseínicas.

As amostras para análise das proteínas do leite foram preparadas conforme descrito por ADAMS et al. (1976). Alíquotas de 10 mL do leite refrigerado foram acidificadas para pH 4,0 com ácido clorídrico 10 mol L⁻¹, sob agitação constante. Posteriormente, foram centrifugadas a 12.100 g, por 10 minutos em centrífuga Sorval, modelo RC 5C. O soro foi eliminado e a caseína precipitada e o volume original foi reconstituído, corrigindo-se o pH para 6,9.

Foram usados géis de poliacrilamida contendo SDS de acordo com sistema descontínuo utilizando-se, para a separação das proteínas, um gel de acrilamida a 15% e o gel de empilhamento a 4,5%. As concentrações finais de tampão Tris-HCl e de SDS no gel de separação e de empilhamento foram aquelas recomendadas por Laemmli (1970). Os géis foram polimerizados quimicamente, pela adição de 0,025% (v/v) de tetrametileno diamina (TEMED) e 0,05% (p/v) de persulfato de amônio. O tampão de corrida, pH 8,6, continha Tris-base, glicina e SDS. As amostras foram ajustadas para a concentração de, aproximadamente, 10 mg mL⁻¹ de proteína (LAEMMLI, 1970; McPHERSON e KITCHEN, 1981). Alíquotas de 2 µL das amostras, correspondentes a, aproximadamente, 20 µg de proteína, foram adicionadas de 25 µL de solução tampão de amostra e submetidas a tratamento térmico por imersão em banho de água fervente, por três minutos e, posteriormente, analisadas. A eletroforese foi conduzida a 60 V por 20 minutos, para empilhamento e 80 V, por duas horas, para separação das frações protéicas. Os géis foram corados, por duas horas,

à temperatura ambiente, em solução de azul brilhante de Coomassie R a 0,2% em metanol: ácido acético: água (1:2:17 v/v). Posteriormente, eles foram revelados e transparentizados em solução de ácido acético.

A identificação das diferentes formas de caseína foi feita por análise de amostras individuais de padrões de α , β e κ -caseínas purificadas de leite bovino (Sigma, Chemical Co, St Louis, MO, USA) e marcadores de massa molecular de faixa baixa e média (Promega®). Os padrões de caseína foram preparados pela dissolução de 1 mg de padrão em 1 mL de tampão de amostra. A seguir, foram aquecidos em banho-maria fervente, por três minutos. Os padrões de caseína continham α_s caseína, aproximadamente 85%; mínimo de 70% de proteínas; β -caseína, mínimo de 90%; livre de sais e κ -caseína, mínimo de 80%.

Os efeitos das atividades proteolíticas dos isolados 07A e 041 foram também avaliados por análise densitométrica qualitativa dos géis, no Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia Vegetal da Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa do Gado de Leite. Paralelamente, foi realizada a técnica descrita com amostra controle, não-inoculada, nas mesmas condições descritas para as amostras de leite cru que receberam os inóculos. Os densitogramas resultantes foram então comparados.

3.4.5. Adesão de bactérias psicrotróficas proteolíticas em superfície de aço inoxidável

Selecionou-se isolados psicrotróficos proteolíticos Gram-negativos e Gram-positivos para a avaliação quanto à sua capacidade de adesão à superfície de aço inoxidável, quando cultivados em leite a $6,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Para isso, cupons de prova de aço inoxidável AISI 304, de dimensão 10 mm x 10 mm x 1 mm, foram previamente limpos, por escovação, usando-se água e detergente líquido, enxaguados com água destilada e imersos em acetona por 30 minutos, para remoção da gordura. Em seguida, foram imersos em NaOH a 1%, por 1 hora. Após nova rinsagem, os cupons foram secos ao ar, enrolados em papel e esterilizados em autoclave, a 121°C , durante 15 minutos (JEONG e FRANK, 1994).

As bactérias avaliadas quanto à capacidade de adesão em aço inoxidável foram ativadas, por duas vezes consecutivas, em intervalos de 24 horas, em LDR 12%, a 25°C. Os cupons de teste foram imersos, separadamente, em tubos de ensaio contendo 5 mL de LDR 12% esterilizado, inoculado com, aproximadamente, 10^3 a 10^4 UFC mL⁻¹ da suspensão do microrganismo teste. A incubação foi feita em estufa do tipo B.O.D, modelo 347 CD, FANEM. O número de células aderidas por cm² foi determinado após 48 horas de contato com a superfície. Para o controle de adesão inicial, os cupons foram colocados em contato com o leite inoculado e imediatamente retirados para análise.

A adesão bacteriana foi avaliada pela técnica de microscopia de epifluorescência. Em condições assépticas, os cupons foram removidos do leite com o auxílio de pinça esterilizada e, em seguida, foram rinsados com 10 mL de solução de tampão fosfato, esterilizada (KH₂PO₄, pH 7,2), por 1 minuto, para remoção das bactérias não aderidas. Os cupons foram depositados em lâmina de vidro para microscopia, colocados em uma placa de Petri e inundados com solução de *Kirkpatrick*, contendo álcool isopropílico, clorofórmio e formaldeído na proporção de 6:3:1, durante 3 minutos, para fixação das bactérias aderidas, conforme descrito por PARIZZI (1999). Posteriormente, os cupons foram corados com uma solução aquosa do corante alaranjado de acridina 0,04%, por 5 minutos. Os cupons foram observados em microscópio ótico LEICA DMLS, em objetiva de imersão adaptada à microscopia de epifluorescência. Foram contadas as bactérias que emitiam fluorescência vermelho-alaranjada. O número de campos contados foi determinado com base no número de células ou agrupamento de células por campo. A média de células ou agrupamento de células foi calculada e multiplicada pelo fator microscópico, obtendo-se, assim, o número de células ou agrupamento de células por cm² (SPLITTSOESSER, 1992).

3.5. Fatores de estabilidade de leite UHT

3.5.1. Determinação da massa de sedimentos

A formação de sedimentos do leite UHT foi determinada pela técnica descrita por NEIRA (1986). A embalagem Tetra Brick Aseptic foi aberta cortando-se, com auxílio de tesoura, a parte superior e retirando-se o leite cuidadosamente, por escoamento. A embalagem foi cortada de forma a obter

uma altura final de, aproximadamente, 4 cm a partir da base. Em seguida, a embalagem foi invertida e mantida emborcada por 10 minutos. Posteriormente, ela foi cortada pelas arestas e aberta completamente para facilitar a secagem de algum sedimento retido. A secagem da embalagem foi feita à temperatura controlada de 37°C, por 48 horas. Após este período, ela foi pesada em balança analítica Explorer Ohaus Corporation e, posteriormente, lavada, empregando-se pequeno volume de água, com auxílio de uma piseta. Após a secagem, a embalagem foi pesada e o seu valor anotado. A massa de sedimentos foi obtida pela diferença entre as duas pesagens e o resultado foi expresso em g L⁻¹.

3.5.2. Grau de proteólise

O grau de proteólise foi determinado pelo método de Hull (1947). Uma alíquota de 10 mL de ácido tricloroacético 0,72 mol L⁻¹ foi adicionada a 5 mL da amostra de leite. Após agitação e repouso de 10 minutos, a mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman n.42. Posteriormente, foi adicionado, a 5 mL do filtrado, 10 mL de solução de carbonato de sódio e tetrafosfato de sódio, a 40°C. Após 10 minutos, foram adicionados 3 mL de reagente fenólico, sob agitação. A leitura foi feita após cinco minutos, em espectrofotômetro Spec 20-D, a 650 nm. Os valores de absorvância obtidos foram convertidos em seu equivalente de tirosina, empregando-se uma curva padrão, previamente preparada, com soluções de concentrações conhecidas. Os resultados foram expressos em miligramas de tirosina por 5 mL de leite.

3.5.3. Atividade proteolítica

Amostras do leite cru, do leite pasteurizado e do leite UHT foram avaliadas quanto à atividade proteolítica, segundo LINDEN et al. (1982). O método baseia-se na hidrólise de um substrato de síntese da série 4-nitroanilidas, L-leucil 4-nitroanilida (Sigma®). A medida foi feita em espectrofotômetro Spec 20-D. Os valores de absorvância obtidos foram convertidos em seu equivalente em micromoles de 4-nitroanilina L⁻¹, formados após 18 horas de incubação, a 37°C, empregando-se curva padrão de concentrações conhecidas de 4-nitroanilina previamente preparadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Microbiota bacteriana característica de amostras de leite cru refrigerado granelizado

4.1.1. Lactofermentação

A maior variação nos tipos de coágulos formados na prova de lactofermentação foi observada nas amostras coletadas em tanques individuais de refrigeração de leite e a menor variação ocorreu nas amostras coletadas no silo industrial (Quadro 1). As amostras provenientes de tanques individuais apresentaram coágulos dos tipos: digerido (26,5%), floculoso (17,6%) e caseoso e sulcado (20,6%) (Quadro 1), o que indica a predominância da microbiota proteolítica. Coágulos homogêneos ou gelatinosos, observados em 32,3% das amostras coletadas em tanques individuais (Quadro 1), indicam a predominância de bactérias lácticas, que correspondem aos tipos de coágulos desejáveis à indústria de laticínios, por indicar a boa qualidade bacteriológica de amostras de leite cru. A ausência de coágulo, constatada em uma amostra coletada em tanque individual (Quadro 1), pode estar relacionada com a presença de resíduos de substâncias antimicrobianas. Nas amostras coletadas em tanques coletivos, 50% apresentaram coágulo homogêneo ou gelatinoso e 50% apresentaram coágulos dos tipos digerido, caseoso e floculoso, típicos de microbiota proteolítica (Quadro 1). Em nenhuma das amostras de tanques coletivos foi observada ausência de coágulo. Nas amostras coletadas no silo

industrial, constatou-se uma redução no poder discriminatório da prova de lactofermentação (Quadro 1).

Em amostras de leite cru não-refrigeradas, coletadas na bacia leiteira de Viçosa, MG, FROEDER (1985) também constatou uma incidência elevada de amostras com coágulo caseoso na prova de lactofermentação, indicando a predominância de microbiota proteolítica. Porém, esta autora observou, entre as amostras avaliadas, a predominância de amostras com coágulos do tipo gelatinoso, típico de bactérias do ácido láctico. Este resultado pode ser relacionado com o fato de que as amostras de leite cru avaliadas pela autora não eram refrigeradas. Ainda neste estudo, foram constatadas variações dependentes da estação do ano; e, no verão, apenas uma amostra não coagulou, indicando, possivelmente, a presença de substâncias antimicrobianas.

Quadro 1 – Percentual dos tipos de coágulos formados na prova de lactofermentação, em amostras de leite refrigerado granelizado, coletadas em tanques de refrigeração individuais, coletivos e no silo industrial

Tipo de coágulo	Origem		
	Tanques individuais	Tanques coletivos	Silo industrial
Homogêneo	29,4	37,5	50,0
Gelatinoso	2,9	12,5	0,0
Floculoso	17,6	25,0	0,0
Caseoso	2,9	0,0	0,0
Digerido	26,5	12,5	25,0
Sulcado	17,6	12,5	25,0
Ausência de coágulo	2,9	0,0	0,0

4.1.2. Contagem de bactérias mesofílicas e mesofílicas proteolíticas

A maior variação entre as contagens de bactérias mesofílicas foi observada nas amostras coletadas em tanques individuais, que foi de $2,5 \times 10^3$ UFC mL⁻¹ a $3,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Este resultado sugere que, em algumas propriedades, as práticas higiênicas adotadas não garantiram uma contaminação baixa do leite armazenado sob refrigeração. A variação nas contagens

de mesófilos nas amostras coletadas em tanques coletivos foi de $1,0 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ a $1,2 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, com média de $3,8 \times 10^5$ UFC mL⁻¹.

Embora as amostras de leite cru refrigeradas coletadas no silo industrial tenham apresentado menor variação na contagem de mesófilos aeróbios, entre $1,4 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $5,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, a população contaminante apresentou-se em números elevados. Esta menor variação pode ser explicada pela constante homogeneização do leite no silo e as contagens mais elevadas podem ser explicadas pela mistura de diferentes amostras, com diferentes graus de contaminação. Além disso, deve-se considerar que contaminações adicionais e crescimento microbiano podem ocorrer durante o transporte e a estocagem na indústria. Esse resultado é diferente do apresentado por SILVA (2001), que encontrou uma grande variação entre os valores mínimo, mediano e máximo de mesófilos, respectivamente de $1,9 \times 10^4$ UFC mL⁻¹; $3,2 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $1,6 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, em amostras de leite cru refrigerado, coletadas no silo de uma indústria e destinadas ao processamento de leite UHT.

Em quatro das 33 amostras coletadas em tanques individuais, constatou-se contagem padrão superior ao requisito microbiológico proposto pelo Ministério da Agricultura, que é de $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, a partir de 01/07/2005, para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e de $7,5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ para as mesmas regiões, a partir de 01/07/2008 (BRASIL, 2002b). O maior valor encontrado para a contagem de bactérias mesofílicas aeróbias nas amostras coletadas de silo industrial foi de $5,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Este número está abaixo dos valores constatados por SILVA (2003), em amostras de leite cru coletadas em silos industriais de laticínios localizados nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás, destinadas ao processamento de leite UHT e que apresentaram contagens microbianas entre 10^6 e 10^7 UFC mL⁻¹. Este autor constatou diferença significativa na contagem média de microrganismos mesófilos nas amostras de leite provenientes desses Estados, sendo $1,4 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ nas amostras coletadas no Rio Grande do Sul, $4,9 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ nas de São Paulo e $1,9 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ nas de Goiás. Apenas amostras do Estado de São Paulo, na estação seca, apresentaram contagem média de mesófilos aeróbios inferior ao valor máximo legal para leite cru refrigerado. Ainda de acordo com este mesmo autor, os dados obtidos nas amostras coletadas no

Estado de São Paulo podem ter sido influenciados pela menor distância entre os centros de produção do leite e a fábrica de laticínios, quando comparada com os Estados de Goiás e Rio Grande do Sul. Para o autor, a otimização das linhas de leite e uma utilização eficaz dos postos de refrigeração poderiam reduzir o intervalo entre a ordenha e a recepção do leite no estabelecimento industrial. Como a indústria de laticínios demanda pela produção de produtos com vida de prateleira mais longa, grande ênfase deve ser dada à qualidade da matéria-prima. MURPHY e BOOR (2000) descreveram que a causa mais freqüente de contagens elevadas em leite é representada pelo uso de procedimentos de higienização inadequados no sistema de produção, considerando que resíduos de leite presentes nas superfícies dos equipamentos constituem nutrientes para o crescimento de bactérias que contaminam o produto em etapas subseqüentes ao processamento. Além disso, o contato do leite com animais sujos, ambientes inadequados de produção, falhas na velocidade de resfriamento do leite para temperaturas inferiores a 4,4°C e leite proveniente de animais com mastite também podem resultar em contagens microbianas elevadas.

A diferença entre as médias de contagens de bactérias mesófilas proteolíticas não foi estatisticamente diferente para os tanques individuais e coletivos, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Porém, a média de mesofílicos proteolíticos em amostras de silo industrial diferiu das encontradas para as amostras coletadas nos tanques individuais e coletivos (Quadro 2).

Quadro 2 – Médias dos logaritmos dos números de unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹) de bactérias mesófilas (I), mesófilas proteolíticas (II), psicrotróficas (III), psicrotróficas proteolíticas (IV) e de *Pseudomonas* spp. (V), de amostras coletadas em tanques de refrigeração individuais, coletivos e no silo industrial

Tanque	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)
Individual	5,13 ^a	4,65 ^a	4,49 ^a	3,62 ^a	3,94 ^a
Coletivo	5,26 ^a	4,85 ^{a, b}	4,70 ^{a, b}	3,83 ^{a, b}	4,47 ^{a, b}
Silo Industrial	6,36 ^b	5,66 ^b	6,20 ^b	5,25 ^b	5,84 ^b

Médias seguidas de uma mesma letra nas colunas não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

4.1.3. Contagem de bactérias psicrotróficas - isolamento e identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas

A contagem de bactérias psicrotróficas no leite cru refrigerado variou entre $2,0 \times 10^2$ UFC mL⁻¹ e $1,0 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ nas amostras coletadas em tanques individuais, entre $8,9 \times 10^2$ UFC mL⁻¹ e $3,2 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ nos tanques coletivos e entre $5,6 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ e $6,4 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ nas amostras coletadas no silo industrial. Números maiores de bactérias psicrotróficas também foram registrados por SILVA (2003) em amostras de leite cru coletadas em silos de indústrias processadoras de leite UHT dos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás. Nessas amostras, as contagens de bactérias psicrotróficas variaram entre $1,4 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $8,8 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ e diferenças significativas foram detectadas em função do Estado e da estação.

Os percentuais de amostras de leite cru refrigerado, com contagens de bactérias psicrotróficas superiores a 10% da contagem de mesófilos aeróbios, estão representados na Figura 1.

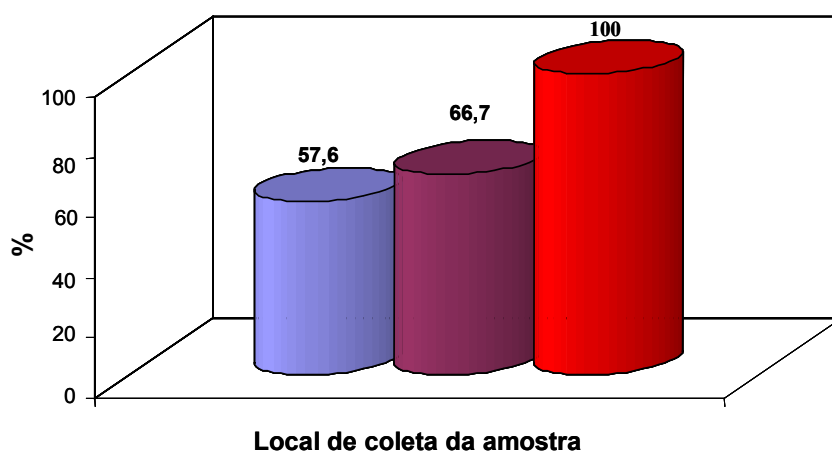


Figura 1 – Percentuais de amostras de leite cru provenientes de tanques de resfriamento individuais (■), coletivos (■) e silo industrial (■), com contagens de bactérias psicrotróficas superiores a 10%, em relação à contagem de mesófilos.

Este resultado indica que mais da metade das amostras de leite estocadas em tanques individuais e coletivos e todas as amostras estocadas no silo industrial não atendem ao padrão estabelecido por BRASIL (1980), que determina o controle da contaminação da microbiota psicrotrófica de tal forma que sua contagem não exceda a 10% do número total de mesófilos aeróbios.

Portanto, pode-se concluir que as condições higiênicas de produção e de armazenamento, de transporte e de refrigeração, nas diferentes etapas da cadeia produtiva do leite, não estão adequadas para minimizar a contaminação microbiana e o crescimento de bactérias psicrotróficas. CELESTINO et al. (1996) também observaram relação elevada entre a contagem de bactérias psicrotróficas e mesófilas aeróbias em amostras de leite cru estocadas a 4°C, por 48 horas. A proporção de bactérias psicrotróficas registrada por estes autores, em relação ao número de mesófilos, variou entre 47 e 80%.

A contagem de bactérias psicrotróficas proteolíticas variou entre $5,0 \times 10^1$ UFC mL⁻¹ e $1,2 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, $1,4 \times 10^2$ UFC mL⁻¹ e $2,5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ e $8,1 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ a $6,5 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, nas amostras coletadas em tanques individuais, coletivos e no silo industrial, respectivamente. O resultado das amostras coletadas no silo industrial foi semelhante aos apresentados por SILVA (2001). Observou-se que a contaminação por bactérias proteolíticas em amostras de leite de silos industriais, destinado ao processamento UHT, variou entre $2,3 \times 10^3$ UFC mL⁻¹ e $8,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹. Bactérias psicrotróficas proteolíticas, produtoras de proteases termorresistentes, constituem a maior causa de deterioração de amostras de leite cru refrigerado (SØRHAUG E STEPANIAK, 1997).

A contagem de *Pseudomonas* spp. variou entre $1,0 \times 10^1$ UFC mL⁻¹ e $3,8 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, nas amostras coletadas em tanques individuais, entre $8,0 \times 10^2$ UFC mL⁻¹ e $6,3 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, nas dos tanques coletivos; e de 2×10^4 UFC mL⁻¹ a $6,4 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ nas do silo industrial. As médias das contagens de *Pseudomonas* spp. foram $2,8 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, $1,3 \times 10^5$ UFC mL⁻¹, e $2,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, nas amostras coletadas em tanques individuais, tanques coletivos e silo industrial, respectivamente.

