

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DO SUDESTE DE MINAS GERAIS – CAMPUS RIO POMBA**

SCARLET OHANA DA SILVA GANDRA

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS
ISOLADAS DE LEITE CRU REFRIGERADO E SEU EFEITO SOBRE
AS CASEINAS**

RIO POMBA

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Jofre Moreira – IFET/RP
Bibliotecária: Tatiana dos Reis Maciel CRB 6 / 2711

G195a Gandra, Scarlet Ohana da Silva.
 Atividade proteolítica de bactérias psicrotróficas isoladas do leite cru refrigerado e seu efeito sobre as caseínas. / Scarlet Ohana da Silva Gandra. – Rio Pomba, 2018.
 39f. : il.
 Orientador: Prof. Dsc. Maurilio Lopes Martins.

Trabalho de Conclusão de Curso em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba.

1. Alimentos. 2. Leite. 3. Leite cru - qualidade microbiológica I. Martins, Maurilio Lopes (orient.). II. Título.

CDD: 637.12

SCARLET OHANA DA SILVA GANDRA

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS
ISOLADAS DE LEITE CRU REFRIGERADO E SEU EFEITO SOBRE
AS CASEINAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba, como requisito parcial para a conclusão do Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Maurilio Lopes Martins

Co-orientadores:

Aurélia Dornelas de Oliveira Martins

Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

RIO POMBA

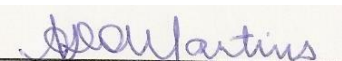
2018

SCARLET OHANA DA SILVA GANDRA

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS
ISOLADAS DE LEITE CRU REFRIGERADO E SEU EFEITO SOBRE
AS CASEINAS**

Trabalho de Conclusão apresentado ao Campus Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, como parte das exigências do curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

APROVADA: 06 de dezembro de 2018.


Prof. Aurélia Dornelas de Oliveira Martins, D.Sc.

Coorientadora


Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, D.Sc.

Coorientadora


Prof. Maurilio Lopes Martins, D.Sc.

Orientador

*Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio
incondicional.*

*“É que tem mais chão nos meus olhos do que
cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos
meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais
estrada no meu coração do que medo na minha
cabeça.” — Cora Coralina*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me manter firme nesta jornada.

Aos meus pais Gilson e Rosimarie por me apoiarem nos momentos mais difíceis e por sempre estarem à disposição me ajudando em cada momento.

As minhas Irmãs e sobrinhas por fazerem parte da minha Vida!

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro
Ao prof^o Maurilio Lopes Martins, por aceitar a orientação e pelo auxílio no desenvolvimento de toda a
Pesquisa, sendo sempre atencioso e prestativo em todos os momentos.*

*À professora Aurélia Dornelas de Oliveira Martins e à Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto,
pesquisadora da Epamig, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e pelas sugestões oferecidas.*

À Patrícia Rodrigues Condé em especial pelo apoio na condução da pesquisa. Obrigado!

*Aos amigos do Laboratório Jonathan e Renata por me ajudarem sempre que precisei, mesmo sendo chata
em alguns momentos. Obrigada pela Paciência!*

*À todos os professores responsáveis pelo enriquecimento dos conhecimentos durante todo o período de
formação.*

*À Jéssica, ao John e ao Fábio, tenho que agradecer pelas conversas e momentos de descontração
compartilhados. Obrigada por fazerem parte dos risos e dos choros que esse trabalho me proporcionou.*

*À Crisley por ser minha amiga e conselheira nos momentos de desespero, o meu muito obrigado!
Quero agradecer também à Ana Cristina e ao Luiz Guilherme por fazerem parte da minha vida
acadêmica. Aprendi muito com vocês.*

Aos amigos que fiz ao longo desta jornada.

*Ao Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba pela infraestrutura oferecida
para o desenvolvimento da pesquisa. E Obrigada por me acolher nestes sete anos de estudo.*

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS ISOLADAS DE LEITE CRU REFRIGERADO E SEU EFEITO SOBRE AS CASEINAS

Resumo Geral

Scarlet Ohana Da Silva Gandra

Dezembro, 2018

Orientador: Professor Maurilio Lopes Martins

A qualidade do leite está relacionada diretamente com as condições higiênicas em que o produto é obtido. A conservação do leite cru sob refrigeração favorece a multiplicação dos microrganismos psicotróficos contaminantes, produtores de enzimas proteolíticas termorresistentes. Espécies do gênero *Pseudomonas* são relatadas como os psicotróficos de maior frequência no leite cru refrigerado. Objetivou-se avaliar a atividade proteolítica das bactérias psicotróficas contaminantes isoladas de leite cru refrigerado granelizado e o efeito deletério das mesmas sobre as caseínas. Empregou-se para determinação da atividade proteolítica o método da azocaseína e para demonstração da degradação das caseínas do leite a eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. A atividade proteolítica de 20 isolados bacterianos foi avaliada em caldo TYEP, a 4,0 °C, por 1, 2, 5 e 10 dias. Os resultados encontrados demonstraram que o isolado 6, *Pseudomonas fluorescens*, apresentou a maior atividade proteolítica ($p < 0,05$) em caldo TYEP e os demais isolados foram menos proteolíticos ($p > 0,05$). Verificou-se também que o tempo de incubação influenciou a atividade proteolítica ($p < 0,05$), sendo esta maior após 10 dias de incubação. As espécies de gêneros diferentes isoladas de leite cru como: *P. fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas luteola*, *Acinetobacter*

junni/johnsonni, *Aeromonas hydrophyla/caviae* e *Burkholderia cepacia* foram utilizadas para avaliação da hidrólise das caseínas. Os isolados foram incubados em 100 mL de leite pasteurizado e armazenados a 7,0 °C, por 2 e 4 dias. *P. fluorencens*, codificado como isolado 6, apresentou maior atividade proteolítica a 4,0 °C. Os resultados demonstraram ainda que com dois dias *P. fluorencens*, *A. baumannii* e *B. cepacia* hidrolisaram as caseínas. Após quatro dias de incubação, *P. fluorencens*, *S. maltophilia*, *P. luteola* e *B. cepacia* apresentaram maior degradação dessas proteínas. Portanto a qualidade do leite está diretamente relacionada á contagem de microrganismos psicotróficos e a atividade proteolítica dessa microbiota, uma vez que a produção de proteases termorresistentes ocasiona muitos problemas tecnológicos para a indústria de laticínios.

Palavras- chave: Leite, Granelização, Psicotróficos, Proteólise.

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF PSYROTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM REFRIGERATED RAW MILK AND ITS EFFECT ON CASEINS

Abstract

Scarlet Ohana Da Silva Gandra

December, 2018

Adviser: Professor Maurilio Lopes Martins

The quality of milk is directly related to the hygienic conditions in which the product is obtained. The conservation of raw milk under refrigeration favors the development of the contaminating psychrotrophic microorganisms, which are the producers of thermoresistant proteolytic enzymes. Species of the genus *Pseudomonas* are reported as the most frequent psychrotrophs in refrigerated raw milk. The objective of this study was to evaluate the proteolytic activity of contaminant psychrotrophic bacteria isolated from bulk refrigerated raw milk and the deleterious effect of them on caseins. For determination of the proteolytic activity, the azocasein method was used and for demonstration of the degradation of milk caseins, the SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis was used. The proteolytic activity of 20 bacterial isolates was evaluated in TYEP broth at 4.0 °C for 1, 2, 5 and 10 days. The results showed that the isolate 6, *Pseudomonas fluorescens*, had the highest proteolytic activity ($p < 0.05$) in TYEP broth and the other isolates were less proteolytic ($p > 0.05$). It was also found that the incubation time influenced the proteolytic activity ($p < 0.05$), which was higher after 10 days of incubation. The species of different genera isolated from raw milk, such as: *P. fluorencens*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas luteola*, *Acinetobacter junni/johnsonni*, *Aeromonas hydrophyla/caviae* and *Burkholderia cepacia* were used to evaluate casein hydrolysis. The isolates were incubated in 100 mL of pasteurized milk and stored at 7.0 °C for 2 and 4 days. *P. fluorencens*, encoded as isolated 6, presented

higher proteolytic activity at 4.0 °C. The results further demonstrate that with two days *P. fluorencens*, *A. baumannii* and *B. cepacia* hydrolyzed the caseins. After four days of incubation, *P. fluorencens*, *S. maltophilia*, *P. luteola* and *B. cepacia* showed higher degradation of these proteins. Therefore, milk quality is directly related to the count of psychrotrophic microorganisms and the proteolytic activity of this microbiota, since the production of thermoresistant proteases causes many technological problems for the dairy industry.