Em 91,2% das propriedades onde as amostras de leite cru refrigeradas foram coletadas em tanques individuais, a água usada era proveniente de nascentes e 8,8% de poços. Naquelas propriedades onde os tanques eram coletivos, 75, 8,3 e 16,7% da água empregada eram provenientes de nascentes, poços e abastecimento municipal, respectivamente. Em todos os casos, as águas de nascentes e poços não eram submetidas a nenhum tipo de tratamento prévio de desinfecção para uso na ordenha e, ou, na higienização de utensílios e equipamentos. A contaminação desses suprimentos de água

não tratada pode contribuir para o aumento da contaminação do leite por bactérias deterioradoras, incluindo as do gênero *Pseudomonas*.

A contagem dos grupos de microrganismos para as diferentes variáveis analisadas nas amostras coletadas no silo industrial foi estatisticamente superior às encontradas em tanques individuais e coletivos, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey (Quadro 2).

Durante a estocagem de amostras de leite cru sob refrigeração, CELESTINO et al. (1996) observaram o aumento do número de bactérias psicrotróficas com atividades proteolíticas e lipolíticas. Os maiores valores de atividade proteolítica foram registrados em amostras coletadas no outono, em relação às coletadas no inverno e no verão, e foram coincidentes com as altas contagens de bactérias psicrotróficas proteolíticas. Os efeitos da estocagem sob refrigeração incluíram a ocorrência de proteólise e lipólise. A lipólise foi constatada pelo aumento do conteúdo de ácidos graxos livres e pela redução do pH em relação ao leite fresco.

Diferenças significativas, em função do Estado e da estação, nas contagens de bactérias psicrotróficas, em amostras de leite cru coletadas em silos industriais de indústrias processadoras de leite UHT dos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás, foram registradas por SILVA (2003). Esses números foram superiores a 10^6 UFC mL⁻¹, variando entre $1,4 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $8,8 \times 10^7$ UFC mL⁻¹. Os maiores valores de contagem foram observados nas amostras coletadas na estação chuvosa para todos os Estados e uma correlação positiva entre a contagem de bactérias psicrotróficas do leite cru e o aumento da viscosidade do leite UHT, nas amostras de diferentes Estados, também foi observada, sugerindo a presença de atividade de enzimas proteolíticas termorresistentes e, conseqüentemente, proteólise. As contagens de bactérias psicrotróficas encontradas por SILVA (2003) nas amostras de leite cru refrigerado, coletadas no silo industrial nos diferentes Estados, foram superiores às contagens constatadas neste estudo. Este resultado pode ser relacionado com as diferenças das condições de cada indústria, incluindo o tempo de refrigeração resultante do somatório de horas de refrigeração na fonte de produção, transporte até o posto e refrigeração, descarregamento-estocagem-carregamento no posto de refrigeração, transporte até a indústria e descarga e estocagem na planta industrial.

THIELMAN (1994) constatou que a estocagem de amostras de leite tipo “A”, a 4°C e a 8°C, resultou no aparecimento de sabor amargo no produto em decorrência da atividade proteolítica e de bactérias psicrotróficas. Esta autora observou que o problema variou em função das condições higiênicas da granja leiteira, reforçando assim a importância da necessidade de investimentos e de medidas que aprimorem as técnicas de boas práticas de higiene na cadeia produtiva do leite.

Constatou-se, nas amostras coletadas em tanques coletivos, um maior percentual de amostras de leite cru refrigerado e granelizado contaminado com mesófilos, mesófilos-proteolíticos, psicrotróficos, psicrotróficos proteolíticos e *Pseudomonas*, com contagens na faixa entre 10^5 e 10^6 UFC mL⁻¹ (Figura 2). Observou-se também que, na maioria das vezes, as amostras com contagens acima de 10^6 UFC mL⁻¹ foram coletadas no silo industrial (Figura 2). Este resultado sugere que os procedimentos de higienização, associados ao tempo e à temperatura de estocagem da matéria-prima na fonte produtora e às condições de transporte, não estão sendo suficientes para reduzir a contaminação e o crescimento dos microrganismos contaminantes. Em paralelo e respeitando o mesmo período da amostragem deste trabalho, foi realizado um levantamento retrospectivo em uma planta industrial localizada na Zona da Mata. Com base nos arquivos de análises da matéria-prima recebida na indústria, entre maio e agosto de 2002, também um maior percentual de amostras de leite com contagens de mesófilos entre 10^5 e 10^6 UFC mL⁻¹, ou superior a 10^6 UFC mL⁻¹, foi constatado em tanques coletivos, quando comparado aos tanques individuais. Foi observado que todas as amostras coletadas no silo industrial também apresentaram contaminação por bactérias mesofílicas aeróbias, superior a 10^6 UFC mL⁻¹. Os registros indicaram ainda que, posteriormente, nos meses de setembro a dezembro de 2003, em apenas 7,7% das amostras coletadas em tanques individuais, a contagem de mesófilos foi superior a 10^6 UFC mL⁻¹, enquanto este valor foi encontrado em 62,5% dos tanques coletivos.

Existe uma grande controvérsia entre a relação do número de bactérias contaminantes e os possíveis defeitos na qualidade do leite e derivados após o processamento. ADAMS et al. (1975) observaram que altas populações de psicrotróficos não são necessárias para a produção de concentrações

significativas de proteases termorresistentes. KOCAK e ZADOW (1985), ao estudarem o efeito da população bacteriana sobre a gelificação em leite UHT integral, estocado a 25°C, e a extensão da proteólise, também constataram que amostras de leite UHT processadas com alta e baixa contagem bacteriana gelificaram na mesma proporção. Os autores concluíram que o tempo de gelificação não pareceu estar associado somente com a qualidade microbiológica do leite.

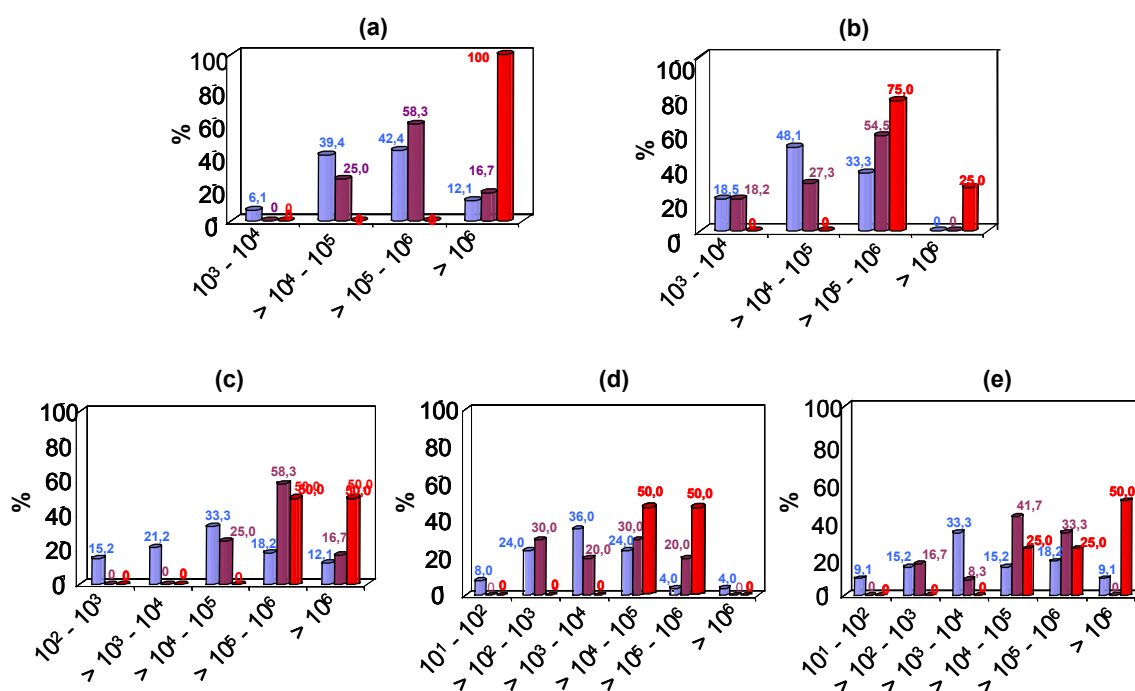


Figura 2 – Percentual de amostras de leite cru coletadas nos tanques de resfriamento individuais (■), coletivos (■), e no silo industrial (■) agrupadas em diferentes faixas de contagens. (a) de mesófilos, (b) mesófilos proteolíticos e psicrotróficos, (d) psicrotróficos proteolíticos, (e) *Pseudomonas* spp.

Temperaturas de refrigeração abaixo de 4°C foram registradas, principalmente, em tanques individuais e estão de acordo com a legislação vigente (Figura 3).

Foram isoladas 153 bactérias de amostras de leite cru refrigeradas em tanques de granelização individuais, coletivos e no silo industrial; dentre estas, 136 foram identificadas. O percentual de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas psicrotróficas proteolíticas isoladas das amostras de leite

refrigerado e o percentual identificado são apresentados na Figura 4. Dentre as 30 bactérias Gram-positivas isoladas, 21 foram identificadas e incluíram os gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* e *Enterococcus*. *Bacillus* e *Paenibacillus* foram encontrados com maior freqüência (Quadro 3). De acordo com dados descritos por CHEN et al. (2003), espécies do gênero *Bacillus* foram detectadas em leite UHT e, em alguns casos, contaminações altas, como 10^5 UFC mL⁻¹, estavam presentes.

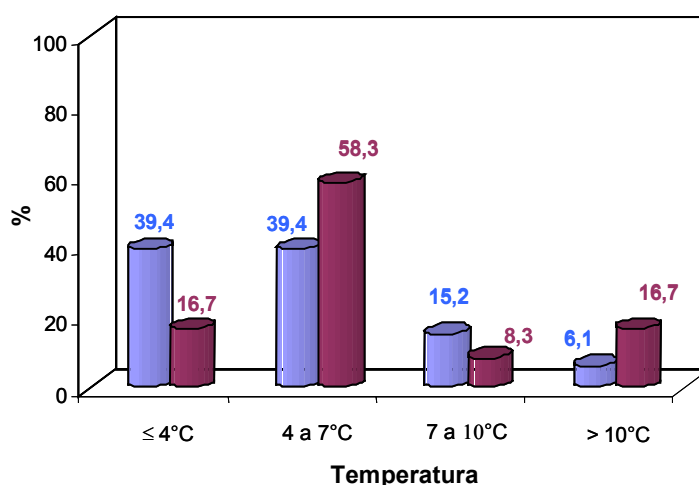


Figura 3 – Percentual de amostras de leite cru provenientes de tanques de resfriamento individuais (■) e coletivos (■), distribuídos em diferentes faixas de temperatura.

A predominância no isolamento de bactérias Gram-negativas, observada nas amostras de leite cru leite refrigerado (Figura 4), está de acordo com resultados de outras pesquisas, nas quais elas são consideradas como contaminantes mais freqüentes do leite estocado sob refrigeração (COUSIN, 1982; ENEROTH et al., 1998). A capacidade de fermentar a glicose foi usada como critério para separar esses isolados em dois grupos: fermentadores e não-fermentadores. No grupo de bactérias Gram-negativas fermentadoras foram identificados gêneros da família Enterobacteriaceae como *Cedecea*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Providência*, *Rhanella* e *Serratia*. O grupo de bactérias não-fermentadoras de glicose incluiu os gêneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*), *Chryseomonas*, *Moraxella* e *Pseudomonas* (Quadro 4).

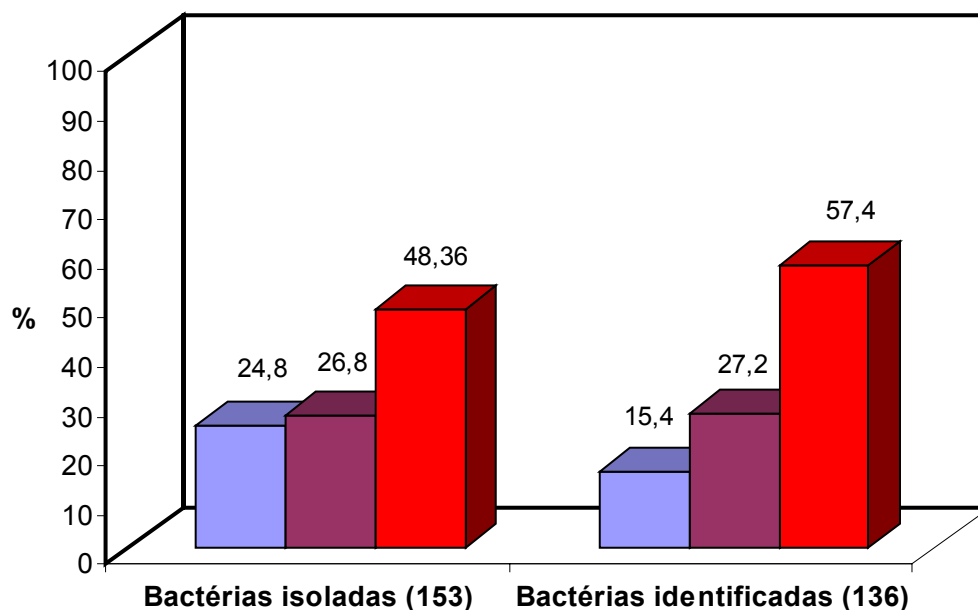


Figura 4 – Percentual de bactérias Gram-positivas (■), Gram-negativas fermentadoras (■) e Gram-negativas não-fermentadoras (■) isoladas e identificadas de leite cru refrigerado. Total de bactérias isoladas e total de bactérias identificadas.

Quadro 3 – Bactérias psicrotróficas proteolíticas Gram-positivas isoladas de leite refrigerado granelizado e relações entre as espécies identificadas e o total de bactérias Gram-positivas, o total de bactérias isoladas e o total de bactérias identificadas

Gênero	Espécie	Percentuais		
		Gram-positivos	Do total isolado	Total identificado
<i>Bacillus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	14,29	1,96	2,20
	<i>B. subtilis</i>	4,76	0,66	0,74
	<i>Bacillus</i> sp.	4,76	0,66	0,74
<i>Paenibacillus</i>	<i>P. alvei</i>	9,52	1,31	1,47
	<i>P. macerans</i>	23,81	3,27	3,68
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. sciuri</i>	4,76	0,66	0,74
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. fermentum</i>	4,76	0,66	0,74
	<i>L. plantarum</i>	4,76	0,66	0,74
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> subespécie <i>cremoris</i>	4,76	0,66	0,74
	<i>Lactococcus</i> sp.	9,52	1,31	1,47
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	4,76	0,66	0,74
	<i>E. faecium</i>	9,52	1,31	1,47
Não-identificados		-	5,94	-

Quadro 4 – Bactérias psicrotróficas proteolíticas Gram-negativas isoladas de leite refrigerado granelizado e relações entre as espécies identificadas e o total de bactérias Gram-negativas, o total de bactérias isoladas e o total de bactérias identificadas

Gênero	Espécie	Percentuais		
		Gram-negativos	Total isolado	Total identificado
<i>Acinetobacter</i>	<i>A. lwoffii</i>	0,87	0,65	0,74
<i>Aeromonas</i>	<i>A. hydrophila</i>	5,22	3,92	4,41
<i>Burkholderia</i>	<i>B. cepacia</i>	1,74	1,31	1,47
	<i>B. pseudomallei</i>	1,74	1,31	1,47
<i>Cedecea</i>	<i>C. lapagei</i>	2,61	1,96	2,20
<i>Chryseobacterium</i> (<i>Flavobacterium</i>)	<i>C. meningosepticum</i>	1,74	1,31	1,47
<i>Chryseomonas</i>	<i>C. luteola</i>	1,74	1,31	1,47
<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i>	1,74	1,31	1,47
	<i>E. gergoviae</i>	0,87	0,65	0,74
	<i>E. sakasaki</i>	2,61	1,96	2,20
<i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>	2,61	1,96	2,20
<i>Klebsiella</i>	<i>K. oxytoca</i>	1,74	1,31	1,47
	<i>K. ozanae</i>	4,35	3,27	3,68
<i>Moraxella</i>	<i>M. catharralis</i>	6,09	4,56	5,15
<i>Pantoea</i>	<i>P. agglomerans</i>	3,48	2,61	2,94
<i>Providencia</i>	<i>P. stuartii</i>	0,87	0,65	0,74
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fluorescens</i>	39,15	29,41	33,31
	<i>P. putida</i>	5,22	3,92	4,44
	<i>P. stutzeri</i>	0,87	0,65	0,74
<i>Rhanella</i>	<i>R. aquatilis</i>	2,61	1,96	2,20
<i>Serratia</i>	<i>S. liquefaciens</i>	10,43	7,84	8,82
	<i>S. odorifera</i>	1,74	1,31	1,47

O gênero *Pseudomonas* representou o maior percentual do total de bactérias identificadas, sendo a espécie predominante *P. fluorescens* (Quadro 4). Estes resultados são consistentes com os de outras pesquisas, em que também foram constatados que espécies do gênero *Pseudomonas* representam a microbiota psicrotrófica deterioradora mais freqüente do leite refrigerado (ADAMS et al., 1975; SILVEIRA et al., 1999). Uma grande variedade de bactérias Gram-negativas em amostras de leite cru refrigerado, com contagem de psicrotróficos proteolíticos inferior a 10^5 UFC mL⁻¹, foi constatada por EWINGS et al. (1984). Entretanto, estes autores observaram nas amostras com contagens superiores a 10^5 UFC mL⁻¹ que as colônias foram agrupadas em

somente dois a três tipos morfológicos. Em 18 das 25 amostras com altas contagens, os autores constaram que uma única espécie representou 75% da contagem total de proteolíticos. Quinze destas amostras continham, como espécie predominante, *P. fluorescens*.

4.2. Características das bactérias psicrótróficas isoladas de leite cru refrigerado granelizado

4.2.1. Atividade de enzimas hidrolíticas em diferentes temperaturas e produção de pigmentos fluorescentes

Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas fermentadoras representaram 46,2% do total de isolados e, entre esses organismos, constatou-se a predominância de bactérias com apenas atividade proteolítica nas temperaturas de 6,5, 21 e 35°C. Nestes grupos também foram constatados isolados com atividades de lipase e de lecitinase associadas, porém em menor proporção (Figura 5). As bactérias Gram-positivas apresentaram-se principalmente como proteolíticas, com um baixo percentual de produção associada de lipases e lecitinases (Figura 5a). Entretanto, SILVEIRA et al. (1999) verificaram a presença de atividades lipolíticas e proteolíticas em bacilos Gram-positivos, isolados de amostras de leite cru do tipo B. Porém, estes autores avaliaram a atividade enzimática a 37°C, constatando, em apenas dois isolados (2,5%), a atividade proteolítica; em quatro (5,0%), a atividade lipolítica; em seis (7,5%), atividades associadas de protease e lipase; e quatro deles (5%) não apresentaram nenhuma das atividades enzimáticas avaliadas. A presença de atividade lipolítica foi também verificada por MATTA e PUNJ (1999) em espécies de *Bacillus* psicrótróficos isolados de leite cru.

Dentre os isolados Gram-negativos fermentadores de glicose, a atividade de lipases ocorreu somente associada à de lecitinases, em todas as temperaturas avaliadas (Figura 5b). Entretanto, entre as bactérias Gram-negativas não-fermentadoras de glicose, verificou-se que a atividade proteolítica foi freqüentemente associada à atividade de lipase e lecitinase a 6,5 e 21°C (Figura 5c). É neste grupo de bactérias que estão as espécies de *Pseudomonas*, consideradas os agentes mais importantes de deterioração do leite a baixas temperaturas. Estes resultados são consistentes com

os de outras pesquisas, quando também foi observado que espécies de *Pseudomonas* representam a microbiota psicrotrófica com grande potencial deteriorador do leite refrigerado (MUIR, 1996; SILVEIRA et al., 1999; RAJMOHAN et al., 2002).