Keywords: Milk, Bulk, Psychrotrophic, Proteolysis.

Sumário

Dedicatória	V
Agradecimentos	VII
Resumo Geral	VIII
Abstrat	X
Súmario	IX
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	2
2.1 Histórico da Produção de Leite no Brasil	2
2.2 Granelização de Leite Cru no Brasil	3
2.3. Microrganismos Psicotróficos Presentes no Leite	5
2.4 Capacidade Deteriorante da Microbiota Psicotrófica Contaminante em Leite Cru e Problemas Tecnológicos para a Indústria de Laticínios	7
2.5. Detecção de Proteólise do Leite	9
Referências Bibliográficas	11
CAPÍTULO 1	17
Resumo	18
Autores	19
Abstrat	19
Referências Bibliográficas	26
CAPÍTULO 2	29
Resumo	30
Autores	30
Abstrat	31
Referências Bibliográficas	37

1. INTRODUÇÃO GERAL

O leite tem papel importante na alimentação humana pelo seu alto valor nutricional, sendo rico em lactose, proteína, gordura e em outros constituintes essenciais como vitaminas e minerais. Portanto, é um ótimo substrato para a multiplicação de vários grupos microbianos, desejáveis e indesejáveis (SOUZA et al., 2009; MENEZES et al., 2014).

A qualidade do leite *in natura* é influenciada por vários fatores, entre os quais destacam-se os zootécnicos associados ao manejo, alimentação, potencial genético dos rebanhos e aqueles relacionados à sua obtenção e armazenamento.

No Brasil, a qualidade do leite cru, em geral, é insatisfatória, pois o mesmo apresenta altas contagens de microrganismos psicotróficos, mesófilos e coliformes, sendo este um indicativo de deficiência dos procedimentos higiênicos sanitários na cadeia produtiva (MATSUBARA et al., 2011; ALMEIDA et al., 2016).

Desta forma, os principais grupos microbianos deterioradores contaminantes comumente encontrados no leite são dos grupos mesófilos aeróbios e psicotróficos, esse último grupo caracterizado pela capacidade de multiplicar em temperaturas de refrigeração entre 0,0 °C e 7,0 °C, independente de sua temperatura ótima de crescimento (SANTOS et al., 2013).

A ocorrência dessas bactérias em leite cru é estudada em muitos países, considerando a dificuldade de controlar a sua multiplicação durante o armazenamento do leite sob refrigeração. Essa microbiota é causa de muitos problemas de qualidade do leite e de seus derivados e perda de rendimento na indústria laticínica (JAY, 2005; MENEZES et al., 2014).

A contaminação do leite cru por bactérias psicotróficas é considerada um fator crítico que influencia na manutenção da qualidade do leite refrigerado. Ressalta-se que *Pseudomonas* é o gênero predominante no leite armazenado a 4,0 °C, por mais de três dias (COSTA, 2014; BATISTA, 2015).

Pseudomonas, principalmente a espécie *Pseudomonas fluorescens*, são apontadas como a causa de diversos defeitos em produtos lácteos. Esta espécie, em função da predominância, é frequentemente selecionada como um microrganismo

modelo, para estudos de deterioração em leite por degradação proteica (OLIVEIRA et al., 2015).

Enzimas proteolíticas produzidas por bactérias psicrófilas são, em sua maioria, extracelulares e termorresistentes, assim apresentam alta atividade residual após tratamento térmico (TOPÇU et al., 2006; MARCHAND et al., 2008; MARTINS et al., 2015). Portanto, o desenvolvimento de métodos que possam contribuir para a prevenção de perdas de rendimento dos produtos lácteos e a destinação adequada do leite cru ao processamento mais apropriado é relevante (COSTA, 2014).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico da Produção de Leite no Brasil

A pecuária no Brasil surgiu em 1532, quando as primeiras cabeças de gado leiteiro chegaram no porto de São Vicente (DIAS, 2012). A pecuária permaneceu insignificante por mais de três séculos, mas, a partir da década de 1870, com a decadência do café, o cenário político brasileiro favoreceu a capacidade agrária e permitiu a modernização das fazendas. Porém, foi em 1888, com a abolição da escravidão, que a pecuária se expandiu de norte a sul do país. Contudo, até a década de 1950 a atividade leiteira caminhou lentamente, sem grandes evoluções tecnológicas (VILELA, 2017).

Os primeiros relatos sobre a organização da produção leiteira no Brasil se apresentou em 29 de março de 1952, quando, o então presidente do Brasil, Getúlio Vargas assinou o Decreto 30.691, aprovando o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), aplicado nos estabelecimentos que realizam comércio interestadual ou internacional, tornando obrigatória à pasteurização, bem como a inspeção e o carimbo do Serviço de Inspeção Federal (SIF) nos rótulos dos produtos lácteos (VILELA, 2017).

Esse decreto delimitou a busca pela melhoria da qualidade da produção de leite e permaneceu em vigor até o fim da década de 1990, quando a Portaria n.º 56 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regulamenta a qualidade do leite e dá outras orientações, criou o Programa Nacional de Melhoria da

Qualidade do Leite - PNQL. O programa foi alicerçado em três pilares, entre eles os novos parâmetros regulatórios da qualidade do leite nacional, base da Instrução Normativa n.º 51, vigente de 2002 até 2011 (BRASIL, 2002) e substituída pela Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011). Os leites tipos B e C passaram a ser identificados apenas como leite cru refrigerado. Assim, os padrões nacionais de qualidade eram alinhados aos internacionais.

O Brasil, por possuir uma imensa área territorial e por ter o clima tropical e subtropical, apresenta grande potencial para produzir leite tendo as pastagens como principal fonte de alimento para os animais, a um custo relativamente menor do que em outros países (SILVA et al., 2017). Desta forma, o Brasil pode se tornar a médio ou em longo prazo, um importante exportador de leite e de produtos lácteos, a exemplo do que já ocorre com a carne bovina.

No início dessa década a produção brasileira de leite cresceu 4,5% ao ano, exceto em 2013, quando o País produziu 34,3 milhões de toneladas e cresceu 6% em relação a 2012 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2016). De 2013 para 2014, a produção cresceu 2,3%, alcançando 35,1 milhões de toneladas (IBGE, 2016).

Estima-se que a produção tenha sido de 35 milhões de toneladas em 2015 e de 33,6 milhões de toneladas em 2016 (IBGE, 2016), superior à estimada pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP), de 32,5 milhões de toneladas. No entanto, existe potencial para que se retome a taxa de crescimento histórico a partir do segundo semestre de 2017, por causa dos investimentos anteriores, e para que o País se mantenha como o quarto maior produtor mundial de leite de vaca nos próximos dez anos. Estima-se que em 2025 o Brasil produzirá 47,5 milhões de toneladas de leite (VILELA, 2015), volume semelhante ao previsto na literatura para cenários favoráveis (FAO, 2013; VILELA; RESENDE, 2014; BRASIL, 2015).

2.2. Granelização de Leite Cru no Brasil

A coleta de leite cru refrigerado a granel consiste em recolher o produto em caminhões com tanques isotérmicos construídos com aço inoxidável, por meio de

mangote flexível e bomba sanitária, diretamente do tanque de resfriamento por expansão direta ou dos latões armazenados em tanques de imersão (BRASIL, 2011).

Uma característica importante da coleta a granel é a necessidade que o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e seu recebimento na usina de beneficiamento, deve ser no máximo 48 horas, demandando um planejamento para a coleta que respeite esta restrição, de forma que o tempo total entre o armazenamento na propriedade e no veículo de transporte não ultrapasse dois dias (MALACARNE, 2017).

Medidas com intuito de melhorar a qualidade do leite vêm sendo implantadas desde o ano de 2002 com a publicação da Instrução Normativa n.º 51 (BRASIL, 2002). Porém, os produtores, que possuem escalas menores de produção em diferentes partes do país, demonstraram dificuldades em adequar o leite cru aos padrões estabelecidos por essa legislação, sendo necessárias alterações que foram estabelecidas pela Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011), como os novos padrões de contagem bacteriana total e de células somáticas, visando melhoras graduais na qualidade do leite (MENEZES et al., 2015).

De acordo com a Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011), por ser um produto perecível, o leite deve ser armazenado em tanques sobre refrigeração logo após a ordenha. Os sistemas de refrigeração na propriedade rural devem proporcionar uma temperatura de 4,0 °C e a matéria-prima deve ser entregue ao laticínio com temperatura máxima de 10 °C (BRASIL, 2011).