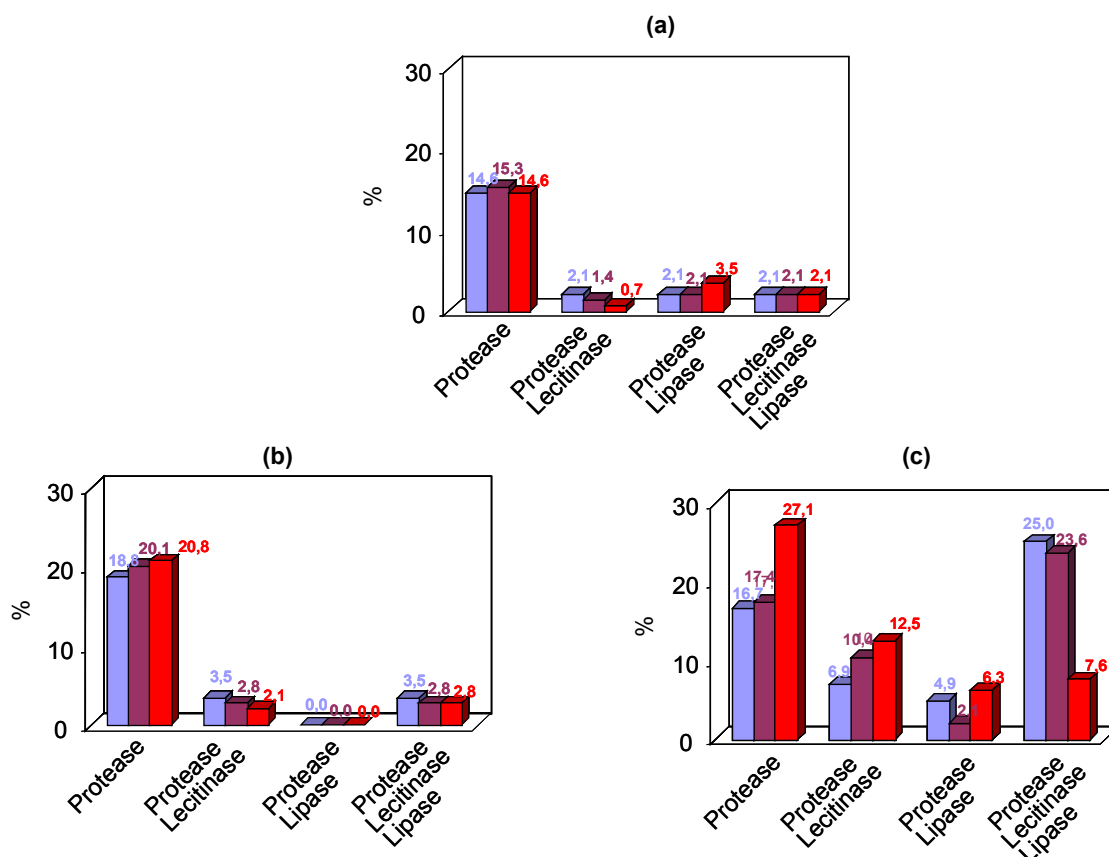


Figura 5 – Distribuição do percentual de isolados com atividades de enzimas hidrolíticas, proteases, lipases e lecitinas a 6,5°C (■), 21°C (■) e 35°C (■). (a) Gram-positivos, (b) Gram-negativos fermentadores e (c) Gram-negativos não-fermentadores.

De acordo com WIEDMANN et al. (2000), estirpes de *Pseudomonas* spp. isoladas de leite cru e agrupadas nos grupos B (*P. fluorescens*) e E (*P. fluorescens* ou, possivelmente, *P. fragi*) apresentaram altas freqüências de atividade de proteases e lipases. Segundo estes autores, as estirpes pertencentes a estes grupos constituem organismos representantes da microbiota deterioradora de particular preocupação para a indústria de laticínios e de alimentos, por produzirem enzimas hidrolíticas que atuam sobre constituintes importantes do leite do ponto de vista tecnológico, as proteínas e os lipídios.

Resultados de DOGAN e BOOR (2003) também evidenciaram que 69% dos isolados de *P. fluorescens* apresentaram atividades proteolíticas e de lecitinase, enquanto apenas 14,5% dos isolados de *P. putida* produziram essas enzimas hidrolíticas.

O aumento da temperatura para 35°C reduziu o percentual de isolados Gram-negativos não-fermentadores com atividade simultânea dos três tipos de enzimas (Figura 5c). Resultados semelhantes foram apresentados por WANG e JAYARAO (2001) ao observarem que isolados de *P. fluorescens* exibiram maior percentual de atividade proteolítica a 7°C (80%) e a 22°C (90,9%), enquanto menor percentual de isolados apresentaram atividade proteolítica a 32°C (58,2%). Eles verificaram também que o percentual de isolados de *P. fluorescens* que exibiu atividade lipolítica a 22°C (45%), foi estatisticamente superior aos percentuais constatados para as temperaturas de 7°C (7,3%) e de 32°C (7,3%).

RAJMOHAN et al. (2002) constataram, em todos os 37 isolados de *P. fluorescens* do leite desnatado, semidesnatado e integral, a presença de atividade proteolítica e lipolítica sobre a caseína e em ágar tributirina, respectivamente, apesar de encontrarem variação no grau de atividade.

Dentre os isolados Gram-negativos não-fermentadores pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, 77,4% produziram pigmentos fluorescentes. Este percentual foi maior do que o encontrado por MUIR (1996), em que 50% das espécies do gênero *Pseudomonas*, isoladas de leite cru estocado em tanques de refrigeração e em silos industriais, produziram pigmentos fluorescentes.

4.2.2. Adesão de bactérias psicrotróficas proteolíticas em superfície de aço inoxidável

As bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado avaliadas quanto à capacidade de adesão em superfícies de aço inoxidável AISI 304 incluíram as bactérias *P. fluorescens* (07 A, 041), *Acinetobacter lowffi* (09), *Serratia liquefaciens* (020, 021, 039), *Klebsiella oxytoca* (093), *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Lactococcus* sp. (035), *Bacillus amiloliquefaciens* (119), *Staphylococcus sciuri* (052) e *Paenibacillus macerans* (105). Por meio da técnica de microscopia de epifluorescência, foi possível observar que todos os

isolados avaliados foram capazes de aderir aos cupons de aço inoxidável, após incubação a 7°C, por 48 horas. Entretanto, a capacidade de adesão foi diferente entre os isolados e o número de células aderidas variou de 10² a 10⁵ células/cm² (Quadro 5).

Constatou-se, para os isolados Gram-negativos, uma maior capacidade de adesão à superfície dos cupons de aço inoxidável (Quadro 5 e Figura 6). Resultados semelhantes foram apresentados por Suárez et al. (1992), que observaram maior capacidade de adesão de bactérias psicrotróficas Gram-negativas em relação às bactérias Gram-positivas isoladas de leite cru a diferentes tipos de materiais usados para a construção de equipamentos de laticínios, incluindo o aço inoxidável. MURPHY et al. (1998) também constataram, ao monitorarem superfícies de contato de equipamentos em indústrias de laticínios, a predominância de bactérias Gram-negativas aderidas na maioria das amostras.

Quadro 5 – Logaritmo do número de células de bactérias psicrotróficas proteolíticas Gram-negativas e Gram-positivas aderidas por cm², em superfície de aço inoxidável AISI 304, após crescimento em leite desnatado por 48 horas, a 7°C

Bactérias	Logaritmo de células aderidas/cm ²
<i>P. fluorescens</i> 041	5,00
<i>P. fluorescens</i> 07A	4,95
<i>Acinetobacter lowffi</i> 09	4,59
<i>Serratia liquefaciens</i> 020	4,23
<i>Serratia liquefaciens</i> 021	4,22
<i>Serratia liquefaciens</i> 039	4,01
<i>Klebsiella oxytoca</i> 093	3,96
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525	3,62
<i>Lactococcus</i> sp. 035	3,57
<i>Bacillus amiloliquefaciens</i> 0119	3,30
<i>Staphylococcus sciuri</i> 052	2,97
<i>Paenibacillus macerans</i> 0105	2,62

O potencial de adesão constatado para essas bactérias ressalta a necessidade de cuidados técnicos das pessoas envolvidas na cadeia produtiva do leite, já que mesmo com a nova regulamentação de estocagem do leite a

baixas temperaturas na fonte de produção, bactérias psicrotróficas deterioradoras contaminantes podem aderir e se multiplicar em superfícies de recipientes, comprometendo a qualidade da matéria-prima e a conseqüente qualidade dos derivados do leite.

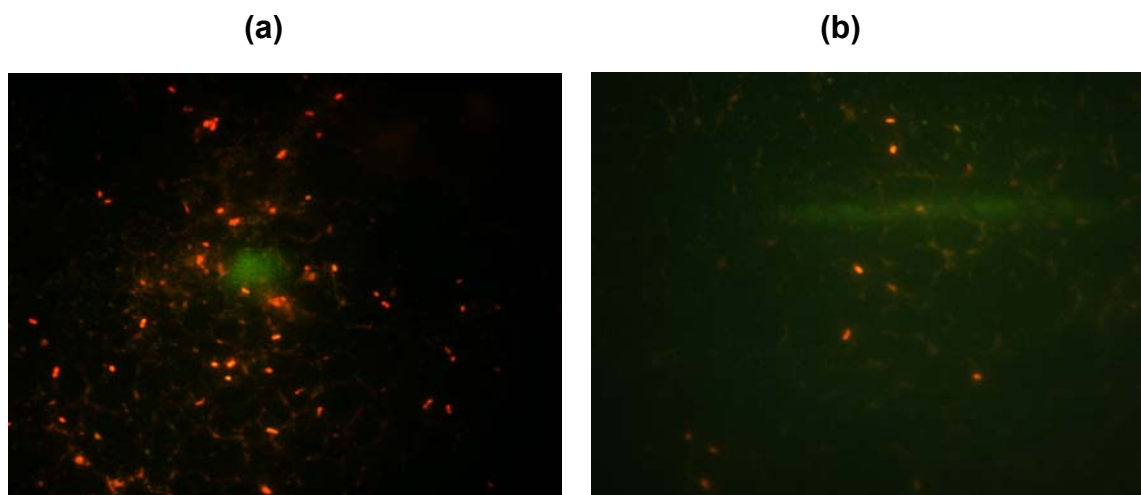


Figura 6 – Células de *P. fluorescens* 041 (a) e *Paenibacillus macerans* 0105 (b) aderidas em superfície de aço inoxidável AISI 304, após crescimento em LDR 12%, por 48 horas, a 7°C, observadas em microscopia de epifluorescência.

4.2.3. Termoestabilidade de enzimas proteolíticas em sobrenadantes de culturas de bactérias psicrotróficas proteolíticas

Dentre os 136 isolados psicrotróficos proteolíticos identificados, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram avaliadas quanto à produção de enzimas termoestáveis ao tratamento térmico de 100°C, por 30 minutos. A presença dessas enzimas foi constatada no sobrenadante de bactérias Gram-negativas dos gêneros *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Pseudomonas* e *Serratia* (Quadro 6) e, entre os isolados Gram-positivos, foi observada a atividade proteolítica antes do tratamento térmico em bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*. Porém, somente três isolados do gênero *Bacillus* apresentaram atividade proteolítica residual após o tratamento térmico do sobrenadante (Quadro 6). De acordo com CHEN et al. (2003), espécies do gênero *Bacillus* possuem, em geral, alta atividade proteolítica extracelular e

intracelular, com enzimas que são também resistentes aos processamentos térmicos empregados no processamento de leite.

Quadro 6 – Atividade proteolítica termooestável em sobrenadantes de bactérias psicrotróficas Gram-negativas e Gram-positivas e unidades de enzima/hora, antes do tratamento térmico a 100°C, por 30 segundos

Espécie	Código do isolado	Atividade proteolítica residual (%)	Unidades de enzima/hora (antes tratamento térmico)
Gram-negativos			
<i>Aeromonas hydrophila</i>	037	87,93	16,15
	042	119,23	3,90
	0113	119,85	6,80
<i>Burkholderia cepacia</i>	05	83,38	19,55
	0112	144,12	1,70
<i>Chryseomonas luteola</i>	0107	113,04	2,30
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	07A	113,16	1,90
	07B	53,33	3,00
	033	103,66	4,10
	041	83,93	2,80
	072	93,20	7,35
	077	85,42	9,60
	096	80,49	2,05
	097	100,00	1,15
	0123	122,50	2,00
	0126	90,62	8,00
	0137	73,33	0,75
	0138	156,86	2,55
<i>Serratia liquefaciens</i>	0141	80,10	9,80
	020	101,74	5,75
	021	91,30	1,15
	039	96,43	1,40
Gram-positivos			
<i>Bacillus amiloliquefaciens</i>	048	-9,59	10,95
	0104	-8,55	21,05
	0105	-9,44	19,60
	0113	119,85	6,80
	0151	45,32	23,50
<i>Paenibacillus macerans</i>	0150	-7,69	8,45
<i>Bacillus alvei</i>	0135	19,31	7,25
	0147	-11,18	8,05

EWINGS et al. (1984) constataram que o número de isolados do gênero *Pseudomonas* com atividade proteolítica termoestável foi superior em relação às espécies pertencentes à família Enterobacteriaceae e aos gêneros *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Aerococcus*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus*. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados neste estudo, em que isolados Gram-negativos não-fermentadores, especialmente *P. fluorescens*, apresentaram atividade proteolítica termoestável.

ADAMS et al. (1975) reportaram que proteases produzidas por dez diferentes isolados de *Pseudomonas* resistiram ao tratamento térmico de 149°C, por 10 segundos, em tampão de pH 7,5. Em espécies do gênero *Pseudomonas* isoladas de leite cru, GRIFFITHS et al. (1981) também constataram a termorresistência de proteases produzidas por esses organismos, apresentando retenção de atividade residual de 55 a 65% após tratamento térmico de 77°C, por 17 segundos, e de 20 a 40% de atividade após tratamento térmico de 140°C, por 5 segundos. FAIRBAIRN e LAW (1986) observaram que a maioria das espécies de *Pseudomonas* produz somente um tipo de protease termorresistente, apresentando zinco em seu sítio ativo, além de modificações na termoestabilidade em função da concentração de cálcio, ausência de grupamentos sulfidrílicos, massa molecular e conteúdo de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. RAJMOHAN et al. (2002) também relataram a alta termoestabilidade de proteases produzidas por *P. fluorescens* isoladas de leite semidesnatado, ao registrarem atividade residual após tratamento a 100°C, por 5 minutos, e a 121°C por 20 minutos. Neste último caso, a atividade foi reduzida em 33,3%.

Nos isolados psicrotróficos proteolíticos Gram-negativos não-fermentadores que apresentaram características fenotípicas do gênero *Pseudomonas*, a presença do gene *apr*, que codifica a produção de metaloproteases alcalinas termorresistentes, foi detectada por MARTINS (2003). Este autor também detectou o mesmo gene em culturas de referência de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* e *Serratia marcescens*. Ao analisar individualmente um grupo constituído por dez isolados, positivos para a presença do gene *apr*, ele observou que em seis deles estava presente um fragmento de DNA composto de 194 pares de bases e específico para a metaloprotease alcalina.

4.2.4. Crescimento de *P. fluorescens* em temperaturas de refrigeração e grau de proteólise do leite

Observou-se o aumento da população de *P. fluorescens* 07A e 041 com o aumento da temperatura de incubação. Os isolados cresceram em LDR 12%, aproximadamente, quatro ciclos logarítmicos, quando estocados a 2°C, após um período de dez dias (Figura 7a, b). A fase lag a 2 e 4°C foi de aproximadamente, 48 horas. A 4°C, os isolados 07A e 041 atingiram uma população de 10^8 UFC mL⁻¹, em oito e seis dias, respectivamente, o que correspondeu a um aumento também de quatro ciclos logarítmicos. Estes resultados evidenciam que as temperaturas de 2 e 4°C de estocagem do leite, por 48 horas, não garantiriam o controle efetivo do crescimento de *P. fluorescens*. A 7°C, os isolados 07A e 041 atingiram um número de células de, aproximadamente, 10^8 UFC mL⁻¹, em quatro e cinco dias respectivamente, correspondendo também a um aumento de quatro ciclos logarítmicos (Figura 7a, b). Uma concentração de 10^9 UFC mL⁻¹ foi constatada para os isolados 07A e 041 com sete dias de estocagem do LDR 12% a 10°C, o que correspondeu a um aumento de cinco ciclos logarítmicos (Figura 7).

O aumento na população de *P. fluorescens* durante a estocagem a 7°C, por 48 horas, constatado neste estudo, sugere que a refrigeração do leite a 7°C, por 48 horas, pelo sistema de imersão dos latões, prevista na legislação específica (BRASIL, 2002a) para leite refrigerado na fonte de produção, não é suficiente para a manutenção da qualidade microbiológica do leite cru. Uma contaminação inicial elevada do leite por esse tipo de bactéria pode promover o aumento da população para 10^8 UFC mL⁻¹ a 10^9 UFC mL⁻¹, conferindo prejuízos econômicos à indústria de laticínios.

Estes resultados podem ser comparados com os de COUSIN e MARTH (1977), ao estudarem o crescimento de bactérias psicrotróficas em amostras de leite cru, coletadas em tanques de granelização coletivos e que apresentavam contagem inicial aproximada de 10^4 UFC mL⁻¹ mantidas, por quatro dias, sob refrigeração entre 5 e 10°C. Os autores observaram que, com apenas dois dias, a 7°C, a contagem de psicrotróficos foi superior a 10^6 UFC mL⁻¹ e a 10°C, as amostras apresentaram contagem superior a 10^7 UFC mL⁻¹ no mesmo tempo de estocagem. De acordo com os autores, o uso de matéria-prima com

contagens de psicotróficos inferiores a 10^6 UFC mL⁻¹ representa um menor risco de ocorrências de alterações bioquímicas de origem microbiana. A importância da contaminação do leite por bactérias do gênero *Pseudomonas* foi também demonstrada por ELLIS e MARTH (1984) ao constatarem que espécies desse gênero cresceram rapidamente a 7°C, atingindo uma alta população, quando comparadas ao crescimento de estirpes de *Flavobacterium* spp.

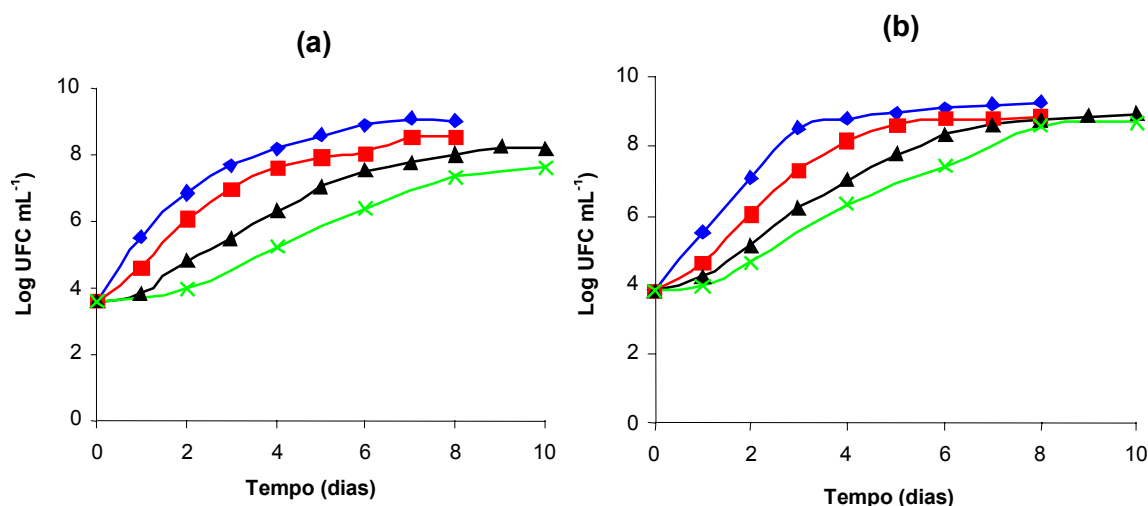


Figura 7 – Crescimento de *P. fluorescens* em leite desnatado, em diferentes temperaturas de refrigeração. (a) - isolado 07A, (b) - isolado 041. 2°C (—x—), 4°C (—▲—), 7°C (—■—); 10°C (—◆—).

A manutenção do leite inoculado com isolados de *P. fluorescens* a 2°C permitiu o aumento de sua vida útil em relação à manutenção do mesmo a 4, 7 e 10°C (Figura 7a e b). Este resultado é semelhante ao de GRIFFITHS et al. (1987), que constatarem um aumento de 25% na vida de prateleira de amostras de leite cru, quando a temperatura foi reduzida de 6 para 2°C, avaliado pelo tempo necessário para que a contagem bacteriana atingisse $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Em 1988, GRIFFITHS et al. (1987) observaram falhas na qualidade do leite UHT em decorrência da atividade de proteases bacterianas termoestáveis associadas a altas taxas de crescimento bacteriano em leite cru e em decorrência da atividade metabólica de bactérias esporuladas. As falhas foram mais evidentes no produto processado a partir do leite cru estocado a 6°C, por dois dias, do que no produto processado com leite cru estocado a 2°C, por quatro dias.