Considerando a importância do resfriamento do leite, o MAPA criou diretrizes específicas para a utilização dos tanques comunitários por meio de sua regulamentação pela Instrução Normativa n.º 22 (BRASIL, 2009). Nesta Instrução Normativa encontram-se os critérios para a instalação adequada do equipamento, bem como a exigência de um responsável capacitado e inscrito no cadastro nacional de produtores do Sistema de Informações Gerenciais do Serviço de Inspeção Federal (SIGSIF) por cada tanque coletivo (PEREIRA, 2011).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) fixou novas regras para a produção de leite no país, especificando os padrões de identidade e qualidade do leite cru refrigerado, pasteurizado e do leite tipo A. Estas novas regras estabelecidas pelas Instruções Normativas n.º 76 e n.º 77 entram em vigor dentro de 180 dias,

quando as Instruções Normativas 51/2002, 22/2009, 62/2011, 07/2016 e 31/2018 serão revogadas.

Conforme Miguel; Teodoro; Ahashiro (2007), o resfriamento adequado do leite cru na propriedade rural pode proporcionar benefícios importantes como: manutenção da qualidade da matéria-prima, redução da deterioração do leite por bactéria mesofílicas e aumento da eficiência produtiva do produtor e da indústria.

Reche et al. (2015) demonstrou que o uso correto dos tanques resfriadores, possibilita a manutenção da qualidade microbiológica do leite em relação à contagem bacteriana total. O tempo de resfriamento na propriedade também se apresentou como um fator coadjuvante na qualidade do leite cru, ressaltando a importância do tempo adequado de refrigeração estabelecido pela Instrução Normativa (BRASIL, 2011).

O resfriamento é um importante fator na contenção do crescimento bacteriano, porém se um controle efetivo de contaminação inicial não for realizado, mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas pela legislação vigente para a conservação do leite, pode ocorrer perda de qualidade da matéria-prima devido à multiplicação da microbiota psicotrófica (MALACARNE, 2017).

Portanto, somente o uso de refrigeração não garante a qualidade do produto. É fundamental que o leite cru seja obtido em condições higiênico sanitárias adequadas para conter a contaminação inicial e manter as contagens bacterianas em níveis baixos.

2.3. Microrganismos Psicotróficos Presentes no Leite

As bactérias psicotróficas são caracterizadas pela multiplicação a temperaturas de refrigeração e podem contaminar e serem as responsáveis pela deterioração do leite cru refrigerado e de seus derivados (ARCURI et al., 2008; ÂNGELO et al., 2014).

Embora a granelização, tenha possibilitado a melhoria da qualidade do leite recebido pela indústria, com a diminuição da multiplicação de microrganismos mesófilos, os quais aumentam a acidez do leite, prejudicando seu beneficiamento, permite a multiplicação da microbiota psicotrófica produtora de enzimas extracelulares deterioradoras e termorresistentes (ÂNGELO et al., 2014).

Quanto à morfologia, os microrganismos psicotróficos do leite cru podem ser bastonetes, cocos e vibriões, podem ou não formar esporos, serem Gram-negativos ou positivos, aeróbios ou anaeróbios (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). A microbiota psicotrófica Gram-negativa é constituída, principalmente, pelos gêneros *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas* e a microbiota Gram-positiva pelos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp. (PINTO, 2004; PINTO et al., 2006; PEREIRA, 2016). O grupo dos microrganismos presente no leite é de grande importância por causar problemas tecnológicos nos derivados lácteos.

Bactérias psicotróficas isoladas do leite, como *Pseudomonas*, são encontradas com maior frequência por apresentarem baixo tempo de geração (PINTO; MARTINS; VANETTI; 2006; ARCURI et al., 2008; MOREIRA, 2010). Estas bactérias possuem mecanismos de adaptação ao frio, sendo esta dependente das modificações que ocorrem nos lipídeos e nas proteínas.

Segundo Russel (1990), as alterações nos lipídeos são importantes no mecanismo de regulação da fluidez e permeabilidade da membrana celular. De acordo com autor, alterações nas proteínas são de natureza genotípica e são relacionadas às propriedades das enzimas e ao sistema de tradução.

As bactérias psicotróficas contaminantes do leite em sua maioria produzem enzimas proteolíticas, lipolíticas e lecitinases termorresistentes, que estão associadas à ocorrência de problemas tecnológicos como perdas de qualidade e rendimento, redução da vida útil do leite UHT e de outros produtos lácteos, coagulação doce do leite, e ocorrência de sabores amargos, entre outros (CEMPÍRKOVÁ; MIKULOVÁ, 2009; PEREIRA et al., 2016).

As proteínas do leite incluem duas frações principais: caseínas, que se apresentam, principalmente, no estado de partículas coloidais (micelas) e proteínas do soro, que estão em solução. As proteases possuem atividade hidrolítica em várias frações de caseína, sendo essa proteína facilmente degradada, devido sua estrutura não helicoidal.

A caseína é uma mistura de várias fosfoproteínas (α , β , e κ) muito semelhantes. A micela de caseína coagula pela ação da renina, uma enzima encontrada no suco

gástrico. No leite, a caseína se encontra na forma de polímeros, isto é, várias cadeias peptídicas unidas, possuindo cada cadeia massa molar de, aproximadamente, 20.000 kDA (BOBBIO; BOBBIO, 2003; SILVA, 2009).

Ressalta-se que a atividade proteolítica do leite não é correlacionada com a contagem de bactérias psicotróficas e sim com o tipo de bactéria e seu potencial enzimático (CEMPÍRKOVÁ; MIKULOVÁ, 2009; COSTA, 2014; BATISTA, 2015).

2.4. Capacidade Deteriorante da Microbiota Psicotrófica Contaminante em Leite Cru e Problemas Tecnológicos para a Indústria de Laticínios

Os microrganismos deterioradores apresentam grande potencial de causar problemas tecnológicos no processamento de leite e seus derivados como: instabilidade do leite ao calor, gelificação do leite UHT, alterações nas características sensoriais dos derivados lácteos, viscosidade alterada em leites fermentados, perda de rendimento na produção de queijos, dentre outros (BARBOSA et al., 2009; PINTO et al., 2013).

As enzimas proteolíticas de importância no leite e seus derivados podem ser de origem endógena ou microbiana. As proteases produzidas por microrganismos, principalmente, por psicotróficos, causam a proteólise das caseínas e, conseqüentemente, modificação das características físico-químicas do leite durante a sua vida de prateleira.

As enzimas proteolíticas de natureza bacteriana agem, em sua maioria, sobre a κ -caseína, resultando na desestabilização das micelas e na coagulação do leite, sendo esta ação análoga a da quimosina. Esta ação proteolítica pode causar a gelificação do leite UHT (RECIO et al., 2000; BATISTA, 2015).

A proteólise do leite pode também ser associada à atividade de proteases endógenas como a plasmina, uma serina protease, e seu precursor inativo, o plasminogênio (PINTO et al., 2016). 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). Quando as concentrações de plasmina presente no leite são muito baixas (14 a 75 μg por 100 mL), os problemas tecnológicos não se manifestam em produtos com vida de prateleira curta (PINTO et al., 2015).

Entretanto, em concentrações moderadas, a atividade desta enzima torna-se um problema para produtos de vida de prateleira longa (PINTO, 2004). Além disto, o sistema plasmina-plasminogênio do leite pode ser afetado pelo rompimento da micela de caseína por atividade de proteases de *Pseudomonas* (RIBEIRO, 2015).

Segundo Zhang et al. (2015), a indústria de laticínios pode se beneficiar ao controlar a contaminação do leite com *P. fluorescens*. Essa monitorização permite controlar também a concentração de protease nos produtos lácteos e maximizar a eficiência do processamento. O desenvolvimento de métodos envolvendo avaliação da atividade proteolítica, indicativa da concentração crítica de proteases no leite, tem grande importância para a obtenção de produtos de boa qualidade.

Muitas bactérias psicrotróficas também produzem lipases extracelulares, sendo estas, importantes na deterioração do leite e produtos lácteos (ARCURI, 2003; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; TEBALDI et al., 2008;). As lipases são resistentes à pasteurização, assim como a esterilização comercial (COUSIN, 1982; SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). A produção destas enzimas está relacionada com a temperatura, fase de crescimento do microrganismo, composição do meio e disponibilidade de oxigênio em que ele se encontra. Sua atividade dependente de pH, concentração de substrato e temperatura (NUÑEZ; NUÑEZ, 1983); geralmente sua síntese é maior em temperatura inferior à temperatura ótima de crescimento do microrganismo (ARCURI, 2003; PEREIRA, 2016) .

As lipases hidrolisam os triglicerídeos presentes no leite, causando a formação de ácidos graxos livres, mono e diglicerídios, resultando em altas concentrações de ácido butírico e capróico, compostos estes que conferem ao produto sabor de ranço no leite e em seus derivados (HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007).

Arcuri et al. (2008) isolaram, quantificaram e caracterizaram bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. As contagens desses microrganismos nas amostras variaram entre 10^2 e 10^7 UFC/mL, sendo verificada a predominância de bactérias psicrotróficas Gram-negativas em 81,2% das amostras. As bactérias Gram-positivas foram encontradas em 18,8% do total analisado. *P. fluorescens* foi a espécie dominante e todas as estirpes dessa espécie foram lipolíticas a 4,0 °C, 7,0 °C, 10,0 °C e 21,0 °C, sendo que a atividade proteolítica nestas temperaturas foi verificada, respectivamente, em 66,0%, 74,5%, 88,3% e 95,7% das

estirpes. Os resultados deste estudo demonstraram que a maioria dos isolados bacterianos apresentou atividade lipolítica e/ou proteolítica em temperaturas de refrigeração, deixando evidente que estas enzimas possuem um alto potencial de deterioração sobre leite e produtos lácteos.

Uma importante lipase produzida por bactérias psicrotróficas é a lecitinase que rompe a membrana do glóbulo de gordura do leite e expõe a degradação dos triglicerídeos, resultando no ranço hidrolítico do leite (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; SANTOS; BERGMANN, 2003).

2.5. Detecção de Proteólise do Leite

As proteínas do leite são muito valorizadas por suas excelentes propriedades nutritivas, cuja composição em aminoácidos atende à maioria das exigências fisiológicas do ser humano; além de apresentar propriedades tecnológicas e funcionais (PIRES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2012).

Uma das alternativas para a detecção do potencial deteriorador das proteases é a determinação do efeito da suspensão de leite sobre substratos específicos que, quando hidrolisados, liberam produtos coloridos, que são quantificados por densidade óptica (MACHADO, 2006). A azocaseína é um derivado da caseína que quando hidrolisada por peptidases libera componentes coloridos solúveis na presença de ácido tricloroacético (GONÇALVES, 2013). Assim, esta molécula tem sido usada para determinação de atividade proteolítica ocasionada por bactérias deterioradoras no leite.

A hidrólise da caseína e de outras proteínas também pode ser verificada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (MACHADO, 2006; PINTO et al. 2014). A eletroforese é uma técnica que permite a separação de diferentes tipos de proteínas em um suporte que, normalmente, pode ser acetato de celulose, gel de agarose ou em gel de poliacrilamida (GONZÁLEZ, 2003). Para Sgarbieri (1996), a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) pode ser conduzida com a proteína em sua forma nativa (eletroforese simples) ou com a proteína desnaturada pela ação de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), tal técnica é também conhecida como SDS-PAGE.

Segundo Kamoun et al. (2006), a determinação das frações proteicas por eletroforese pode ser realizada com leite integral ou desnatado. A técnica pode ser usada para purificar as proteínas, ou seja, extraí-las a partir de uma mistura complexa, sendo fundamental conhecer a quantidade da proteína pesquisada em relação às outras proteínas e dispor de um método que permita dosar todas as proteínas do meio.

A eletroforese em gel de poliacrilamida atua por dois princípios: exclusão molecular, em função da porosidade característica do gel e migração no campo elétrico devido à diferença na densidade de cargas de cada proteína. Em meio alcalino, grande parte das proteínas apresentam cargas negativas e, quando aplicado um campo elétrico, ocorre a migração das mesmas para o polo positivo em diferentes velocidades, dependendo também de suas propriedades físicas, densidade de cargas, tamanho e forma molecular, de modo que se torna possível a separação da amostra em diferentes frações proteicas (SGARBIERI, 1996; GONZÁLEZ, 2003).

Silva Junior (2001) afirmou que o estudo sobre a eletroforese em gel é uma das principais ferramentas para a separação e caracterização de macromoléculas, com base no fato de que as moléculas como as proteínas possuem carga e, portanto, são capazes de mover-se quando submetidas a um campo elétrico. Este autor complementa ainda, que a velocidade de deslocamento da molécula torna-se proporcional ao campo elétrico e a carga líquida da molécula, e torna-se inversamente proporcional ao seu raio, à distância entre os dois eletrodos e à viscosidade do meio.

Estudos relacionam essa metodologia a análise das caseínas em amostras de leite ou de caseína precipitada em pH 4,6. É uma metodologia que permite uma boa separação entre as variantes genéticas das caseínas e a detecção de diferentes graus de fosforilação das proteínas do leite (VELOSO, 2001; COSTA, 2014).

Pinto et al. (2014) avaliaram a taxa de crescimento e a atividade proteolítica de estirpes de *P. fluorescens* isoladas a partir de leite cru, após incubação a 2,0; 4,0; 7,0 e 10,0 °C. Os autores constataram por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) o alto potencial das estirpes em degradar a caseína durante o armazenamento do leite a baixas temperaturas recomendadas na legislação para conservação do leite cru. A hidrólise da caseína resultou na perda da estabilidade térmica do leite e na formação de fragmentos de baixa e média massa molecular. Mesmo a baixas temperaturas como 2,0 °C houve degradação proteica e, em

consequência, perda da qualidade do leite cru. Os autores ressaltaram a importância da implementação de medidas preventivas de contaminação na cadeia do leite.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. C.; SANTOS, C. A.; C. S.; MENEZES, I. R.; TEIXEIRA, L.M.; COSTA, J. R.; SOUZA, R. M. Perfil sanitário de unidades agrícolas familiares produtoras de leite cru e adequação à legislação vigente. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 303-315, 2016.

ÂNGELO, F. F.; RIBEIRO, C. S.; OLIVEIRA, L.; ARAÚJO, T. F.; CARDARELLI, H. R. Bactérias Psicotróficas em leite cru refrigerado. **Revista Científica de Medicina Veterinária- Periódico Semestral**, v.12, n.22, p.1-14, 2014.

ARCURI, E. F. Influencia de bactérias psicotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. (Eds.). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de fora: Templo Gráfica e Editora Ltda, p. 105- 115, 2003.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2250-2255, 2008.

BARBOSA, J. B.; TALMA, S. V.; BATISTA, C. S.; MARTINS, M. L.; PINTO, C. L. O. Avaliação de rendimento da produção dos queijos Minas Frescal, Minas Padrão e Mussarela fabricados com leite inoculado com *Pseudomonas fluorescens*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 371, p. 27-34, 2009.

BATISTA, C. S. **Estudo de correlação entre a qualidade do leite cru refrigerado e do leite UHT integral**. 2015. 46 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2015.

BOBBOI, O.; BOBBOI, P. A. **Introdução à Química Analítica**. 3ª ed. Varela: São Paulo. p.19-23, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 de setembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Instrução Normativa n.º 22, de 07 de junho de

2009. Normas técnicas para utilização de tanques de refrigeração de leite comunitário. Diário Oficial União, Brasília, DF, 07 de junho de 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprovado Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Leite Cru Refrigerado, Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília. DF, 20 de dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2014/2015 a 2024/2025**. Brasília, DF: Mapa/ACS, 133 p. 2015.

CEMPÍRKOVÁ, R.; MIKULOVÁ, M. Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. **Czech Journal of Animal Science**, v. 54, n. 2, p. 65-73, 2009.

COSTA, J. F. **Atributos de qualidade associados à ocorrência de proteólise em leite cru granelizado**. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

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.

DIAS, J. C. **As raízes leiteiras do Brasil**. 11. ed. São Paulo: Brleus. 167p. 2012.

DURR, J. W. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite: PNQL. In: DURR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O compromisso com a qualidade do leite**. Passo Fundo: Editora UPF, p. 38-55, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization; IDF - **International Dairy Federation**. Guia de boas práticas na pecuária de leite. Produção e Saúde Animal Diretrizes. Roma, 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-ba0027o.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2018.

GONÇALVES, A. N. **Estudos bioquímicos e determinação da especificidade da peptidase produzida pelo fungo *Aspergillus flavus***. 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, 2013.

GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. Indicadores metabólico-nutricionais do leite. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. (eds.): **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 31-47, 2003

HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applid and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7162-7168, 2007.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 44, p.1-51, 2016. Disponível em:

https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf.
Acessado em: 15 de abril de 2018.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 280 p., 2005.