Os resultados do presente estudo reforçam dados constatados por GRIFFITHS et al. (1988) ao avaliarem o crescimento bacteriano em duas séries de amostras de leite de diferentes origens, com grau de contaminação inicial semelhantes sob refrigeração a 2 e 6°C. Uma população de $1,0 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ foi atingida com sete dias a 2°C, e com quatro dias a 6°C, para uma das séries. Para a outra série, uma população de $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ foi observada com três dias de estocagem a 2°C e com apenas dois dias, a 6°C.

HARYANI et al. (2003) também observaram que a temperatura de refrigeração influenciou o crescimento de bactérias psicrotróficas contaminantes naturais em amostras de leite provenientes de duas fontes de produção diferentes. O tempo para que a população de psicrotróficos atingisse 10^7 UFC mL⁻¹ a 2, 4 e 7°C, após dez dias, foi de nove, sete e quatro dias, respectivamente.

Neste estudo, a manutenção de amostras de leite cru a 10°C, por dois dias, favoreceu o aumento rápido da população de *P. fluorescens*, equivalente a três ciclos logarítmicos. Portanto, este resultado ressalta a importância do controle da contaminação inicial do leite cru por espécies de *Pseudomonas* e a necessidade de manutenção da matéria-prima no estabelecimento industrial, em temperaturas inferiores a 10°C. A legislação brasileira permite a estocagem do leite cru no estabelecimento industrial até 10°C (BRASIL, 2002b).

As velocidades específicas máximas de crescimento (μ máximo) para cada um dos isolados aumentaram com o aumento da temperatura de cultivo e o tempo de geração conseqüentemente diminuiu (Quadro 7). Os valores de tempo de geração encontrados neste estudo, a 10°C, são semelhantes aos valores constatados por NEUMEYER et al. (1997), que desenvolveram um modelo preditivo para descrever os efeitos da temperatura e da atividade de água, durante o crescimento de espécies do gênero *Pseudomonas*, e demonstraram o potencial de crescimento destas bactérias no leite em temperaturas de refrigeração.

Com base nos resultados constatados neste estudo, reforçou-se a necessidade do controle rigoroso da temperatura de refrigeração recomendada na Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura de 2002, a qual estabelece, para tanques de refrigeração por expansão, a manutenção do leite

cru na propriedade rural à temperatura de, no máximo, 4°C, por 48 horas, recomendando-se, como ideal, um período de tempo não superior a 24 horas (BRASIL, 2002a). Reforça-se, ainda, a necessidade de investimentos em programas de boas práticas de higiene na cadeia produtiva, para minimizar os efeitos da contaminação por bactérias deterioradoras psicrotróficas, que poderiam crescer durante o período de estocagem nas temperaturas estabelecidas.

Quadro 7 – Parâmetros cinéticos de crescimento de *P. fluorescens* 07A e 041 em leite desnatado, em diferentes temperaturas de refrigeração

Temperatura	Tempo de geração (g) (h)		Velocidade específica máxima ($\mu_{\text{máximo}}$, h ⁻¹)	
	07A	041	07A	041
2°C	12,90	11,34	0,05	0,06
4°C	9,20	8,02	0,07	0,08
7°C	6,17	6,16	0,11	0,11
10°C	4,44	4,65	0,15	0,14

O grau de proteólise determinado durante a estocagem das amostras do LDR 12% inoculadas com os isolados de *P. fluorescens* 07A e 041 aumentou com o aumento da temperatura de refrigeração e com tempo (Figura 8a, b). As amostras inoculadas com *P. fluorescens* 041 apresentaram maiores valores de tirosina em relação às inoculadas com *P. fluorescens* 07A (Figura 8). Este resultado pode estar relacionado com o fato de estes isolados serem geneticamente distintos (MARTINS, 2003) e com a concentração do inóculo inicial. Estes resultados estão de acordo com as conclusões de GRIFFITHS (1989) e MARGESIN e SCHINNER (1992) de que a síntese de proteases e de lipases em leite integral e desnatado inoculados com bactérias psicrotróficas proteolíticas foi semelhante, mas que apresenta variações em relação à estirpe bacteriana avaliada e em função da temperatura de incubação. GRIFFITHS (1989) constatou ainda, durante o crescimento a 2°C, pouca ou nenhuma produção de enzimas. Este resultado pode explicar, parcialmente, o efeito benéfico da estocagem do leite nesta temperatura, antes do processamento.

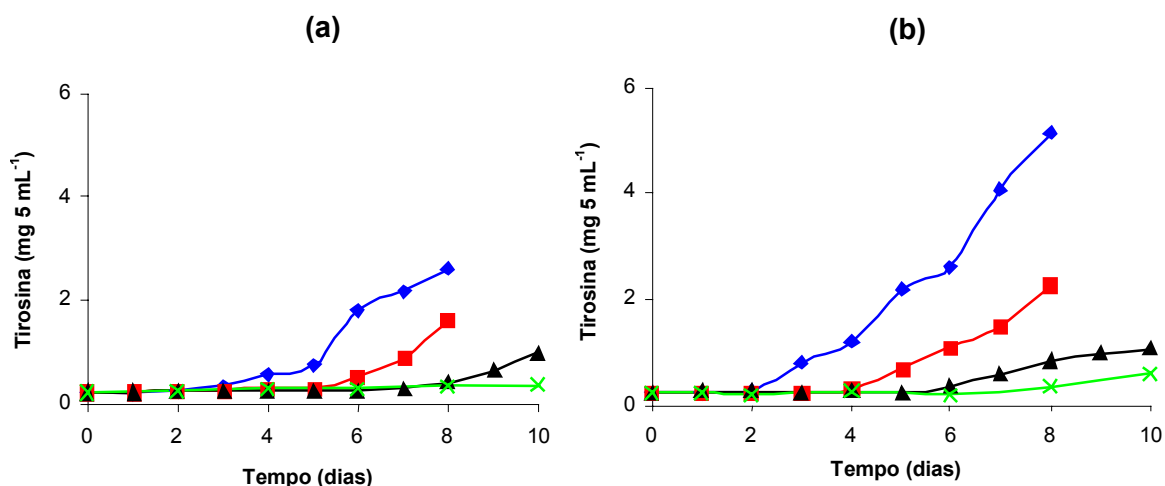


Figura 8 – Concentração de tirosina durante a estocagem das amostras de leite desnatado inoculadas com *P. fluorescens*, estocadas em diferentes temperaturas de refrigeração. (a) - isolado 07A, (b) - isolado 041. 2°C (—x—); 4°C (—▲—); 7°C (—■—); 10°C (—◆—).

A relação entre a população dos dois isolados de *P. fluorescens* e o grau de proteólise, durante a estocagem das amostras de LDR 12%, foi acompanhada e constatou-se que o valor de tirosina permaneceu constante até que a população bacteriana atingisse 10^8 UFC mL⁻¹. O aumento no valor de tirosina coincidiu com o início da fase estacionária de crescimento em todas as temperaturas de refrigeração avaliadas (Figura 9a, b).

Estes resultados estão de acordo com aqueles observados por outros pesquisadores, em que uma maior atividade proteolítica é constatada no início da fase estacionária máxima de crescimento (JUFFS, 1975; LAW, 1979; COUSIN, 1982; STEAD, 1987; FAIRBAIRN e LAW, 1986; GRIFFITHS, 1989; MITCHELL et al., 1989; KOHLMANN et. al., 1991b; SCHOKKER e VAN BOEKEL, 1997; COSTA et al., 2001; RAJMOHAN et al., 2002). GRIEVE e KITCHEN (1985) também não detectaram proteases extracelulares produzidas por bactérias psicrotróficas durante o crescimento em leite antes do início da fase estacionária, sendo que a contagem de células viáveis apresentou grande variação. A produção de proteases pela cultura pura de *P. fluorescens* não foi detectada no leite estocado a 5°C até que a contagem de células viáveis atingisse, aproximadamente, 10^9 UFC mL⁻¹. De acordo com GRIFFITHS (1989), em alguns experimentos a atividade de protease aumentou significativamente quando as células entraram na fase de declínio de crescimento e isto

ocorreu, provavelmente, em função da liberação de protease intracelular para o meio. Em alguns casos, o aumento da atividade proteolítica foi seguido de um decréscimo da concentração de enzimas, o que pode ser explicado pela ocorrência de autólise.

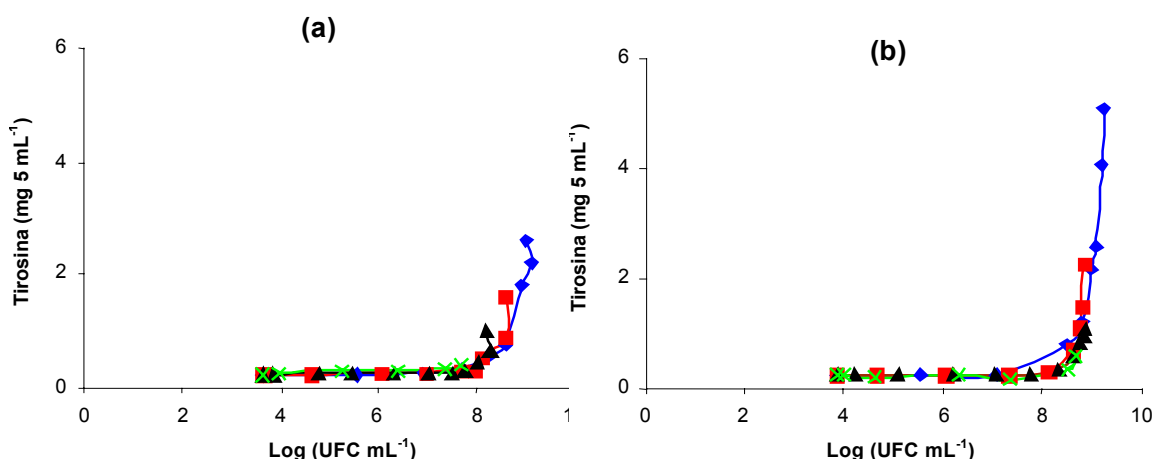


Figura 9 – Valores médios da população de *P. fluorescens* e das concentrações de tirosina por 5 mL de leite desnatado durante, a estocagem a diferentes temperaturas de refrigeração. (a) - isolado 07A, (b) - isolado 041. 2°C (—×—); 4°C (—▲—); 7°C (—■—); 10°C (—◆—).

COSTA et al. (2002) constataram aumento significativo na produção de proteases por *P. fluorescens*, em leite estocado a 6°C, após 72 horas, ou seja, quando a concentração celular atingiu concentrações de, aproximadamente, 10^7 UFC mL⁻¹. Estes autores observaram que, no final do período de cultivo, valores elevados de atividade enzimática no extrato enzimático purificado foram alcançados. Os autores constataram que a protease se encontrava associada à membrana bacteriana e apresentava termorresistência significativa.

Resultados diferentes, que demonstram a atividade proteolítica na presença de uma população baixa de bactérias proteolíticas, foram constatados por outros autores. WIKING et al. (2002) detectaram aumento significativo da proteólise a 4 e 8°C, após 72 horas de estocagem, mesmo na presença de baixa contagem de bactérias psicrotróficas, sugerindo que, possivelmente, a proteólise ocorreu por atividade do sistema plasmina/plasminogênio. O crescimento de bactérias mesofílicas e psicrotróficas não ocorreu após 48 horas, a 4 e a 8°C. A maioria das alterações ocorreu nas primeiras 24 horas e a diferença entre a estocagem a 4 e a 8°C foi irrelevante.

HARYANI et al. (2003) constataram pouca correlação entre a contagem de psicotróficos, o grau de proteólise ou a atividade proteolítica. A 2°C, nenhuma das amostras estocadas exibiu proteólise significativa após dez dias de estocagem, mas a atividade proteolítica pôde ser medida em algumas dessas amostras após oito e dez dias.

A estabilidade a tratamentos térmicos de 72°C, por 15 s, do leite inoculado com *P. fluorescens* 07A e 041 e armazenado a diferentes temperaturas de refrigeração foi superior nas amostras armazenadas em temperaturas de 2 e 4°C, em relação às amostras armazenadas a 7 e 10°C (Quadro 8). A relação entre a concentração de células dos isolados, grau de proteólise e o tempo de estocagem, nas diferentes temperaturas de refrigeração, necessários para perda da estabilidade térmica, foi avaliada. Constatou-se que as amostras de leite com população superior a 10^7 UFC mL⁻¹ foram mais susceptíveis à instabilidade térmica durante o aquecimento a 72°C, por 15 s, e em uma população de *P. fluorescens* de $2,2 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ ocorreu a perda da estabilidade térmica (Quadro 8). ADAMS et al. (1975) constataram que o crescimento de bactérias psicotróficas em leite desnatado aumentou a susceptibilidade das proteínas a alterações pelo calor ao verificarem que amostras de leite com degradação intensa da κ -caseína coagularam durante o tratamento UHT. Estes autores também constataram que a tendência à coagulação variou com a extensão do crescimento e com a intensidade do tratamento térmico.

O menor valor de tirosina necessário para perda da estabilidade térmica do LDR 12% foi de, aproximadamente, 0,3 mg 5 mL⁻¹ de leite (Quadro 8). Este valor pode ser útil às indústrias de laticínios para indicar amostras de leite cru propensas à perda da estabilidade térmica e que, provavelmente, possuam população de psicotróficos proteolíticos superior a 10^7 UFC mL⁻¹.

Valores de tirosina entre 0,2 e 0,8 mg, por 5 mL de leite pasteurizado foram encontrados em amostras coletadas em três granjas leiteiras (A, B e C) e incubadas a 4 e 8°C (THIELMAN, 1994). Maiores valores de tirosina foram constatados nas amostras coletadas na Granja C, onde ocorreu crescimento de bactérias proteolíticas e deterioração das amostras pela atividade metabólica dessas bactérias.

Quadro 8 – Médias de população de *P. fluorescens* 07A e 041, do grau de proteólise e tempo de estocagem para perda da estabilidade do leite

Temperatura	Isolado	População (UFC mL ⁻¹)	Grau de proteólise (mg de tirosina 5 mL ⁻¹)	Tempo (dias) de estocagem para perda da estabilidade térmica (72°C 15 s ⁻¹)
2°C	07A	2,18 x 10 ⁷	0,3474	8
	041	3,43 x 10 ⁸	0,3530	8
4°C	07A	5,80 x 10 ⁷	0,3017	7
	041	2,19 x 10 ⁸	0,3499	6
7°C	07A	4,63 x 10 ⁷	0,2958	4
	041	1,37 x 10 ⁸	0,3196	4
10°C	07A	5,10 x 10 ⁷	0,3503	3
	041	3,20 x 10 ⁸	0,7907	3

Embora a análise dos resultados tenha indicado o aumento da proteólise do leite quando a contagem de *P. fluorescens* atingiu valores aproximados de 10⁸ UFC mL⁻¹, esta mesma relação não pode ser feita apenas com a contagem de psicotróficos. Diferentes autores demonstraram a falta de correlação entre o número de psicotróficos e o grau de proteólise ou a atividade proteolítica em leite (JUFFS, 1973a, b; JUFFS, 1975; GILLIS et al., 1985; PICARD et al., 1996; HARYANI et al., 2003). Portanto, amostras de leite cru com alta contagem de bactérias psicotróficas não possuem, necessariamente, atividade proteolítica mais elevada em comparação com amostras de contagens baixas.

Os resultados desta pesquisa reforçam que o leite, mesmo mantido sob refrigeração, constitui um excelente meio de cultivo para o crescimento e para a produção de proteases por bactérias psicotróficas. Um dos principais fatores que influenciam a qualidade dos produtos lácteos fabricados com matéria-prima armazenada a 7°C ou menos, por vários dias, é o desenvolvimento da microbiota psicotrófica e a produção de proteases termoestáveis (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997).

O armazenamento de amostras de leite cru contaminadas por bactérias psicrotróficas proteolíticas, em condições de refrigeração, por períodos prolongados, antes do processamento, aumenta o risco do crescimento dessas bactérias para concentrações celulares em que a quantidade de enzimas afeta ativamente a qualidade do leite, podendo não ser este adequado para a produção de leite UHT. Do ponto de vista prático, a inativação destas enzimas pelo calor é impraticável, considerando a sua elevada termorresistência. Portanto, a produção destas enzimas pode ser somente prevenida controlando ou reduzindo o crescimento desses organismos. Isto pode ser alcançado por diferentes meios, incluindo os procedimentos de higiene desde a fonte de produção até à indústria. Ainda devem ser incluídas precauções rigorosas para manter o leite à temperatura de 4°C, ou inferiores, e limitar o tempo de estocagem na fonte de produção.

4.2.5. Efeito do crescimento de *P. fluorescens* sobre as proteínas do leite

Não foram constatadas alterações no perfil eletroforético das proteínas em amostras de leite cru ordenhadas e coletadas assepticamente, quando incubadas a 2, 4, 7 e 10°C, por um período de até seis dias (Figura 10). Os densitogramas resultantes da análise em SDS-PAGE confirmaram que o perfil das proteínas das amostras de leite cru, após seis dias de estocagem, nas diferentes temperaturas de refrigeração, não foi alterado (Figuras 11 e 12). Estes resultados confirmam que a qualidade da matéria-prima constitui um dos mais importantes fatores para a fabricação de leite UHT (LAW et al., 1977; GRIFFITHS et al., 1988).

O número de bactérias psicrotróficas nestas amostras foi inferior a 1,0 UFC mL⁻¹. O aumento desta população durante a incubação por seis dias, a 2 e a 4°C, não foi constatado, mas a contagem de psicrotróficos a 7°C foi de 2,2 x 10² UFC mL⁻¹ após seis dias. Quando mantida a 10°C, a microbiota psicrotrófica, após quatro dias, foi de 6,6 x 10² UFC mL⁻¹ e após seis dias, de 6,3 x 10⁴ UFC mL⁻¹.

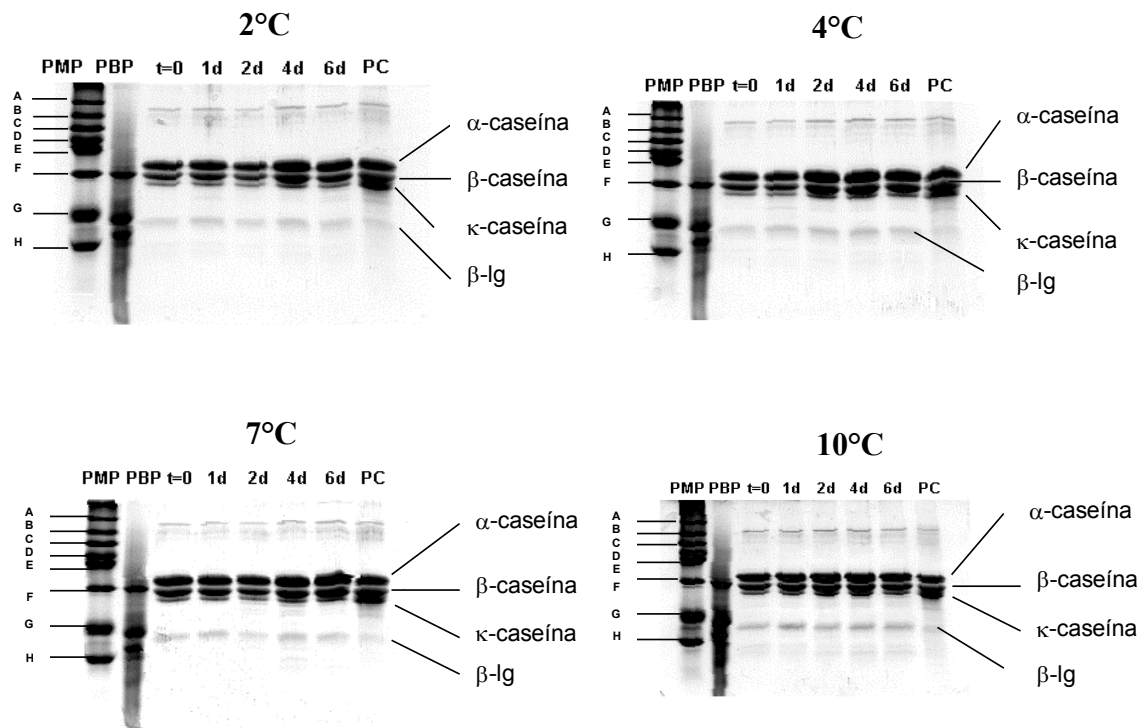


Figura 10 – SDS-PAGE (15%) das proteínas do leite controle, incubado a 2, 4, 7 e 10°C, e revelado com Coomassie-blue. Canaletas: 1) PMP - Padrão de médio peso molecular; 2) PBP - Padrão de baixo peso molecular; 3) t=0 - Leite controle no tempo zero; 4) 1d - Leite controle após um dia de incubação; 5) 2d - Leite controle após dois dias de incubação; 6) 4d - Leite controle após quatro dias de incubação; 7) 6d - Leite controle após seis dias de incubação; 8) PC – Padrão de massa molecular das frações de caseína. O Padrão PMP contém: (A) Fosforilase B (MM 97400), (B) Soro albumina bovina (MM 66200), (C) Glutamato desidrogenase (MM 55000), (D) Ovoalbumina (MM 42700), (E) Aldolase (MM 40000), (F) Anidrase carbônica (MM 31000), (G) Inibidor de tripsina de soja (MM 21500), (H) Lisozima (MM 14400). O Padrão PBP contém Anidrase carbônica (MM 31000), Inibidor de tripsina de soja (MM 20400/19700), Mioglobina de coração de cavalo (16900), Lisozima (MM 14400), Fragmentos de mioglobina: F1, F2 e F3 (MM 8100, 6200 e 2500, respectivamente). O padrão PC contém α (48.840), β (23980) e κ -caseína (19005).