KAMMOUN, R.; BEJAR, S.; ELLOUZ, R. Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on Neutrases. **Bioresource Technology**, v. 90, n. 3, p. 249-254, 2006.

MACHADO, A. D. S. **Atividade proteolítica de *Pseudomonas fluorescens* em biofilmes e detecção das células por antissoro policlonal**. 2006. 87 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MALACARNE, R. **Diretrizes de qualidade para a produção de leite em propriedades rurais no oeste do estado do Paraná**. 2017. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

MARCHAND, S.; COUDIJZER, K.; HEYNDRICKX, M.; DEWETTINCK, K.; DE BLOCK, J. Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 514-519, 2008.

MARTINS, M. L.; PINTO, U. M.; RIEDEL, K.; VANETTI, M. C. D. Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 207-217, 2015.

MATSUBARA, M. T.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; FAGNANI R.; SILVA L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; BATTAGLINI, A. P. P.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F.; Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 32 n. 1 p. 1-10, 2011.

MENEZES, M. F. C; SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; HUERTA, K.; BORTOLUZZI, D. P.; MENEZES, C. R. Microbiota e Conservação do Leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v. 18. Ed. Especial, p. 76-89, 2014.

MENEZES, I. R.; ALMEIDA, A. C.; MOURÃO, R. P.; REIS, S. V.; SANTOS, C. A.; LOPES, I. L. N.; Qualidade microbiológica do leite cru produzido no Norte de Minas Gerais. **Revista brasileira de Ciências Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 58-63, 2015.

MIGUEL, E. M.; TEODORO, V. A. M.; AHASHIRO, E. K. N. Microrganismos Psicotróficos em Leite. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 62, n. 355, p. 38-42, 2007.

MOREIRA, G. I. P. **Caracterização de bactérias Gram positivas psicotróficas aderidas em tanques de refrigeração de leite cru quanto a espécies, expressão de enzimas e perfis de resistência a antimicrobianos**. 2010. 104 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2010.

NUÑEZ, M.; NUÑEZ, J. A. Proteasas de psicrotrofos gram negativos. Efectos sobre la leche y los productos lácteos. **Revista Espanola de Lecheria**, n. 130, p. 251-260, 1983.

OLIVEIRA D. F.; BRAVO C. E. C.; TONIAL I. B. Soro de leite: Um subproduto valioso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 385, p. 64-71, 2012.

OLIVEIRA, G. B.; FAVARIN, L.; LUCHESE, R. H.; MCINTOSH, D. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 313-321, 2015.

PEREIRA, D. A. **Fatores Impactantes na Qualidade do Leite de Tanques Comunitários na Microrregião de Juiz de Fora- MG**. 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Ciências e Tecnologia de Leite e Derivados) Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

PEREIRA, F. A. B. **Capacidade lipolítica de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* isoladas do leite cru refrigerado**. 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados), Universidade do Norte do Paraná - UNOPAR, Londrina, 2016.

PINTO, C. L. O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru resfriado granelizado usado para produção de leite UHT**. 2004. 97 f. Tese (Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PINTO, C. L. O.; MACHADO, G. S.; CARDOSO, R. R.; ALVES, R. M.; VANETTI, M. C. D.; Proteolytic potential of *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated raw milk. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 4, n. 2, p. 16-25, 2014.

PINTO, C. L. O.; MACHADO, G. S.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Identificação de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 105-116, 2015.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D.; SILVA, R. F. P. Bactérias psicrotróficas e importância do controle de sua contaminação na cadeia do leite. In: PINTO, C. L. O.; PICCOLO, M. P.; BRITO, M. A. V. P.; MARTINS, M. L.; MACÊDO, C. S.; FARIÑA, L. O. **Qualidade microbiológica do leite cru**. Viçosa: EPAMIG, Zona da Mata, p. 135-156, 2013,

PINTO, C. L. O.; MACHADO, G. S.; VANETTI, M. C. D. Sedimentação, atividade proteolítica e proteólise de leite UHT integral durante o armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 4, p. 197-205, 2016.

PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A.; ROSA, J. C.; COSTA, N. M. B. Qualidade nutricional e escore químico de aminoácidos de diferentes fontes proteicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 179-187, 2006.

RECHE, N. L. M.; NETO, A. T.; D'OVIEDO, L.; FELIPUS, N. C.; PEREIRA, L. C.; CARDOZO, L. L.; LORENZETTI, R. G.; PICININ, L. C. A. Multiplicação microbiana no leite cru armazenado em tanques de expansão direta. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, p. 828-834, 2015

RECIO, I.; GARCIA-RISCO, M. R.; RAMOS, M.; LOPEZ-FANDIÑO, R. Characterization of peptídeos produced by the action of psychrotrophic on kappa-casein. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 4, p. 625-630, 2000.

RIBEIRO, A. C. P. **Comportamento Proteolítico de *Pseudomonas* ssp. Isolada de leite cru refrigerado**. 2015. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Leite e Derivados). UNOPAR, Londrina, 2015.

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.

SANTOS, A. S.; PIRES, C. V.; SANTOS, J. M.; COSTA, P. S. S. Crescimento de microorganismos psicotróficos. **Alimento e Nutrição**, v. 24, n. 3, p. 297-300, 2013.

SANTOS, D.; BERGMANN, G. P. Influência da temperatura durante o transporte, sobre a qualidade microbiológica do leite cru. III – Psicotróficos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 111, p. 86-91, 2003.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo – SP: Livraria Varela, 180 p.1996.

SILVA, A. M.; SILVA, J. C. S.; SILVA, L. K. M.; MOURA, D. M. F. Conjuntura da pecuária leiteira no Brasil. **Nutritime Revista Eletrônica**, v.14, n.1, p. 4954-4958, 2017.

SILVA, M. A. P.; SANTOS, P. A.; ISEPON, J. S.; REZENDE, C. S. M.; LAGE, M. E.; NICOLAU, E. S. Influência do transporte a granel na qualidade do leite cru refrigerado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 3, p. 381-387, 2009.

SILVA-JÚNIOR, J. G. **Eletroforese de proteínas: Guia teórico - prático**. Rio de Janeiro: Interciência, 125 p., 2001,

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in Milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 35-41, 1997.

SOUZA, G. N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; SILVA, M. V. G. B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1015-1020, 2009.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 753-760, 2008.

VELOSO, A. C. A. **Análise das caseínas de leite e queijos por HPLC/UV e por Ureia-PAGE**. 2001. 126 f. Dissertação. (Mestrado em Controle de Qualidade). Universidade de Porto, Porto-Portugal. 2001.

TOPÇU, A.; NUMANOGLU, E.; SALDAMLI, I. Proteolysis and storage stability of UHT Milk produced in Turkey. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 633-638, 2006.

VILELA, D. Para onde caminha o leite. **Revista Balde Branco**, n. 603, p. 41-43, 2015.

VILELA, D.; REZENDE, J.C.; LEITE, J. B.; ALVES, E. A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista de Política Agrícola**. Ano XXVI, n. 1, p. 1-20, 2017.

VILELA, D.; RESENDE, J. C. de. Cenário para a produção de leite no Brasil na próxima década. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITERIA NA REGIÃO SUL DO BRASIL. SEMINÁRIO DOS CENTROS MESORREGIONAIS DE EXCELÊNCIA EM TECNOLOGIA DO LEITE, n. 2, 2014, Maringá. Anais. Maringá: UEM, 2014.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2. ed. CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, p. 782, 2006.

ZHANG, S.; LI, H.; ULUKO, H.; LIU, L.; XIAOYANG, P.; LV, J. Investigation of protease production by *Pseudomonas fluorescens* bj-10 and degradation on milk proteins. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, p. 2466-2472, 2015.

CAPÍTULO 1

Atividade Proteolítica de Bactérias Psicotróficas obtidas de Leite Cru Refrigerado Granelizado

Scarlet Ohana da Silva Gandra

Patrícia Rodrigues Condé

Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Maurílio Lopes Martins ✉

Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais. Rio Pomba, MG.