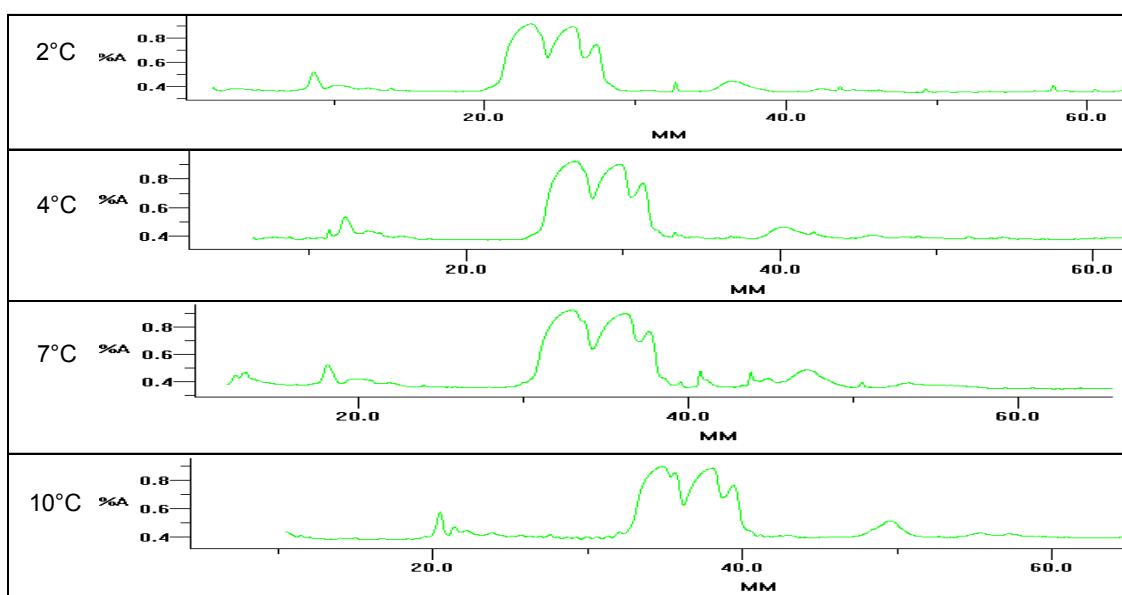


Figura 11 – Densitogramas correspondentes às amostras de leite cru, assepticamente ordenhado e não-inoculado, no início do período de estocagem, a 2, 4, 7 e 10°C.

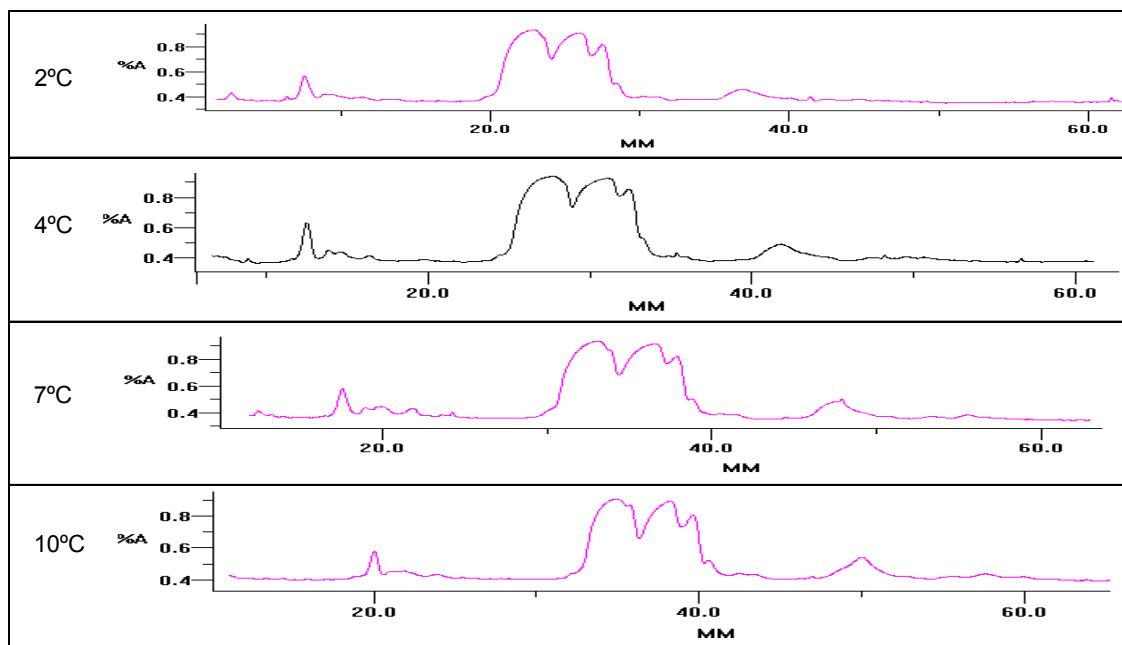


Figura 12 – Densitogramas correspondentes às amostras de leite cru, assepticamente ordenhado e não-inoculado, após seis dias de estocagem a 2, 4, 7 e 10°C.

O efeito do crescimento de *P. fluorescens* 07A e 041 inoculados na mesma matéria-prima usada como controle sobre as frações da caseína foi evidente com o aumento da temperatura de refrigeração e do tempo de estocagem. Mesmo a 2°C, foram constatadas alterações na fração κ -caseína nas amostras inoculadas com ambos os isolados (Figuras 13 e 14). Estes resultados indicam que, mesmo a temperaturas inferiores a 4°C, pode ocorrer a hidrólise das frações caseínicas ao longo do período de estocagem. O aumento da temperatura para 4°C acelerou a degradação das frações protéicas β e κ -caseína, com degradação completa de todas as frações caseínicas com seis e quatro dias de estocagem, respectivamente, para os isolados 07A e 041 (Figuras 13 e 14). A manutenção das amostras de leite cru inoculadas individualmente com os isolados de *P. fluorescens* 07A e 041 e mantidas a 7 e 10°C acelerou a deterioração das frações caseínicas, observando-se já com 48 horas, a 7°C, a degradação das frações κ e β -caseína e o aparecimento da para- κ -caseína. A albumina foi degradada após seis dias de estocagem do leite a 7°C pelo isolado 07A (Figura 13) e com apenas dois dias pelo isolado 041 (Figura 14). A 10°C, a hidrólise completa da fração da albumina pelo isolado 07A foi verificada no quarto dia de estocagem (Figura 13) e com apenas 24 horas na presença do isolado 041 (Figura 14).

Constatou-se maior grau de deterioração das proteínas nas amostras inoculadas com o isolado 041 (Figura 14). Estes resultados reforçam os dados anteriores, em que foi constatada maior atividade proteolítica, pela técnica de Hull (1947), deste isolado, quando comparado com o isolado 07A. A extensão do crescimento dos isolados de *P. fluorescens* 07A e 041 sobre as diferentes frações protéicas da caseína afetaram, inicialmente, a κ -caseína, com a liberação da banda correspondente à para- κ -caseína. Além da fração κ -caseína, a fração β -caseína foi degradada rapidamente, o que pode ser observado com a diminuição da intensidade da banda em SDS-PAGE (Figuras 13 e 14).

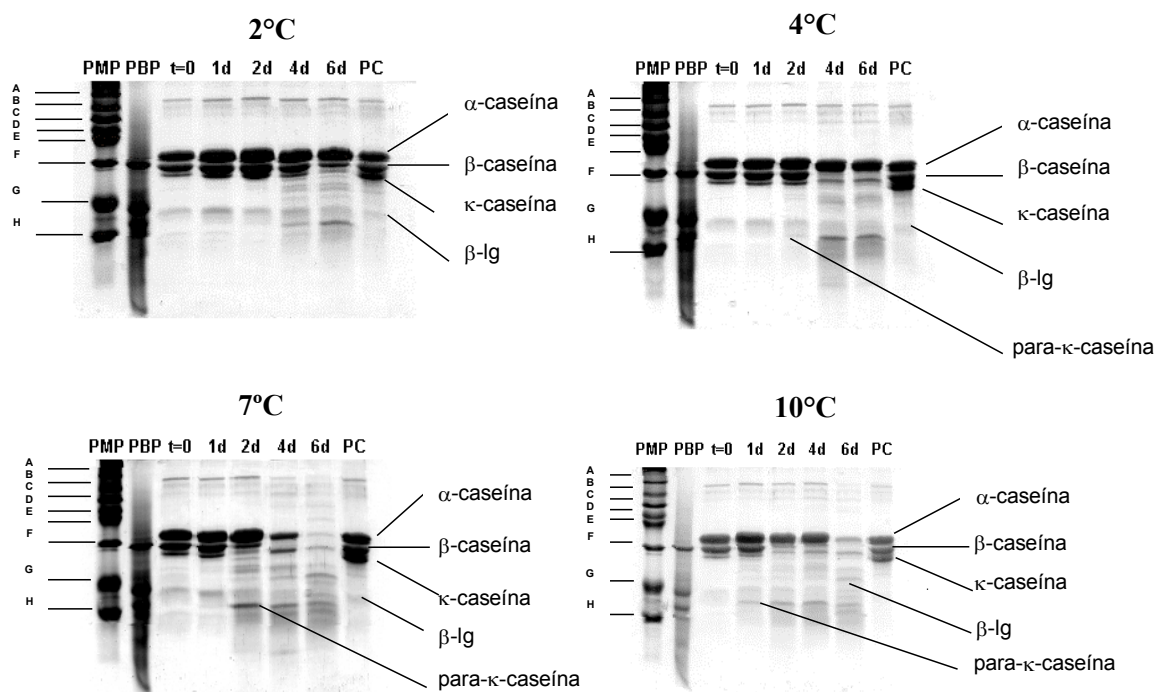


Figura 13 - SDS--PAGE (15%) das proteínas do leite inoculado com o isolado *P. fluorescens* 07A, incubado a 2, 4, 7 e 10°C, e revelado com Coomassie-blue. Canaletas: 1) PMP - Padrão de médio peso molecular; 2) PBP - Padrão de baixo peso molecular; 3) t=0 - Leite inoculado no tempo zero; 4) 1d - Leite inoculado após um dia de incubação; 5) 2d - Leite inoculado após dois dias de incubação; 6) 4d - Leite inoculado após quatro dias de incubação; 7) 6d - Leite inoculado após seis dias de incubação; 8) PC - Padrão de peso molecular das frações de caseína. O Padrão PMP contém: (A) Fosforilase B (MM 97400), (B) Soro albumina bovina (MM 66200), (C) Glutamato desidrogenase (MM 55000), (D) Ovoalbumina (MM 42700), (E) Aldolase (MM 40000), (F) Anidrase carbônica (MM 31000), (G) Inibidor de tripsina de soja (MM 21500), (H) Lisozima (MM 14400). O Padrão PBP contém Anidrase carbônica (MM 31000), Inibidor de tripsina de soja (MM 20400/19700), Mioglobina de coração de cavalo (16900), Lisozima (MM 14400), Fragmentos de mioglobina: F1, F2 e F3 (MM 8100, 6200 e 2500, respectivamente). O padrão PC contém α (48.840), β (23980) e κ-caseína (19005).

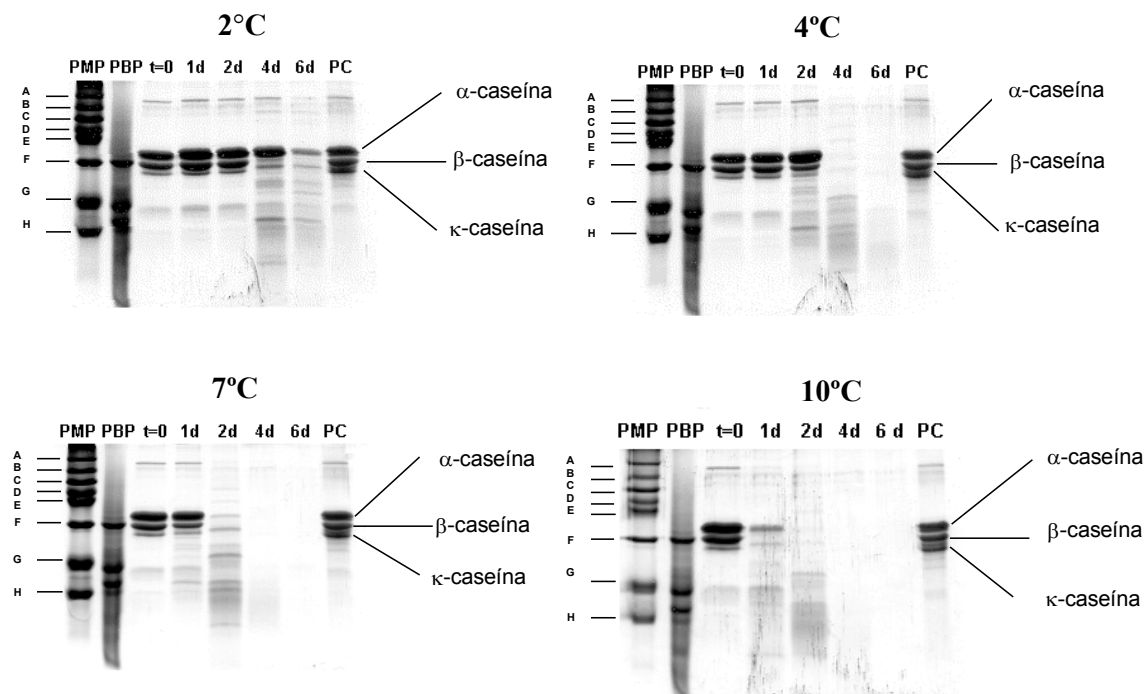


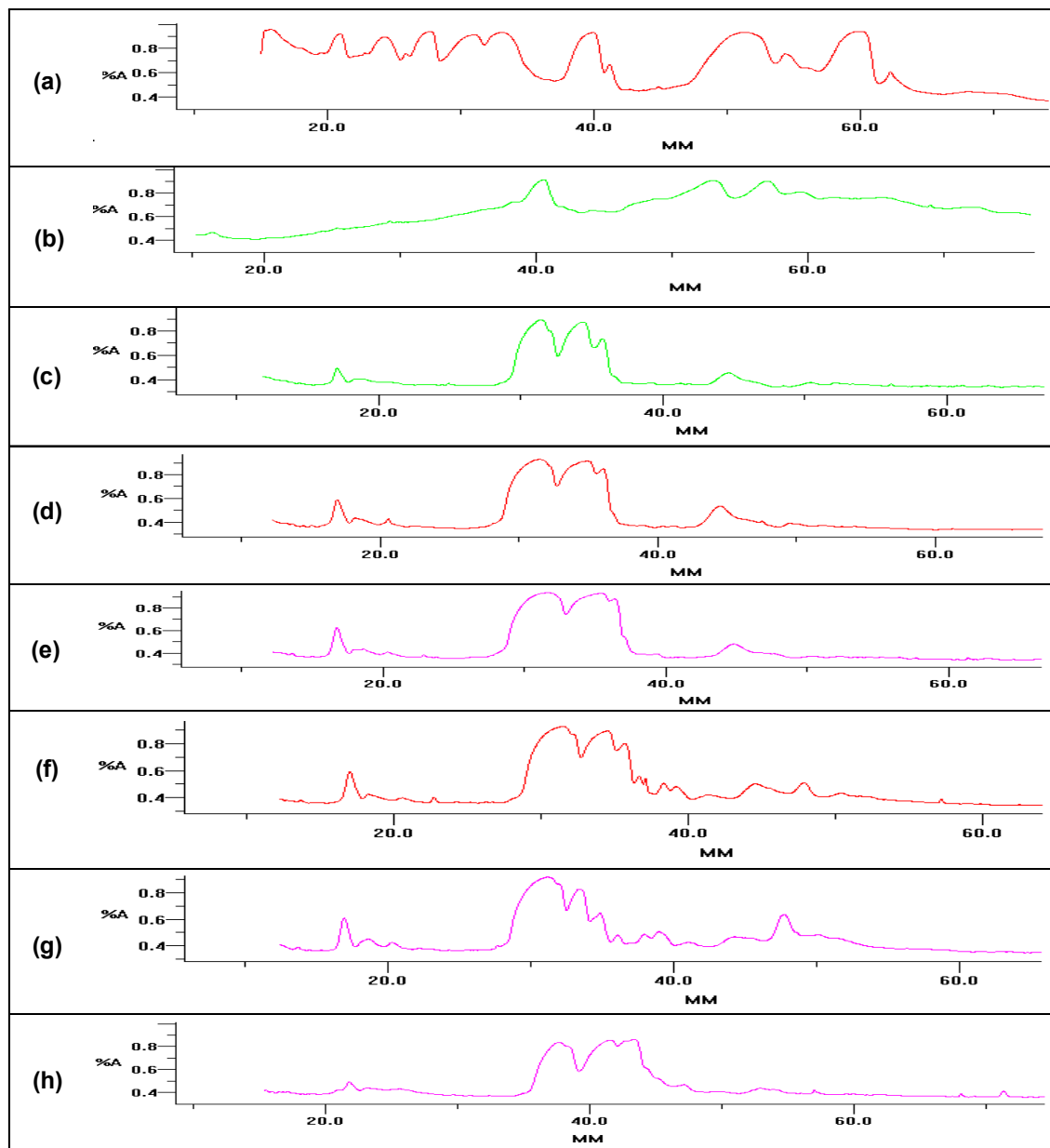
Figura 14 – SDS-PAGE (15%) das proteínas do leite inoculado com o isolado 041, incubado a 2, 4, 7 e 10°C, e revelado com Coomassie-blue. Canaletas: 1) PMP - Padrão de médio peso molecular; 2) PBP - Padrão de baixo peso molecular; 3) t=0 - Leite inoculado com o isolado 041 no tempo zero; 4) 1d - Leite inoculado com o isolado 041 após um dia de incubação; 5) 2d - Leite inoculado com o isolado 041 após dois dias de incubação; 6) 4d - Leite inoculado com o isolado 041 após quatro dias de incubação; 7) 6d - Leite inoculado com o isolado 041 após seis dias de incubação; 8) PC – Padrão de peso molecular das frações de caseína. O Padrão PMP contém: (A) Fosforilase B (MM 97400), (B) Soro albumina bovina (MM 66200), (C) Glutamato desidrogenase (MM 55000), (D) Ovoalbumina (MM 42700), (E) Aldolase (MM 40000), (F) Anidrase carbônica (MM 31000), (G) Inibidor de tripsina de soja (MM 21500), (H) Lisozima (MM 14400). O Padrão PBP contém Anidrase carbônica (MM 31000), Inibidor de tripsina de soja (MM 20400/19700), Mioglobina de coração de cavalo (16900), Lisozima (MM 14400), Fragmentos de mioglobina: F1, F2 e F3 (MM 8100, 6200 e 2500, respectivamente). O padrão PC contém α (48.840), β (23980) e κ-caseína (19005).

Os dados observados neste estudo indicaram que uma inoculação inicial de, aproximadamente, 10^6 UFC mL⁻¹, levou à hidrólise das frações de caseína, estando de acordo com os resultados descritos por COUSINS et al. (1977), em que uma contaminação por bactérias psicrotróficas, superior a $2,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, já compromete a integridade das frações caseínicas, com conseqüente decréscimo na produção de queijos, de aproximadamente 5%, ocasionando impactos econômicos negativos à indústria de laticínios.

COSTA et al. (2002) e CHEN et al. (2003) também constataram a capacidade de *P. fluorescens* em hidrolizar, em baixa temperatura e de forma rápida, a κ -caseína, sugerindo que a estocagem prolongada do leite cru sob refrigeração, antes do processamento, pode resultar na perda de qualidade da matéria-prima em conseqüência da atividade de enzimas termoestáveis de bactérias psicrotróficas, comprometendo a manutenção da qualidade dos produtos lácteos, especialmente aqueles de vida de prateleira longa, a exemplo do leite UHT.

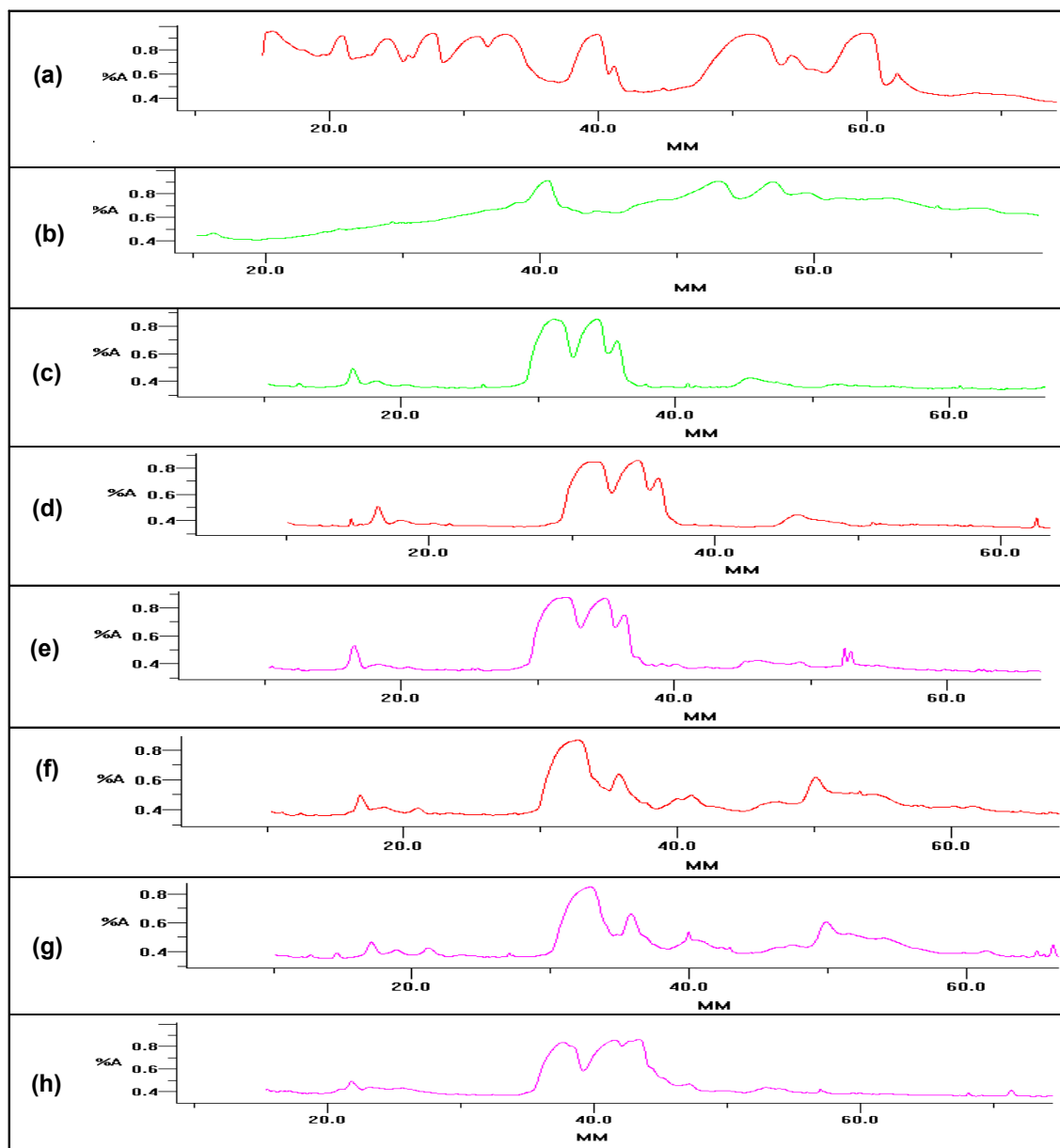
A análise densitométrica qualitativa dos géis do isolado *P. fluorescens* 07A (Figuras 15, 16, 17 e 18) sobre as frações caseínicas reforçou a degradação preferencial das frações κ , β e α -caseína, nesta ordem. Esses resultados são semelhantes aos constatados por GRIEVE e KITCHEN (1985), que observaram que estirpes de *P. fluorescens* e de *S. marcescens*, produtoras de proteases extracelulares termoestáveis, apresentaram maior especificidade para a κ -caseína, seguida da β -caseína e, finalmente, uma menor especificidade para a fração α -caseína.

O efeito deletério do crescimento de *P. fluorescens* e sua atividade enzimática, observados sobre as proteínas do leite, demonstraram que as temperaturas e tempos de resfriamento, recomendados no sistema de coleta a granel (BRASIL, 2002a), não impedem o crescimento de bactérias psicrotróficas e atividade de suas enzimas. Essas temperaturas são de 4°C, para tanques de refrigeração por expansão direta, e, no máximo, de 7°C quando se emprega o sistema de imersão. No estabelecimento processador, a temperatura de refrigeração máxima de conservação do leite cru é de até 10°C. O tempo entre a ordenha e recebimento no estabelecimento industrial deve ser observado, considerando que a proteólise foi também dependente do tempo nas temperaturas avaliadas.



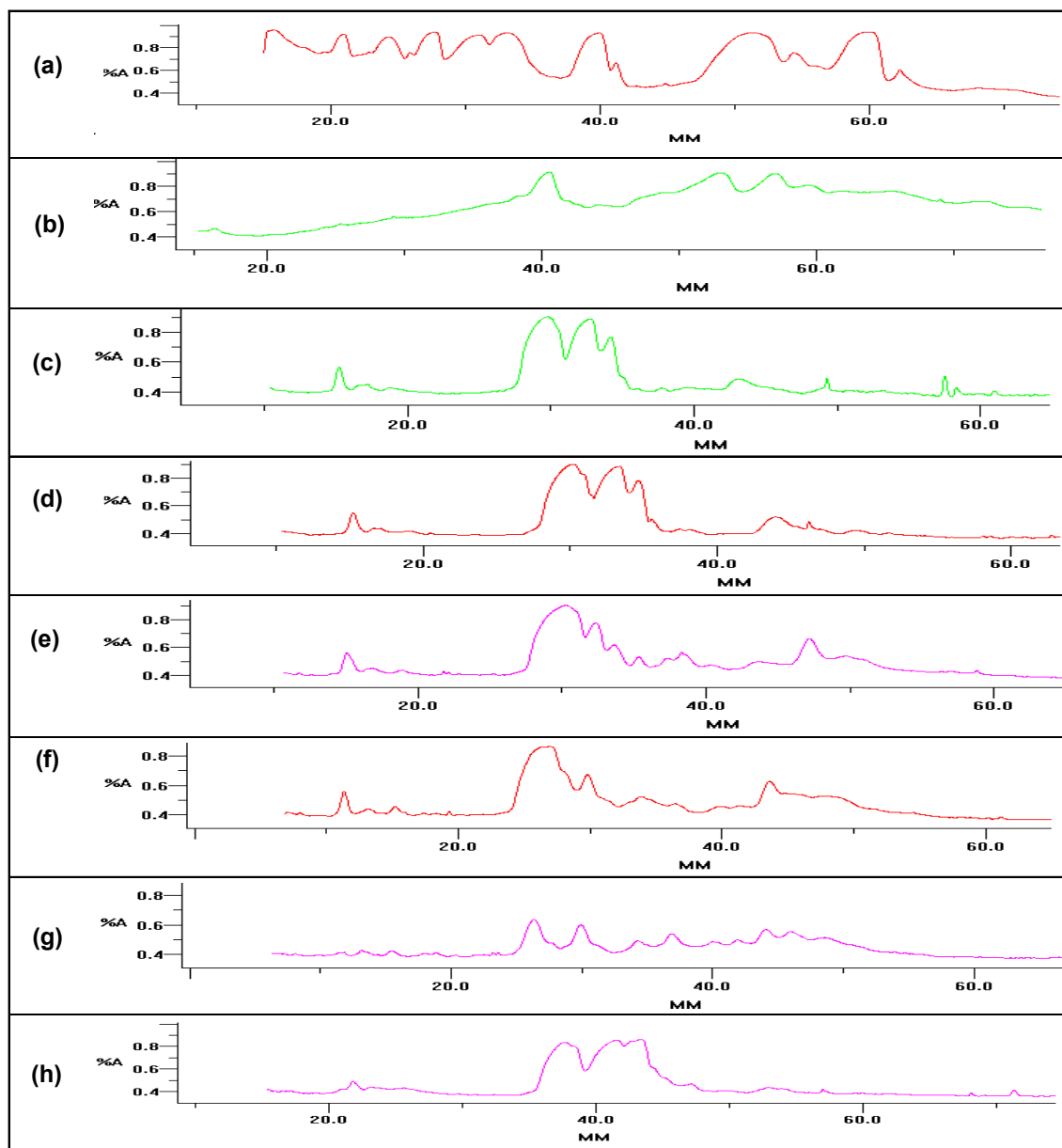
(a) – Padrão de médio PM; (b) – Padrão de baixo PM; (c) – Tempo 0; (d) - um dia; (e) – dois dias; (f) – quatro dias; (g) – seis dias; (h) – Padrão de Caseína (α , β e κ).

Figura 15 – Densitogramas de amostras de leite cru, assepticamente coletado e inoculado como *P. fluorescens* 07 A, incubadas a 2°C.



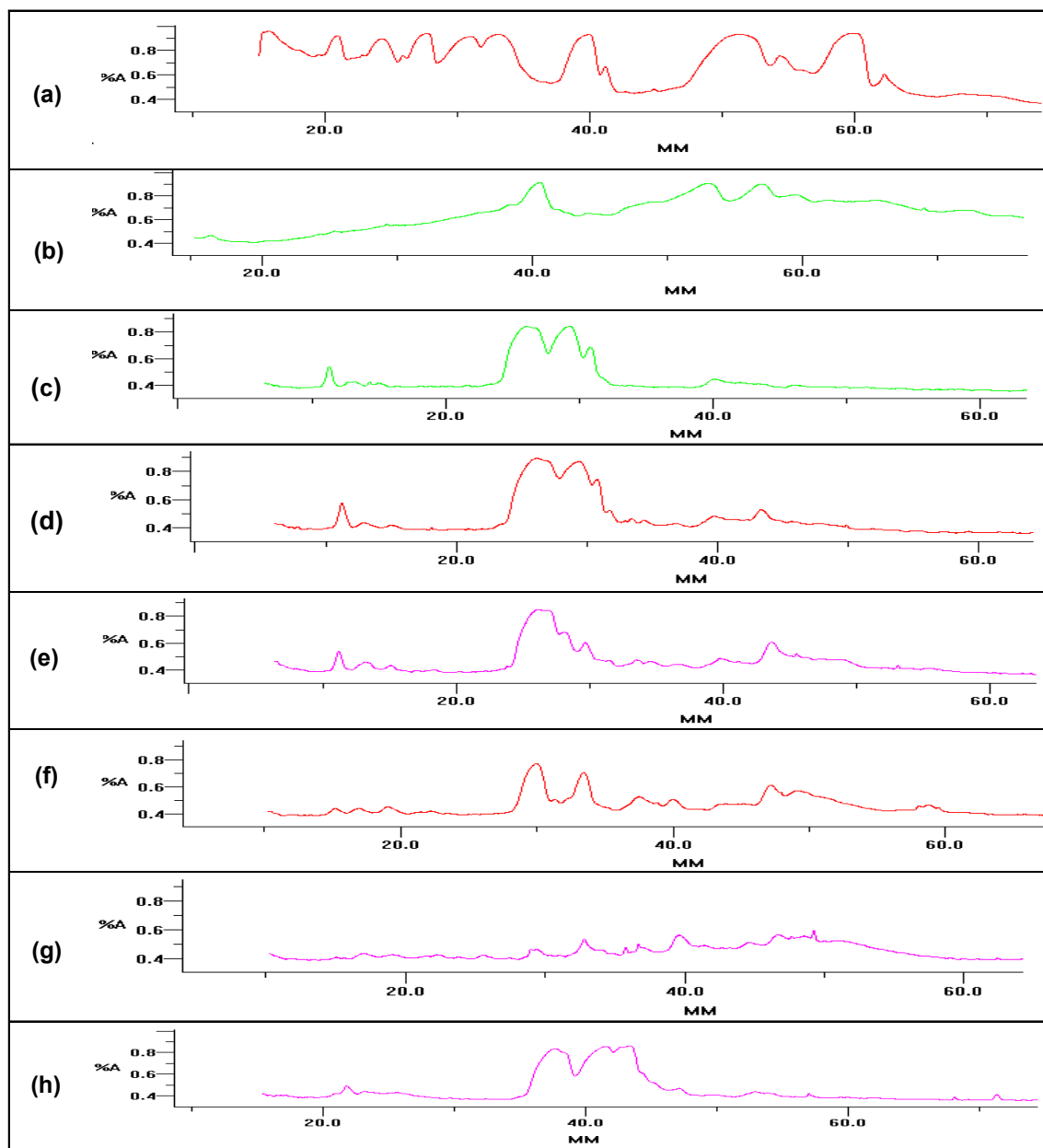
(a) – Padrão de médio PM; (b) – Padrão de baixo PM; (c) – Tempo 0; (d) - um dia; (e) – dois dias; (f) – quatro dias; (g) – seis dias; (h) – Padrão de Caseína (α , β e κ).

Figura 16 – Densitogramas de amostras de leite cru, assepticamente coletado e inoculado como *P. fluorescens* 07 A, incubadas a 4°C.



(a) – Padrão de médio PM; (b) – Padrão de baixo PM; (c) – Tempo 0; (d) - um dia; (e) – dois dias; (f) – quatro dias; (g) – seis dias; (h) – Padrão de Caseína (α , β e κ).

Figura 17 – Densitogramas de amostras de leite cru, assepticamente coletado e inoculado como *P. fluorescens* 07 A, incubadas a 7°C.



(a) – Padrão de médio PM; (b) – Padrão de baixo PM; (c) – Tempo 0; (d) - um dia; (e) – dois dias; (f) – quatro dias; (g) – seis dias; (h) – Padrão de Caseína (α , β e κ).

Figura 18 – Densitogramas de amostras de leite cru, assepticamente coletado e inoculado como *P. fluorescens* 07 A, incubadas a 10°C.

4.3. Fatores de estabilidade de leite UHT

4.3.1. Sedimentos

Os valores médios de sedimentos, durante a estocagem a 37°C, de amostras de leite UHT integral processadas pelo sistema indireto, variaram entre 0,1241 e 0,2567 g L⁻¹. Observou-se um aumento gradual da sedimentação com o aumento do tempo de estocagem. Os maiores valores de massa de sedimentos foram observados com 120 dias de estocagem, ou seja, ao final do período de validade do produto (Figura 19). Os valores médios de sedimentos constatados neste estudo foram inferiores aos obtidos por NEIRA (1986) e por SILVA (2003). A diferença dos resultados obtidos no presente estudo pode estar relacionada ao tipo de tratamento térmico empregado. De acordo com RAMSEY e SWARTZEL (1984) e SILVA (2003), o tipo de tratamento térmico do leite influencia na formação de sedimentos. Em geral, observa-se maior formação de sedimentos no produto obtido pelo sistema direto (SILVA, 2003).

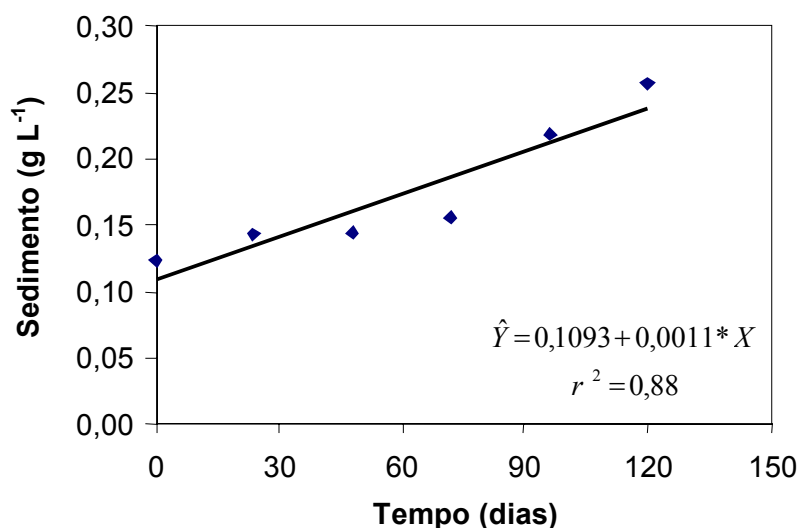


Figura 19 – Evolução da massa de sedimentos em função do tempo de estocagem do leite UHT integral, a 37°C, por 120 dias.

Os valores de sedimentos constatados por Neira (1986), a 21°C, apresentaram variação entre 0,3001 e 0,5370 g L⁻¹ e, a 37°C, entre 0,3001 e 0,724 g L⁻¹. Entretanto, este autor também constatou que durante o período de

estocagem de amostras de leite UHT integral, a 21 e a 37°C, a formação da massa de sedimentos não foi constante e apresentou discreto aumento no transcurso da estocagem, mais pronunciado sob armazenamento a 37°C. Além disso, o autor observou que valores mais elevados de sedimentos foram constatados naquelas amostras coletadas em momentos prévios à limpeza do equipamento, durante o processo de elaboração do produto.

SILVA (2003) constatou que os teores médios de sedimentos, em g L⁻¹, em amostras de leite desnatado, provenientes dos Estados de Goiás, Rio Grande do Sul e São Paulo, foram, respectivamente, de 0,7744, 1,0275 e 1,0925. Na estação chuvosa, a ocorrência de sedimentos no produto foi estatisticamente superior, com média de 1,0533 g L⁻¹, e na estação seca a média foi de 0,9054 g L⁻¹. O autor concluiu que os fatores determinantes para a formação de sedimentos, que apresentaram correlação positiva com a massa de sedimentos, incluíram a desnaturação das soroproteínas e a contagem de células somáticas. Já os fatores com correlação negativa foram os teores de citrato e de uréia no leite cru e de citrato nos leites cru e UHT. Além disso, ele comentou que o fenômeno de sedimentação deve ser avaliado localmente pelas indústrias de laticínios e que esta varia com as alterações das condições de processamento e das condições climáticas. O efeito do tempo de estocagem sobre a formação da massa de sedimentos demonstra a importância do controle do fenômeno de sedimentação para a competitividade industrial, considerando-se que a formação de sedimentos no produto final pode ocasionar a redução da vida de prateleira do produto, levando à rejeição deste pelo consumidor.

4.3.2. Grau de proteólise

O grau de proteólise durante o armazenamento de leite UHT integral, a 37°C, por até 120 dias, foi avaliado, e os maiores valores foram constatados no final do prazo proposto, coincidente com o prazo de validade do produto comercial (Figura 20). Esse resultado indica a presença de atividade residual de proteases resistentes ao tratamento UHT, de origem endógena ou bacteriana. Nenhuma das amostras apresentou sinais de gelificação e todas se mantiveram estáveis ao teste de cocção.