✉ maurilio.martins@ifsudestemg.edu.br

RESUMO

A granelização trouxe melhoria na qualidade do leite cru recebido pela indústria, pois o transporte e o armazenamento do mesmo sob refrigeração inibe a multiplicação de microrganismos mesófilos aeróbios. Entretanto, os microrganismos psicotróficos, que se multiplicam sob refrigeração, contribuem para a deterioração do leite por produzirem enzimas proteolíticas e lipolíticas extracelulares termorresistentes. O nosso objetivo foi avaliar a atividade proteolítica de microrganismos psicotróficos isolados de leite cru granelizado. Os 20 isolados de uma coleção de cultura foram ativados em Ágar Tripton de Soja (TSA) a 25,0 °C por 48 horas. Posteriormente, foi retirado um conteúdo de alça de platina e inoculados em caldo TYEP, o qual foi incubado 4,0 °C por 1, 2, 5 e 10 dias. Os isolados foram separados do meio de cultura por centrifugação, a 10000 g, por 5 minutos, sendo o sobrenadante filtrado empregando-se filtros com poros de 0,45 µm. A atividade proteolítica foi determinada pelo método da azocaseína, sendo a leitura de absorvância realizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda ajustado para 440 nm. Constatou-se que o isolado 6, *Pseudomonas fluorescens*, apresentou a maior atividade proteolítica ($p < 0,05$) em caldo TYEP e os demais isolados foram menos proteolíticos ($p > 0,05$). Verificou-se também

que o tempo de incubação influenciou a atividade proteolítica ($p < 0,05$), sendo esta maior após 10 dias de incubação. Portanto, o controle da microbiota contaminante do leite cru é importante para que não ocorram problemas tecnológicos para a indústria de laticínios como a gelificação do leite UHT e perda de rendimento na produção de queijos, entre outros.

Palavras-chave: Leite Cru, Psicotróficos, Proteólise.

ABSTRACT

The maintenance of bulk refrigerated raw milk on farms has brought an improvement in the quality of the raw milk received by the industry, since the transportation and storage of the same under refrigeration inhibits the multiplication of aerobic mesophilic microorganisms. However, psychrotrophic microorganisms, which multiply under refrigeration, contribute to the deterioration of milk by producing proteolytic enzymes and heat-resistant extracellular lipolytic enzymes. Our objective was to evaluate the proteolytic activity of psychrotrophic microorganisms isolated from bulk raw milk. The 20 isolates from a culture collection were activated in Tryptone Soy Agar (TSA) at 25.0 °C for 48 hours. Subsequently, a platinum loop content was withdrawn and inoculated into TYEP broth, which was incubated 4.0 °C for 1, 2, 5 and 10 days. The isolates were separated from the culture medium by centrifugation at 10,000 *g* for 5 minutes, the supernatant being filtered using 0.45 µm pore filters. The proteolytic activity was determined by the azocasein method, and the absorbance reading was performed in a spectrophotometer at a wavelength set at 440 nm. It was verified that the isolate 6, *Pseudomonas fluorescens*, had the highest proteolytic activity ($p < 0.05$) in TYEP broth and the other isolates were less proteolytic ($p > 0.05$). It was also found that the incubation time influenced the proteolytic activity ($p < 0.05$), which was higher after 10 days of incubation. Therefore, the control of the contaminating microbiota of raw milk is important so that there are no technological problems for the dairy industry such as the gelation of UHT milk and loss of income in the production of cheeses, among others.

Keywords: Raw Milk, Psychotrophs, Proteolysis.

INTRODUÇÃO

O leite por ser um alimento de alto valor nutricional possui alta relevância na alimentação humana (SILVA et al., 2008; PAIVA et al., 2018). Sua composição pode variar em função de vários fatores, incluindo a raça e espécie do animal, fase de lactação, época do ano, fatores zootécnicos, dentre outros (GUERREIRO et al., 2005). A cadeia produtiva do leite é uma das mais antigas e de maior importância no desenvolvimento do agronegócio brasileiro (MIGUEL et al., 2010; SEQUETTO et al., 2017). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2015 a produção nacional desse alimento chegou a 24,05 bilhões de litros, sendo capaz de suprir o mercado nacional de leite de consumo (OLIVEIRA et al., 2017).

A melhoria das condições de produção, obtenção, estocagem, transporte e acondicionamento nas indústrias são etapas fundamentais para garantir a qualidade do leite e de seus derivados (CERQUEIRA et al., 2009; SERQUETTO et al., 2017). A estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção iniciou-se no Brasil na década de 90, sendo regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Instrução Normativa n.º 51 (BRASIL, 2002), retificada posteriormente pela Instrução Normativa n.º 62 (BRASIL, 2011), que determinam normas na produção, identidade e qualidade de leite pasteurizado e de leite cru refrigerado, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel.

A utilização do resfriamento do leite reduziu as perdas econômicas e de rendimento, causadas pela atividade acidificante de bactérias mesófilas, mas permitiu a seleção de bactérias psicrófilas relacionadas a problemas tecnológicos e econômicos na indústria de laticínios (FONSECA; SANTOS, 2000). A qualidade do produto final está diretamente relacionada à contagem microbiana do leite ao chegar à indústria beneficiadora (GUERREIRO et al., 2005).

A microbiota psicrotrofica Gram-negativa do leite cru é constituída, principalmente, por *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas* e a microbiota Gram-positiva é constituída, principalmente, por *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* spp. (PINTO, 2004; PEREIRA, 2016). Muitos desses microrganismos que compõem a microbiota do leite cru multiplicam em temperaturas baixas, impostas pelo armazenamento, e produzem enzimas extracelulares termorresistentes como proteases e lipases capazes de deteriorar o leite sobre refrigeração.

Diante do exposto, o nosso objetivo foi avaliar a atividade proteolítica de bactérias psicrotóxicas contaminantes isoladas de leite cru refrigerado granelizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 20 isolados psicrotóxicos proteolíticos obtidos de leite cru refrigerado armazenado em tanques de expansão, coletivos e individuais, instalados em propriedades rurais do município de Rio Pomba, Minas Gerais (CONDÉ, 2018). Inicialmente, os 20 isolados foram inoculados em Ágar Triptona de Soja (TSA - Kasvi, Itália) semissólido a 25,0 °C, por 48 horas. Posteriormente, um conteúdo de alça de repicagem de cada isolado foi transferido para tubos contendo 5 mL de caldo TYEP (triptona 1%, extrato de levedura 0,25%, KH₂PO₄ 0,1%, K₂HPO₄ 0,1% e CaCl₂ 0,25%), com incubação a 4,0 °C, por 1, 2, 5 e 10 dias. Após, os isolados foram separados do meio de cultura por centrifugação a 10000 g, por 5 minutos (Thermo Fisher Scientific, Sorvall™ Stratos™ Centrifuge Series, Alemanha). O sobrenadante obtido foi filtrado em filtros com poros de 0,45 µm (Analítica 2204513100C, Brasil).

A atividade proteolítica dos 20 isolados foi determinada no sobrenadante filtrado do meio de cultura TYEP utilizando-se azocaseína como substrato (NÖRNBERG et al., 2010). Para isso, em 250 µL de solução de azocaseína 2% (Sigma, USA) (p/v), diluída em tampão TRIS-HCl 20 mM, pH 8,0, foi adicionado 150 µL do sobrenadante do meio de cultura livre de células, de cada isolado bacteriano. A mistura foi incubada a 37,0 °C, por 18 horas em banho-maria (SL 155/22 Solab e Brasil) sendo a reação paralisada, por meio da adição de 1200 µL de ácido tricloroacético 10%. A mistura foi centrifugada (Thermo Fisher Scientific, Sorvall™ Stratos™ Centrifuge Series, Alemanha) a 15.000 g,

por 10 minutos, a 5,0 °C. Posteriormente, foi adicionado um volume de 600 µL do sobrenadante, 750 µL de solução de hidróxido de sódio 1,0 M (Isofar, Brasil). A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro (Tecnal, UV-VIS 5100, Shanghai), em comprimento de onda 440 nm. Paralelamente, foram preparadas amostras referentes ao branco, que continham todos os reagentes, exceto a amostra, que foi substituída pelo mesmo volume de água ultrapura. Um aumento no valor de absorvância de 0,01, da amostra em relação ao branco, por hora, correspondeu a uma unidade enzimática proteolítica por hora – UEP/h (MARTINS, 2007; NÖRNBERG et al., 2010).

Empregou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) para comparação das médias realizou-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey a 5% de probabilidade com auxílio do software Statistica (TIBCO, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Constatou-se que o isolado 6 (CONDÉ, 2018), *P. fluorescens*, apresentou maior atividade proteolítica ($p < 0,05$) em caldo TYEP, incubado a 4,0 °C (Figura 1).