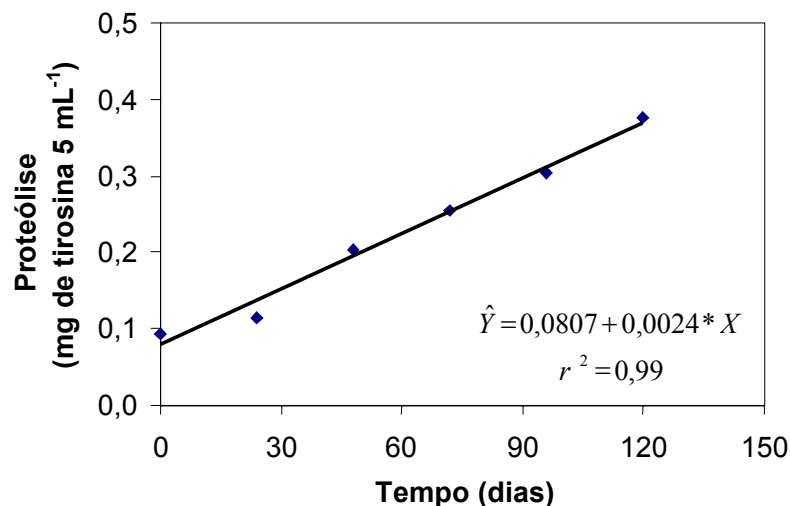


Figura 20 – Evolução do grau de proteólise em função do tempo de estocagem do leite UHT integral, a 37°C, por 120 dias.

O grau de proteólise do leite UHT, constatado por GILLIS et al. (1985), variou em função da qualidade da matéria-prima, sendo significativamente inferior para as amostras com contagens de mesófilos inferiores a 10^4 UFC mL⁻¹. AULDIST et al. (1996) também constataram o aumento gradual do grau de proteólise durante a estocagem de leite UHT, sendo os maiores valores encontrados no produto fabricado com matéria-prima em estágio final de lactação.

Entretanto, KOCAK e ZADOW (1985) observaram que a gelificação em amostras de leite UHT não foi diretamente relacionada com a extensão da proteólise, tanto em amostras recém-processadas quanto em amostras gelificadas. A gelificação do produto foi influenciada pela temperatura, mas não ocorreu gelificação das amostras estocadas a 40 ou a 50°C. Na faixa de temperatura de 20 a 25°C, o fenômeno de gelificação foi observado com períodos de estocagem entre 120 e 150 dias e foi consideravelmente retardado a 2 e a 10°C. Ao contrário, GILLIS et al. (1985) observaram que o tempo para a gelificação não apresentou boa correlação com a qualidade microbiológica do leite cru.

Um grau de proteólise crescente também foi constatado por NEIRA (1986) ao estudar o efeito da temperatura durante o tempo de estocagem de amostras de leite UHT integral, a 21 e a 37°C, sendo que a 37°C, a proteólise

foi mais acentuada. O autor constatou variabilidade no desenvolvimento da proteólise entre as amostras, observando que os valores mais elevados, a 21 e a 37°C, ocorreram no final do tempo de validade do produto. BOOR e NAKIMBUGWE (1998) também constataram um aumento nos valores de tirosina em amostras de leite fluido ultrapasteurizado, provenientes de duas indústrias, durante a estocagem, sugerindo a ocorrência de degradação protéica pós-processamento.

4.3.3. Atividade proteolítica

A atividade proteolítica média de amostras seqüenciais de leite cru, leite pasteurizado e leite UHT foram, respectivamente, 246,7, 19,1 e 11,8 μmol de 4-nitroanilina $\text{L}^{-1} \text{18 h}^{-1}$. A esterilização comercial UHT reduziu, em média, 93,2% da atividade presente no leite cru, indicando ainda a presença de atividade proteolítica residual de origem bacteriana ou endógena. A média das contagens de bactérias mesófilas, psicrotróficas, psicrotróficos proteolíticas e por *Pseudomonas* spp. das amostras de leite cru, destinado ao processamento de leite UHT, coletadas no silo foram, respectivamente, de $5,5 \times 10^6$ UFC mL^{-1} , $3,0 \times 10^6$ UFC mL^{-1} , $8,0 \times 10^5$ UFC mL^{-1} e $1,1 \times 10^6$ UFC mL^{-1} . O valor para mesófilo encontra-se acima do limite proposto pela portaria específica do Ministério da Agricultura para leite refrigerado (BRASIL, 2002b), que é de 10^6 UFC mL^{-1} . A presença de grupos de bactérias potencialmente proteolíticas, constatados nas amostras de leite cru, a exemplo do gênero *Pseudomonas*, capazes de produzir enzimas proteolíticas termoestáveis, sugere que parte da atividade proteolítica residual presente no leite UHT pode ser decorrente da atividade de proteases de bactérias psicrotróficas produzidas durante a estocagem do leite. Entretanto, nas 36 amostras de leite UHT analisadas, referentes a três lotes diferentes, não foi observada a ocorrência de gelificação do produto.

A presença de atividade proteolítica residual em leite UHT, no transcurso da estocagem do produto, também foi constatada por Samuel et al. (1971) ao observarem modificações na distribuição do nitrogênio.

Pode-se considerar que, embora tenha sido detectada a presença de psicrotróficos proteolíticos e de *Pseudomonas*, as contagens entre

10^5 e 10^6 UFC mL⁻¹ não foram suficientes para promover proteólise para a ocorrência de gelificação. De fato, relatos de outros autores indicam que populações maiores de psicotróficos proteolíticos e, ou, de *Pseudomonas* são necessárias para a deterioração do leite UHT. De acordo com LAW et al. (1977), a gelificação do leite UHT por atividade proteolítica de *P. fluorescens* foi dependente da extensão do crescimento deste organismo na matéria-prima e, quando a contaminação foi da ordem de $8,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹, o produto gelificou em oito a dez semanas, enquanto contagens de *P. fluorescens* no leite, em torno de 10^7 UFC mL⁻¹, ocasionaram gelificação em apenas dez a 14 dias.

A adição de proteases purificadas, provenientes de bactérias psicotróficas, ao leite UHT, influenciou na formação do gel durante o período de estocagem (CORRADINI e PECIS, 1979; MITCHELL e EWINGS, 1985).

GRIFFITHS et al. (1988) constataram que a vida de prateleira do leite UHT foi reduzida quando a matéria-prima foi estocada a 6°C, em relação à estocagem a 2°C. Estes autores verificaram que a κ -caseína foi hidrolisada intensamente para para- κ -caseína, de forma semelhante à renina.

Segundo descrição de DATTA e DEETH (2001), apesar de a gelificação ser um processo semelhante à coagulação por renina, alguns aspectos são diferentes, incluindo o baixo grau de especificidade das proteases bacterianas, comparado ao grau de especificidade da renina, que possui alta afinidade pela ligação phe₁₀₅-met₁₀₆ da κ -caseína. Isto causa uma baixa gelificação/coagulação durante o processo de gelificação do leite UHT. Além disso, a extensão da hidrólise da κ -caseína na gelificação do leite UHT é de somente 5 a 10%, enquanto na coagulação do leite por renina, a extensão da hidrólise é de 80 a 90%.

Nesta pesquisa foi possível constatar um aumento de atividade de proteases no leite UHT ao longo do período de validade do produto. Entretanto, foram observados, durante o período de armazenamento, valores variáveis de atividade proteolítica (Figura 21). O coeficiente de determinação desta variável em relação ao tempo foi inferior aos coeficientes observados para as variáveis sedimentos e grau de proteólise em relação ao tempo de estocagem. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por NEIRA (1986), que observou

que o grau de correlação entre a atividade proteolítica com o tempo foi inferior aos coeficientes encontrados para sedimentos e grau de proteólise. Este autor também verificou que os valores de atividade proteolítica apresentaram variações entre as amostras, sendo atenuada nos primeiros dias de estocagem e aumentando com o transcurso do tempo.

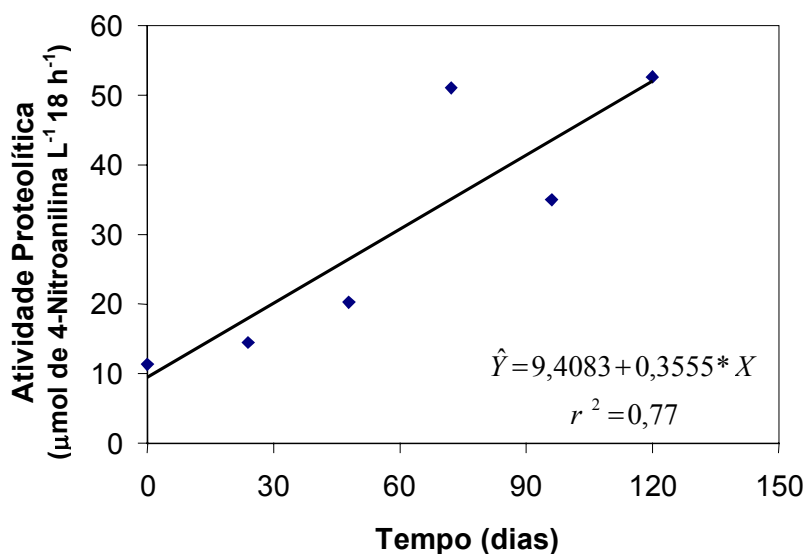


Figura 21 – Evolução da atividade proteolítica em função do tempo de estocagem do leite UHT integral, a 37°C, por 120 dias.

O aumento da atividade proteolítica residual em leite UHT, durante o seu período de estocagem, em decorrência da atividade de plasmina e de proteases bacterianas, foi descrito por DATTA e DEETH (2001). Os autores relataram um aumento de 215% na concentração de ácido siálico livre (ácido N-acetil murâmico), um carboidrato presente na κ -caseína, em amostras de leite UHT durante a estocagem, atribuindo este resultado à atividade de proteases de bactérias psicrotróficas sobre a κ -caseína, com conseqüente liberação de ácido siálico contendo glicomacropeptídeo. Estes resultados foram confirmados por PICARD et al. (1996), os quais constataram uma concentração muito superior do glicomacropeptídeo em leite proteolizado por atividade de protease bacterianas em relação ao leite não-proteolizado. Os autores sugeriram que amostras com um valor igual ou acima de 10 mg L⁻¹ de

glicomacropéptídeo apresentam maior potencial para a ocorrência de proteólise durante estocagem e gelificação prematura.

Uma atividade proteolítica significativamente superior foi constatada por CELESTINO (1996) em leite UHT processado a partir de leite cru previamente estocado sob refrigeração, em relação aos valores encontrados para amostras de leite UHT processadas com matéria-prima não estocada (controles).

5. CONCLUSÕES

Foi observada grande variação na composição das populações mesofílicas predominantes nas amostras de leite cru refrigerado, representativas dos tanques de refrigeração individuais, coletivos e do silo industrial, evidenciada pelos tipos de coágulos obtidos.

Não foi constatada diferença significativa entre as médias das contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) para os grupos de microrganismos avaliados nas amostras de leite cru refrigerado, coletadas em tanques individuais e coletivos. Porém, diferença significativa foi observada entre as médias de contagens das amostras coletadas no silo industrial em relação às amostras coletadas em tanques individuais e coletivos.

Entretanto, ao comparar o percentual de amostras coletadas em tanques individuais e coletivos com contagens microbianas mais elevadas, constatou-se maior percentual nas amostras coletadas nos tanques coletivos. Este resultado sugere que a prática de granelização coletiva é mais susceptível ao comprometimento da qualidade da matéria-prima estocada sob refrigeração. No silo industrial, contagens mais altas foram observadas e em todas as amostras a contagem de mesófilos foi superior a 10^6 UFC mL⁻¹, sugerindo a ocorrência de contaminações adicionais e crescimento bacteriano durante o transporte e estocagem na indústria.

A frequência de isolamento de bactérias psicrótróficas proteolíticas Gram-negativas foi maior e dentre os isolados Gram-negativos identificados, o

gênero *Pseudomonas* foi mais freqüente (45,2%), especialmente a espécie *P. fluorescens*, que representou 39,1% da microbiota Gram-negativa identificada.

Com base na capacidade de produção de proteases, lipases e lecitinases, um grande potencial deteriorador foi observado na microbiota Gram-positiva e Gram-negativa. Entretanto, no grupo de bactérias Gram-negativas não-fermentadoras de glicose, que inclui espécies do gênero *Pseudomonas*, foi constatado um maior percentual de isolados com as três atividades enzimáticas associadas, nas temperaturas avaliadas (6,5, 22 e 35°C), reforçando o seu maior potencial deteriorador.

A capacidade de adesão de bactérias psicrotróficas proteolíticas Gram-negativas e Gram-positivas, em superfície de cupons de aço inoxidável imersos em leite desnatado mantido a 7°C, por 48 horas, variou de 10^2 a 10^5 células cm^{-2} , sendo que os isolados Gram-negativos apresentaram maior número de células aderidas. Esta observação é relevante, considerando que é prevista na legislação a refrigeração do leite cru, pelo sistema de imersão, a 7°C, e a estocagem do leite cru no estabelecimento industrial até 10°C.

A presença de atividade proteolítica residual foi constatada em sobrenadantes de culturas de *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Paenibacillus* e *Bacillus*, após tratamento térmico a 100°C, por 30 segundos. Estes resultados indicam a importância do controle do crescimento de bactérias psicrotróficas proteolíticas produtoras de proteases termorressistentes antes do processamento do leite.

O crescimento de *P. fluorescens* em leite desnatado, estocado a 2, 4, 7 e 10°C, e o grau de proteólise foram dependentes da temperatura e do tempo de estocagem. Maior valor de tirosina foi observado no final da fase logarítmica e no início da fase estacionária máxima de crescimento, quando o número de células foi de, aproximadamente, 10^8 UFC mL^{-1} de leite. A 2 e 4°C, os tempos para que este número fosse alcançado foram respectivamente de dez e de seis dias.

O grau de hidrólise das frações da caseína de leite cru integral, coletado em condições assépticas, por atividade proteolítica de *P. fluorescens* aumentou com a temperatura e com o tempo. A fração κ -caseína foi mais susceptível à

hidrólise, seguida da fração β -caseína e α -caseína. A hidrólise da albumina foi evidente a 7 e a 10 °C. Estes resultados indicam que, mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas para a conservação do leite cru na fonte de produção e no estabelecimento industrial pode ocorrer o comprometimento da qualidade da matéria-prima e, como consequência, dos derivados do leite, incluindo o leite UHT.

O tratamento UHT reduziu, em média, 92% da atividade proteolítica presente nas amostras de leite cru coletadas no silo e usadas como matéria-prima para o seu processamento. Este resultado indica a presença de atividade proteolítica residual mesmo após o tratamento das amostras sob alta temperatura.

Ao longo da estocagem das amostras de leite UHT, a 37°C, apesar do aumento da massa de sedimentos, do grau de proteólise e da atividade proteolítica, não foram constatados indícios de gelificação e instabilidade térmica em nenhuma das amostras. Todas as amostras apresentaram contagem de mesófilos e de esporulados mesofílicos inferior a 1 UFC mL⁻¹, portanto em conformidade com os padrões microbiológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Coletânea de Normas e Planos de Amostragem**, v. 2, p. 1-50, 1985.

ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 828-835, 1975.

ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 823-827, 1976.

ANDRADE, N. J.; AJHO, B. D.; ZOTTOLA, E. A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium*. **Journal of Food Protection** (suplement A 84th Annual Meeting IAMFES, Orlando, FL, july), 1996.

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bactericidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 16, p. 833-887, 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA. **Estatísticas**. Disponível em <<http://www.ablv.org.br/index.cfm?fuseaction=longavida>>. Acesso em 15 de maio de 2003.

AULDIST, M. J. ; COATS, S. J.; SUTHERLAND, B. J.; HARDHAM, J. F.; McDOWELL, G. H.; ROGERS, G. L. Effects of somatic cell count and stage of lactation on the quality and storage life of ultra high temperature milk. **Journal of Dairy Research**, v. 63, p. 377-386, 1996.

AUSTIN, J. W.; BERGERON, G. Development of bacterial in dairy processing lines. **Journal of Dairy Research**, v. 62, p. 509-519, 1995.

BASTIAN, E. D.; BROWN, R. J. Plasmin in milk and dairy products: un update. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 435-437, 1996.

BOOR, K. J.; NAKIMBUGWE, D. N. Quality and stability of 2% fat ultrapasteurized fluid milk products. **Dairy, Food and Environmental Sanitization**, v. 18, p. 78-82. 1998.

BRAMLEY, A. J.; McKINNON, C. H. The microbiology of raw milk. 2.ed. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). **The microbiology of milk**. London, UK: Elsevier Science Publishers, 1990. p. 163-208.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, n. 172, p. 8-13, 20 set. 2002a. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e Oficializa o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, n. 172, p. 13-22, 20 set. 2002b. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria 370, de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do leite UHT (UAT) **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, n. 172, 8 set. 1997. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA**. Brasília: 1980. 116 p.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of microorganisms**. 7.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1994. 375 p.

CAVICCHIOLI, R.; THOMAS, T.; CURMI, P.M.O.C. Cold stress response in *Archaea*. **Extremophiles Life Under Extreme Conditions**, v. 4, p. 321-331, 2000.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. Reconstituted uht-treated milk: effects of raw milk, powder quality and storage conditions of uht milk on its physico-chemical attributes and flavor. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 129-140, 1997.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 51, p. 59-63, 1996.

- CHAMPAGNE, C. P.; LAING, R. R.; ROY, D.; MAFU, A. A.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 1-30, 1994.
- CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 255-275, 2003.
- CHESSA, J-P. ; PETRESCU, I. BENTAHIR, M.; BEEUMEN, J. V.; GERDAY, C. Purification, physico-chemical characterization and sequence of a heat labile alkaline metalloprotease isolate from a psychrophilic *Pseudomonas* species. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1479, p. 265-274, 2000.
- COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal Dairy Research**, v. 64, p. 157-160, 1981.
- CORRADINI, C.; PECIS, P. P. Proteolytic activity in UHT-sterilized milk. **Journal of Dairy Research**, v. 46, p. 227-229, 1979.
- COSTA, L. M.; GÓMEZ F. S.; MOLINA, L. H. C.; SIMPSON, R. R.; ROMERO, A. M. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 52, p. 1-13, 2002.
- COSTA, L. M. ; GÓMEZ, M. F.; MOLINA, L. H.; ROMERO, A. Cinética del crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* en leche cruda a temperaturas de refrigeración. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, p. 1-10, 2001.
- COSTERTON, J. W. ; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.
- COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 172-207, 1982.
- COUSIN, M. A.; MARTH, E. H. Lactic acid production by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* in milk precultured with psychrotrophic bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 40, p. 406-410, 1977.
- COUSINS, C.; SHARPE, M. E.; LAW, A. The bacteriological quality of milk for cheddar cheesemaking. **Dairy Industries International**, v. 42, p. 12-17, 1977.
- CRIADO, M. T.; SUÁREZ, B.; FERRERÓZ, C. M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, v. 48, p. 123-126, 1994.
- DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk – a review. **Institution Chemical of Engineers**, v. 79, p. 197-210, 2001.

- DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 130-138, 2003.
- DUNKLEY, W. L.; STEVENSON, K. E. Ultra-high temperature processing and aseptic packaging of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2192-2202, 1987.
- ELLIS, B. R.; MARTH, E. H. Growth of *Pseudomonas* or *Flavobacterium* in milk reduced yield of cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, v. 47, p. 713-716, 1984.
- ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p. 99-106, 2000a.
- ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Journal International Dairy**, v. 10, p. 325-331, 2000b.
- ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDENHAUG, J.; MOLIN, G. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 829-834, 1998.
- ENRIGHT, E.; BLAND, P. B.; NEEDS, E. C.; KELLY, A. L. Proteolysis and physicochemical changes in milk on storage as affected by UHT treatment, plasmin activity and KIO₃ addition. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 581-591, 1999.
- EWINGS, K. N.; O'CONNOR, R. E.; MITCHELL, G. E. Proteolytic microflora of refrigerated raw milk in south east Queensland. **The Australian Journal of Dairy Technology**, p. 65-68, 1984.
- FAIRBAIRN, D. J.; LAW, B. A. Protease of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, v. 53, p. 139-177, 1986.
- FAJARDO-LIRA, C. E.; NIELSEN, S. S. Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 901-908, 1998.
- FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 53, p. 830-841, 1997.
- FOX, P. F. Heat-induced changes in milk preceding coagulation. **Journal Dairy Science**, v. 64, p. 2127-2137, 1981.
- FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 1379-1400, 1989.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. 16.ed. In: MARSHALL, R. T. (Ed.) **Standard methods for the examination of dairy products**. New York: APHA, 1992. p. 271-286.

FROEDER, E. **Qualidade microbiológica e físico química do leite cru da bacia leiteira de Viçosa-MG**. 1985. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1985.