Os isolados 7, 8, 9, 10, 11, 15 e 17 não diferiram ($p > 0,05$) quanto a atividade proteolítica, sendo esta considerável. Os demais isolados apresentaram menores valores de atividade proteolítica ($p < 0,05$) em caldo TYEP (Figura 1). Ressalta-se que os isolados 1, 6, 7, 11, 15, 17, 18, 19 são Gram-negativos e os isolados 2, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 13, 14, 16 e 20 são Gram-positivos. Os isolados 1 e 18 foram identificados por Condé (2018) como *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia*, respectivamente, e os demais isolados Gram-negativos como *P. fluorescens*. Entre os isolados Gram-positivos, 86% foram caracterizados como bastonetes e 12% como cocos (CONDÉ, 2018).

Na literatura há relatos que demonstram a capacidade de síntese de enzimas hidrolíticas por espécies do gênero *Pseudomonas*. Dogan; Boor (2003) demonstraram que 69% dos 338 isolados identificados como *P. fluorescens* obtidos de leite cru apresentaram atividade proteolítica e de lecitinase; enquanto apenas 14,5% dos isolados de *Pseudomonas putida* produziram enzimas hidrolíticas. Uma variação no grau de atividade das enzimas proteolíticas foi observada pelos autores, visto que

63,8% dos 277 isolados apresentaram atividade proteolítica, 59,20% atividade lipolítica e 45,10% apresentaram atividade de lecitinase.

Segundo Nörnberg et al. (2009), há uma grande variabilidade na atividade proteolítica entre diversos microrganismos, em especial entre os psicotróficos. Em seu estudo, algumas estirpes apresentaram alta atividade proteolítica e outras apresentaram atividade muito baixa, tornando claro que diferentes estirpes de uma mesma espécie podem apresentar comportamentos variados, sendo que algumas apresentam maior atividade proteolítica em uma determinada temperatura, enquanto que outras parecem não sofrer influência dessa variação de temperatura na produção de enzimas proteolíticas.

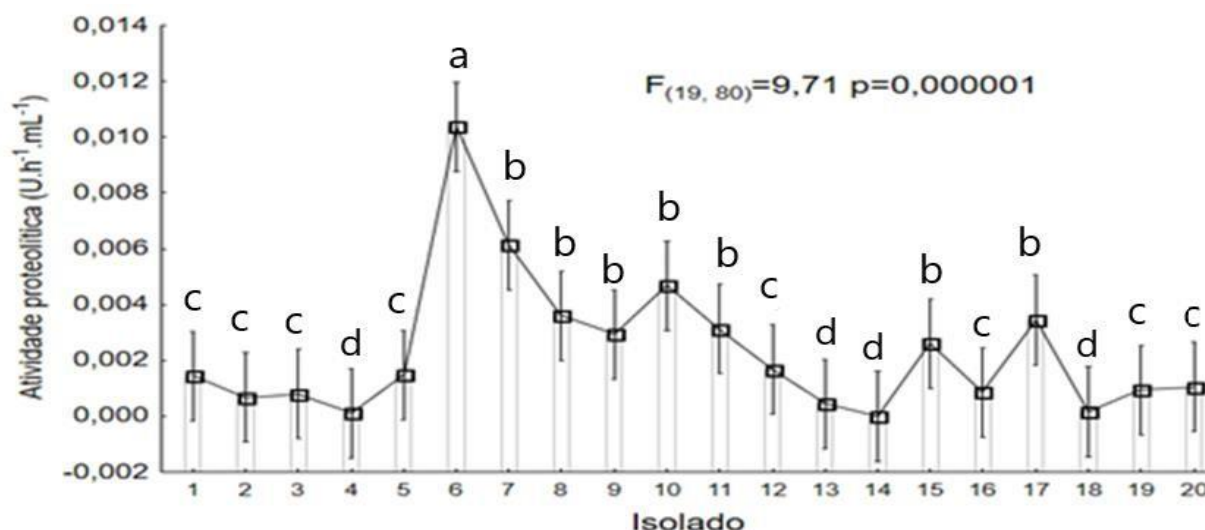


Figura 1 - Atividade proteolítica média (n=4) de bactérias psicotróficas isoladas de leite cru refrigerado armazenado em tanques de granelização instalados na região de Rio Pomba, MG, em caldo TYEP, a 4,0 °C, por 1, 2, 5 e 10 dias. Os isolados que possuem letras iguais não diferem entre si ($p \geq 0,05$) em relação a atividade proteolítica.

Constatou-se também que a atividade proteolítica de todos os isolados psicotróficos, em caldo TYEP foi influenciada pelo tempo de incubação sendo o maior valor encontrado após 10 dias de incubação a 4,0 °C (Figura 2). A atividade proteolítica está relacionada à ação das proteases produzidas por bactérias psicotróficas sobre as caseínas do leite.

Nörnberg et al. (2010) isolaram alguns microrganismos psicotróficos fortemente proteolíticos. As culturas foram inoculadas e incubadas em meio de cultura enriquecido com leite. A medida dos halos de clarificação foi avaliada a partir da evolução da proteólise no meio. Posteriormente, foi avaliada sua atividade proteolítica usando a azocaseína como substrato. Os autores constataram que a maioria das amostras inoculadas com diferentes estirpes apresentou atividade proteolítica inferior a 10 UEP/h, porém algumas apresentaram valores superiores a 20 UEP/h, sendo estas pertencentes às espécies de *B. cepacia* 1A4, *Klebsiella oxytoca* 8B3, *B. cepacia* 2A7, *Aeromonas* sp. 10B7 e *K. oxytoca* 1A5.

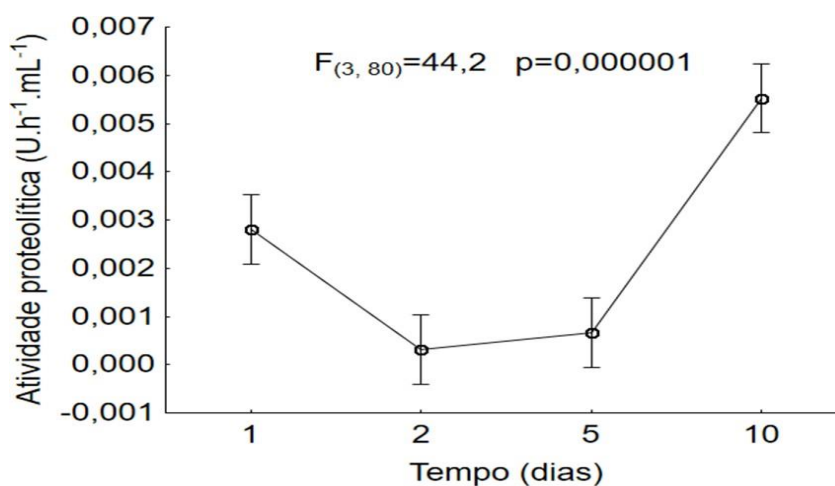


Figura 2 - Atividade proteolítica média (n=20) dos isolados bacterianos psicotróficos de leite cru refrigerado da região de Rio Pomba, MG, em caldo TYEP, 4,0 °C, por 1, 2, 5 e 10 dias.

Kumaresan; Annalvilli; Sivakumar (2007) avaliaram a deterioração do leite cru por bactérias psicotróficas em temperaturas de armazenamento de: 2,0 °C, 4,0 °C e 7,0 °C, além das atividades lipolítica e proteolítica destes microrganismos ao longo de 14 dias, com o objetivo de detectar a temperatura adequada para seu armazenamento. A 2,0 °C houve menor crescimento bacteriano e, conseqüentemente, menor atividade lipolítica e proteolítica de psicotróficos. Além disso, observou-se melhor qualidade sensorial do leite comparado às outras temperaturas, visto que, 50% dos provadores foram capazes de identificar o sabor de ranço causado pela lipólise quando as

concentrações de ácidos graxos livres estavam entre 0,18 e 0,20 mEq/kg. Quando as concentrações de ácidos graxos estavam na faixa de 0,25 mEq/kg, todos os entrevistados detectaram a rancidez. No estudo, o limiar sensorial de 0,25 mEq/kg não foi atingido até 14 dias quando o leite foi armazenado a temperatura de 2,0 °C. Desta maneira, os autores concluíram que o leite cru conservado a 2,0 °C, antes do processamento, mantém suas qualidades nutricionais e sensoriais, dando origem a produtos com maior valor agregado.

Mu; Du; Bai (2009) afirmaram que *P. fluorescens* é predominante sobre as demais espécies do gênero e estão, especialmente, associadas à intensa lipólise e proteólise do leite, tornando-se, muitas vezes, a microbiota dominante durante o armazenamento do leite cru refrigerado.