GARCÍA-ARMESTO, M. R.; SUTHERLAND, A. D. Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 261-270, 1997.

GERDAY, C. ; AITTALEB, M.; ARPIGNY, J. L.; BAISE, E.; CHESSA J-P.; GARSOUX, G.; PETRESCU, I.; FELLER, G. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1342, p. 119-131, 1997.

GERDAY, C. ; AITTALEB, M.; BENTAHIR, M.; CHESSA, J-P.; CLAVERIE, P.; COLLINS, T.; D' AMICO, S.; DUMONT, J.; GARSOUX, G.; GEOLETT, D.; HOYOUX, A.; LONHIENNE, T.; MEUWIS, M. A.; FELLER, G. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 103-107, 2000.

GILLILAND, S. E.; EWELL, H. R. Influence of combinations of *Lactobacillus lactis* and potassium sorbate on growth of psychrotrophs in raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 974-980, 1983.

GILLIS, W. T.; CARTLEDGE, M. F.; RODRIGUES, I. R.; SUAREZ, E. J. Effect of raw milk quality on ultra-high temperature processes milk. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2875-2879, 1985.

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A. Purification and characterization of intracelullular aminopeptidase form *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948. **Journal of Dairy Science**. v. 78, p. 44-54, 1995.

GOVERDE, R. L. ; HUIS IN'T VELT, J. H.; KUSTERS, J. G; MOOI, F. R. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 555-569, 1998.

GRIEVE, P. A.; KITCHEN, B. J. Proteolysis milk: the significance of protease originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacterial and natural milk protease on casein. **Journal of Dairy Research**, p. 101-112, 1985.

GRIFFITHS, M. W. ; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D. Effect of low-temperature storage on the bacteriology quality of raw milk. **Food Microbiology**, v. 4, p. 285-291, 1987.

GRIFFITHS, M. W. Effect of temperature and milk fat on extracellular enzyme synthesis by psychrotrophic bacteria during growth in milk. **Milchwissenschaft**, v. 44, p. 539-543, 1989.

GRIFFITHS, M. W.; PHILIPS, J. D.; MUIR, D. D. Thermostability of proteases and lipases from a number of species of psychotrophic bacteria of dairy origin. **Journal Applied Bacteriology**, v. 50, p. 289-303, 1981.

GRIFFITHS, M. W. ; PHILLIPS, J. D.; WEST, I. G.; MUIR, D. D. The effect extend low - temperature storage of raw milk on the quality of pasteurized and UHT milk. **Food Microbiology**, v. 5, p. 75-87, 1988.

GUINOT-THOMAS, P.; AMMOURY, M. A.; LAURENT, F. Effects of storage conditions on the composition of raw milk. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 211-223, 1995.

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

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, p. 8-18, 1995.

HULL, M. E. Studies on milk proteins. II Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. **Journal Dairy Science**, v. 30, p. 881-894, 1947.

HUMBERT, G.; BRUN-BELLUT, J.; MORA, T.; ALAIS, C. Proteinase Activity in bovine raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 2271-2277, 1982.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION – IDF. **Milk and milk products - Methods of sampling**. Brussels, 1985. 19 p. (International Standard, 50B)

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5.ed. New York: Chapman & Hall, 1996. 661 p.

JENSEN, S. E. ; PHILLIPPE, L.; TSENG, T. J.; STEMKE, G. W.; CAMPBELL, J. N. Purification and characterization of exocellular proteases produced by a clinical isolate and a laboratory strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 26, p. 77-86, 1980.

JEONG, D. K.; FRANK, J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 576-586, 1994.

JUFFS, H. S. Proteolysis detection in milk. I. Interpretation of tyrosine value data for raw milk supplies in relation to natural variation, bacterial counts and other factors. **Journal of Dairy Research**, v. 40, p. 371-381, 1973a.

JUFFS, H. S. Proteolysis detection in milk. II The effect of preincubation of raw and laboratory pasteurized bulk milk samples on tyrosine value and its relationship with bacterial populations. **Journal of Dairy Research**, v. 40, p. 383-392, 1973b.

JUFFS, H. S. Proteolysis detection in milk. III Relationships between bacterial populations tyrosine value and organoleptic quality during extended cold storage of milk and cream. **Journal of Dairy Research**, v. 42, p. 31-41, 1975.

JUFFS, H. S.; BABEL, F. J. Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactic cultures in milk stored at low temperature. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 1613-1619, 1975.

KOÇAK, H. R.; ZADOW, J. G. Age gelation of UHT whole milk as influenced by storage temperature. **The Australian Journal of Dairy Technology**, n. 1, p. 14-21, 1985.

KODA, N.; AOKI, M.; KAWAHARA, H.; YAMADE, K.; OBATTA, H. Characterization and properties of intracellular proteins after cold acclimation of the ice-nucleating bacterium *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*) IFO12686. **Cryobiology**, v. 41, p. 195-203, 2000.

KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; STEENSON, L. R.; LADISCH, M. R. Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 4125-4136, 1991a.

KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; STEENSON, L. R.; LADISCH, M. R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3275-3283, 1991b.

KOHLMANN, K. L.; NIELSEN, S. S.; LADISCH, M. R. Effects of a low concentration of added plasmin on ultra-high temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1151-1156, 1991c.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-684, 1970.

LAW, B. A. Review of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, v. 46, p. 573-588, 1979.

LAW, B. A.; ANDREWS, A. T.; SHARPE, A. E. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. **Journal of Dairy Research**, v. 44, p. 145-148, 1977.

LE MAGREX, E.; BRISSET, L.; JACQUELIN, L. F.; CARQUIN, J.; BONNAVEIRO, N. Susceptibility to antibacterials and compared metabolism of suspended bacteria versus embedded bacteria in biofilms. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, v. 2, p. 89-95, 1994.

LINDEN, G.; HUMBERT, G.; DESNOUVEAUX, R.; PICARD, J. Applications de la dissolution complète du lait à la détermination de quelques activités enzymatiques. **Le Lait**, v. 62, p. 209-219, 1982.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. A. Comparison of extracellular proteases from three psychrotrophic strains of *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Genetic Applied Microbiol**, v. 209, p. 209-225, 1992.

MARTINS, A. D. O. **Eficiência do ácido peracético sobre esporos de *Bacillus sporothermodurans***. 2001. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

MARTINS, M. L. **Diversidade de bactérias psicotróficas proteolíticas de leite e presença do gene que codifica metaloprotease alcalina**. 2003. 51 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

MATTA, H.; PUNJ, V. Isolation and identification of proteolytic psychrotrophic sporeforming bacteria from milk. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 49, p. 695-699, 1996.

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

McPHERSON, A. V.; KITCHEN, B. J. The proteins and lipids of the aqueous phase of butter. **The Australian Journal of Dairy Techonology**, n. 1, p. 17-20, 1981.

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

MITCHELL, G. E.; EWINGS, K. N. Quantification of bacterial proteolysis causing gelation in UHT-treated milk. **New Zeland Journal of Dairy Science and Technology**, v. 20, p. 65-76, 1985.

MITCHELL, G. E.; SYMONS, M. H.; EWINGS, K. N. Quantification of bacterial proteolysis in milk - Effects of added and secreted protease in pasteurized milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, n. 2, p. 70-73, 1989.

MITTELMAN, M. W. Struture and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2760-2764, 1998.

MUIR, D. D. The shelf-life of dairy products: 3. Factors influencing intermediate and long life dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, p. 67-72, 1996.

MURPHY, S. C.; BOOR, K. J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v. 20, p. 606-611, 2000.

MURPHY, S. C.; KOZLOWSKI, S. M.; BANDLER, D. K.; BOOR, K. Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygiene monitoring for trouble-shooting fluid milk shelf-life problems. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 817-820, 1998.

NEIRA, M. R. P. **Efecto de la actividad de proteasas sobre la estabilidad de leches uht durante su almacenamiento**. 1986. 163 f. Disertación (M.S. en Ciencias y Tecnología de la Leche) – Universidad Austral de Chile, Valdivia, 1986.

NEUMEYER, K.; ROSS, T.; McMEEKIN, T. A. Development of a predictive model to describe the effects of temperature and water activity on the growth of spoilage pseudomonads. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, p. 45-54, 1997.

OLIVEIRA L. C.; GOMES, M. F.; VELLOSO, C. R. V. Modernização da Legislação Sanitária Federal sobre Leite e Derivados. In: CASTRO, M. C. D.; PORTUGAL, J. A. B. **Perspectivas e Avanços em Laticínios**. Juiz de Fora. EPAMIG. Centro Tecnológico da Zona da Mata, ILCT, 2000. 278 p.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas**. 1999. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

PATEL, T. R.; BARTLETT, F. M.; HAMID, J. Extracellular heat-resistant proteases of psychrotrophic pseudomonads. **Journal of Food Protection**, v. 46, p. 90-94, 1983.

PICARD, C.; PLARD, I.; COLLINI, J. C. Application of the inhibition ELISA method to the study of proteolysis caused by heat-resistant *Pseudomonas* protease specific towards Kappa-casein in heat milk. **Milchwissenschaft**, v. 51, p. 438-442, 1996.

POLITIS, I.; BARBANO, D. M.; GOREWIT, R. C. Distribution of plasminogen and plasmin in fractions of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 900-926, 1992.

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

RAMSEY, J. A.; SWARTZEL, K. R. Effect of ultra-high-temperature processing and storage conditions on rates of sedimentation and fat separation of aseptically packaged milk. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 257-262, 1984.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.

RECIO, I. et al. Characterization of peptides produced by action of psychrotrophic protease on κ -casein. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 625-630, 2000.

RICHTER, R. The effect of psychrotrophic bacteria on cheese manufacture. **American Dairy Review**, v. 41, p. 48-49, 1979.

RIOS, H. Tetra Pak. São Paulo, 2003. Mercado Lácteo.ppt, 1 disquete, 3 1/2 pol. Power point 2000.

RUSSEL, N. J. Cold adaptation of microorganisms. **Philosophical Transaction of the Royal Society of London. Series B: Biological Science**, v. 326, p. 608-611, 1990.

RUSSEL, N. J. Psychrophilic bacteria - molecular adaptations of membrane lipids. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118A, p. 489-493, 1997.

RUSSEL, R. J.; GERIKE, U.; DANSON, M. J.; HOUGH, M. J.; TAYLOR, G. L. Strutural adaptations of the cold-active citrate synthase from an Antartic bacterium. **Structure (London, England)**, v. 6, p. 351-361, 1998.

RYSER, E. Microorganisms of importance in raw milk. **Michigan Dairy Review**, v. 8, p. 7-9, 1999.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science e Technology**, v. 8, p. 35-37, 1997.

S.A.S. INSTITUTE. **USER'S GUIDE: STATISTICS**. VERSION 6.1.2. CARY, U.S.A. North Carolina State University, 1996. CD-ROM.

SAMUEL, R.; WEAVER, W. V.; GAMMACK, D. B. Changes on storage in milk processed by ultra-high-temperature sterilization. **Journal of Dairy Research**, v. 38, p. 323-332, 1971.

SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G. D.; CONserton, J. W.; DAVIES D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 1140-1154, 2002.

SCHOKKER, E. P.; van BOEKEL, M. A. J. S. Production, purification and partial characterization of the extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 265-271, 1997.

SHIRTLIFF, M. E.; MADER, J. T.; CAMPER, A. K. Molecular interactions in biofilms. **Chemistry and Biology**, v. 9, p. 859-871, 2002.

SILVA, E. O. T. R. **Leite longa vida**: avaliação de alguns parâmetros de qualidade dos leites cru e processado. 2001. 130 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplica à Zonoses) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT**: Fatores determinantes para sedimentação e gelificação. 2003. 147 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SILVA, P. H. S.; ALMEIDA, M. C. F. Estabilidade térmica do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 53, p. 157-163, 1998.

- SILVEIRA, I. A. ; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D.; BARRIOS, B. E. B. Verificación de las actividades proteolíticas y lipolíticas de la flora microbiana aislada de la leche cruda tipo B refrigerada. II - Microorganismos psicrótrófos. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v. 41, p. 85-89, 1999.
- SOLER, A. ; PONSELL, C.; PAZ, M. D.; NUÑEZ. The microbiological quality of milk produced in the Balearic Islands. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 69-74, 1995.
- SPECK, M. L.; ADAMS, D. M. Heat resistant proteolytic enzymes from bacterial sources. In: Symposium: impact of heat stable microbial enzymes in food processing. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 787-789, 1975.
- SPLITTSOESSER, D. F. Direct microscopic count. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSOESSER, D. F. (Eds.) **Compendium of methods to the microbiological examination of foods**. 3.ed. cap. 5, Washington: APHA, 1992. p. 97-104.
- STEAD, D. Production of extracellular lipases and protease during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in whole milk. **Journal of Dairy Research**, v. 54, p. 535-543, 1987.
- STOFER, W.; HICKS, C. L. Pernicious psychrophiles - Their effect on cheese yield and composition. **Cultured Dairy Production Journal**, v. 18, p. 11-14, 1983.
- SUÁREZ, B.; FERREIRÓS, C. M.; CRIADO, M. T. Adherence of psychrotrophic bacteria to dairy surface. **The Journal of Dairy Research**, v. 59, p. 381-388, 1992.
- SVINGOR, A.; KARDOS, J.; HAJDÚ, I.; NÉMETH, A.; ZÁVODSZKY, P. A Better enzyme to cope with cold. Comparative flexibility studies on psychrotrophic, mesophilic, and thermophilic IPMDHs. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 28121-28125, 2001.
- TERADA, A.; TANAKA, S.; UCHIDA, K. Studies on psychrotrophic bacteria of bovine milk, proteolytic and lipolytic activities of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk. **Bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College**, v. 31, p. 222-228, 1982.
- TETRA PAK. **Dairy processing handbook**. Lund: Sweden, 1996. 1CD-ROM.
- THIELMANN, C. **Avaliação das características da qualidade e prazo de validade de leite tipo "A"**. 1994. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.
- THOMAS, S. B.; DRUCE, R. G.; DAVIES, A. The significance of psychrotrophic bacteria in raw milk. **Dairy Industries**, n. 1, p. 27-32, 1966.
- URAZ, G.; CITAK, S. The isolation of *Pseudomonas* and other gram (-) psychrotrophic bacteria in raw milks. **Journal Basic of Microbiology**, v. 38, p. 129-134, 1998.

- VANDERZANT, C. E.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1992. 1919 p.
- WALKER, S. J. Major spoilage micro-organisms in milk and dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 41, p. 91-92, 1988.
- WALSTRA, P.; JENNES, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Editorial Acirba, 1984. 423 p.
- WANG, L.; JAYARAO, B. M. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1421-1429, 2001.
- WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S. S.; RALYEA, R.; BOOR, J. K. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2085-2095, 2000.
- WIKING, L.; FRØST, M. B.; LARSEN, L. B.; NIELSEN, J. H. Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. **Milchwissenschaft**, v. 57, p. 190-194, 2002.
- WONG, A. C. L. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2765-2770, 1998.
- WOUTERS, J. A.; ROMBOUTS, F. M.; KUIPERS, O. P.; de VOS, W. M.; ABEE, T. The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 165-173, 2000.
- ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilm formation: A new problems for the food industry? **Food Technology**, v. 48, p. 107-114, 1994.
- ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 145-153, 1997.

APÊNDICE A

Análise de Variância

Quadro 1A – Resumo da análise de variância para a contagem de mesófilos no leite cru refrigerado proveniente de tanques individuais, coletivos e silo industrial

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tanque	2	2,6907*
Resíduo	46	0,5672
Total	48	

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 2A – Resumo da análise de variância para a contagem de psicotróficos no leite cru refrigerado proveniente de tanques individuais, coletivos e silo industrial

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tanque	2	5,2307*
Resíduo	46	1,2064
Total	48	

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 3A – Resumo da análise de variância para a contagem de *Pseudomonas* spp. no leite cru refrigerado proveniente de tanques individuais, coletivos e silo industrial

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tanque	2	6,8614*
Resíduo	46	1,7561
Total	48	

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 4A – Resumo da análise de variância para a contagem de mesófilos proteolíticos no leite cru refrigerado proveniente de tanques individuais, coletivos e silo industrial

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tanque	2	1,7766*
Resíduo	39	0,5472
Total	41	

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Quadro 5A – Resumo da análise de variância para a contagem de psicotróficos proteolíticos no leite cru refrigerado proveniente de tanques individuais, coletivos e silo industrial

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tanque	2	4,5912*
Resíduo	36	1,1754
Total	38	

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

APÊNDICE B

Análise de Regressão

Quadro 1B – Resumo da análise de regressão para o grau de proteólise em função do tempo de estocagem do leite UHT integral, a 37°C, por 120 dias

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tempo	1	0,1747*
Falta de ajuste	4	0,0005 ^{ns}
Resíduo (Erro)	12	0,0022
Total	17	

* Significativo a 5% de probabilidade.

^{ns} Não-significativo a 5% de probabilidade.

Quadro 2B – Resumo da análise de regressão para a taxa de sedimentação em função do tempo de estocagem do leite UHT integral, a 37°C, por 120 dias

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tempo	1	0,0347*
Falta de ajuste	4	0,0014 ^{ns}
Resíduo (Erro)	12	0,0011
Total	17	

* Significativo a 5% de probabilidade.

^{ns} Não-significativo a 5% de probabilidade.

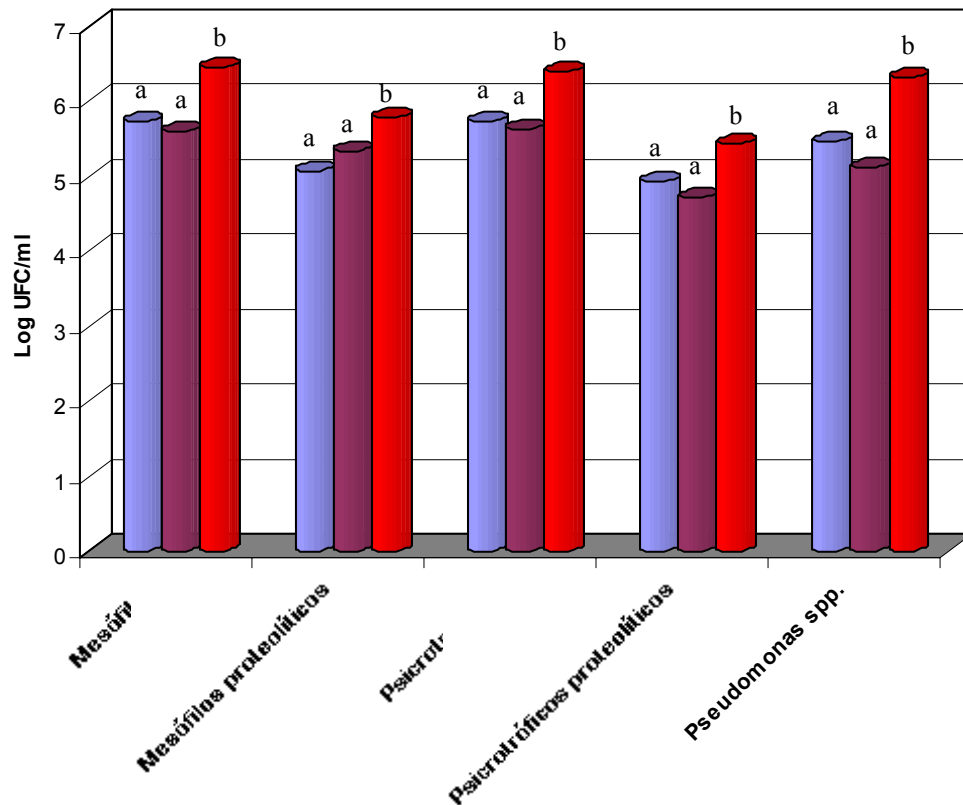
Quadro 3B – Resumo da análise de regressão para a atividade proteolítica em função do tempo de estocagem do leite UHT integral, a 37°C, por 120 dias

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
Tempo	1	3822,4828*
Falta de ajuste	4	285,8434 ^{ns}
Resíduo (Erro)	12	338,5308
Total	17	

* Significativo a 5% de probabilidade.

^{ns} Não-significativo a 5% de probabilidade.

APÊNDICE C



Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, a 5%, pelo teste de Tukey.

Figura 1C – Logaritmo da média do número de unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹) de microrganismos mesofílos, mesofílos proteolíticos, psicrófilos, psicrófilos proteolíticos e de *Pseudomonas* spp., em amostras de leite cru refrigeradas, coletadas em tanques de refrigeração, individuais (□), coletivos (■) e no silo industrial (■).