Adams et al. (1976) constataram que entre 70% a 90% dos psicotróficos isolados de leite cru estocado a 4,0 °C, por uma semana, eram *Pseudomonas*. Eneroth et al. (1998) observaram maior frequência de isolamento de espécies de *Pseudomonas* (72% a 77%) em amostras de leite cru, de leite pasteurizado e de amostras ambientais de indústrias de laticínios. A predominância desse gênero pode ser explicada pelo fato de *Pseudomonas* sp. apresentar um tempo de geração curto entre 0,0 °C e 7,0 °C (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). Outro fator que vem sendo comprovado em diversos trabalhos é a capacidade de formação de biofilme por membros desse gênero, que está associada com a capacidade de síntese de exopolissacarídeos. A presença de fímbrias e flagelos nos microrganismos deste gênero também facilita a adesão e a formação de biofilme em superfícies de aço inoxidável, que têm a remoção dificultada pelo processo de higienização, principalmente pela resistência a agentes sanitizantes (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; PINTO et al., 2006).

CONCLUSÃO

A atividade proteolítica de bactérias psicotróficas é variável de acordo com o gênero e espécie e aumenta com o tempo de armazenamento, sendo que *P. fluorescens* destaca-se em relação ao seu potencial proteolítico. Portanto, o controle da microbiota contaminante do leite cru durante as etapas de obtenção a fim de minimizar o acesso de bactérias Gram-negativas, principalmente de espécies de *Pseudomonas*, a este alimento, bem como do tempo e da temperatura de armazenamento em tanques

de expansão são essenciais para a qualidade final do leite e derivados. Essas medidas minimizam o acúmulo de enzimas deterioradoras termorresistentes, como proteases produzidas pela microbiota psicrotrófica, que atuam de forma inespecífica sobre as caseínas do leite e acarretam uma série de problemas tecnológicos para a indústria de laticínios como perda de estabilidade térmica do leite, gelificação do leite UHT, perda de rendimento na produção de queijos, desenvolvimento de sabores e odores indesejáveis nos produtos lácteos, entre outros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BRASIL. Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 de setembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Leite Cru Refrigerado, Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial União**, Brasília, DF, 30 de dezembro de 2011.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; PAIVA, C. A. V.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M.; SOUZA, R. M.; PENNA, C. F. A. M. Impacto da qualidade da matéria-prima na indústria de laticínios, 2009. Acesso em: 24 junho de 2018. Disponível em: <http://multimedia.3m.com/mws/media/685911O/impacto-qualidade-materia-prima.pdf>.

CONDÉ, P. R. **Potencial deteriorador e diversidade da microbiota do leite cru granelizado**. 145f. 2018. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos), IF Sudeste MG, campus Rio Pomba, Rio Pomba, 2018.

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, n. 1, p. 130-138, 2003.

ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDEHAUG, 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.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, p.175, 2000.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENERI, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Revista Ciência e Agrotecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 11, p. 1383-1387, 2007.

MARTINS, M. L. **Characterization of protease and lipase from *Pseudomonas fluorescens* and quorum sensing in psychrotrophic bacteria isolated from milk**. 2007. 184 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

MIGUEL, G. Z; MAGALHÃES, M. C.; GERON, L. J. V.; BOTINI, T.; SAENZ, E. C.; CRUZ, C. Caracterização físico-química de leite obtido de diferentes tipos de comercialização em Pontes e Lacerda – MT. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 8, n. 1, p. 103- 111, 2010.

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

NÖRNBERG, M. F. B. L.; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 41-46. 2010.

NÖRNBERG, M. D. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta scientiae veterinariae**. v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

OLIVEIRA, E. N. A., ALMEIDA, F. L. C., FEITOZA, B. F., SOUZA, R. L. A., OLIVEIRA, S.N. Análise do leite *in natura* comercializado no município de Taboleiro Grande – **Revista Brasileira de Agrotecnologia**. v. 7, n. 1, p. 102 – 105, 2017.

PAIVA, Y. F.; FRANÇA, K. R.; DA SILVA, E. V.; DA SILVA FILHO, J. A.; PEREIRA, K. E. V.; SANTOS A. A. Diagnóstico microbiológico e índice de adição de água do leite cru comercializado no município de Pombal, Paraíba. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.13, n.1, p. 84-88. 2018

PEREIRA, F. A. B. **Capacidade lipolítica de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* isoladas do leite cru refrigerado**. 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados), Universidade do Norte do Paraná - UNOPAR, Londrina, 2016.

PINTO, C. L. O. **Bactérias psicrófitas proteolíticas do leite cru resfriado granelizado usado para produção de leite UH**. 2004. 97 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrófitas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

SEQUETTO, P. L.; ANTUNES, A. S. dos.; NUNES, A. S.; ALCANTRA, L. K. S.; REZENDE, M. A. R.; PINTO, M. A. de O.; FONTES, G. G.; HUNGARO, H. M. Avaliação da qualidade microbiológica de leite cru refrigerado obtido de propriedades rurais da Zona da Mata mineira. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 7, n. 1, p. 42-50, 2017.

SILVA, M. C. D.; SILVA, J. V. L.; RAMOS, A. C. S.; MELO, R. O.; OLIVEIRA, J. O. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no estado de Alagoas. **Ciências. Tecnologia Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 226-230, 2008.

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

TIBCO **software estatística** (data analyses software system), version 13. <http://statistica.io>, 2017

CAPÍTULO 2

Hidrólise das Caseínas do Leite por Bactérias Psicrotróficas

Scarlet Ohana Da Silva Gandra

Patrícia Rodrigues Condé

Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Maurilio Lopes Martins ✉

Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais. Rio Pomba, MG.

✉ maurilio.martins@ifsudestemg.edu.br

RESUMO

A caseína é a principal proteína do leite e representa cerca de 80% das proteínas lácteas totais. Embora seja extremamente termorresistentes, quase toda a caseína apresenta-se na forma de micelas e inclui quatro tipos de cadeias polipeptídicas: α_1 , α_2 , β e κ , além de alguns derivados formados por proteólise. O nosso objetivo foi avaliar a hidrólise das caseínas do leite por bactérias psicrotróficas. Os isolados utilizados foram *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas luteola*, *Acinetobacter junni/johnsonii*, *Aeromonas hydrophyla/caviae* e *Burkholderia cepacia*, os quais foram incubados em 100 mL de leite pasteurizado e incubados a 7,0 °C, por 2 e 4 dias. Para a avaliação da hidrólise das caseínas utilizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Alíquotas contendo 20 µg de proteína foram adicionadas em tampão de amostra e submetidas à fervura, e, posteriormente, aplicadas no gel, sendo conduzida à eletroforese. Os géis foram corados, em solução de *Coomassie R brilliant blue* e posteriormente, revelados e transparentizados em solução de ácido acético. A coloração com nitrato de prata também foi empregada para a detecção da degradação das caseínas. Constatou-se que, com dois dias de incubação a 7,0 °C, *P. fluorescens*, *A.baumannii* e *B. cepacia* causaram hidrólise das caseínas. Por outro lado, com quatro

dias de incubação a 7,0 °C, *P. fluorencens*, *S. maltophilia*, *P. luteola* e *B. cepacia* ocasionaram maior degradação das caseínas. Considerando que a degradação das caseínas do leite compromete quantitativamente e qualitativamente a qualidade da matéria-prima em consequência da atividade de proteases termoestáveis de bactérias psicrotróficas, reforça-se a importância da prevenção de contaminações microbianas na cadeia do leite por meio da implementação das boas práticas de produção, transporte e processamento do leite.

Palavra-Chave: Leite, Microbiota psicrotrófica, caseínas.

ABSTRACT

Casein is the main milk protein and accounts for about 80% of total milk proteins. Although extremely thermostable, almost all casein presents as micelles and includes four types of polypeptide chains: α_{s1} , α_{s2} , β and κ , in addition to some derivatives formed by proteolysis. Our objective was to evaluate the hydrolysis of milk caseins by psychrotrophic bacteria. The isolates used were *Pseudomonas fluorencens*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas luteola*, *Acinetobacter junni/johnsonii*, *Aeromonas hydrophyla/caviae* and *Burkholderia cepacia*, which were incubated in 100 mL of pasteurized milk and incubated at 7.0 °C for 2 and 4 days. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used for the evaluation of casein hydrolysis. Aliquots containing 20 μ g of protein were added to the sample buffer and boiled, and then applied to the gel, being electrophoresed. The gels were stained in Coomassie R bright blue solution and subsequently developed and clarified in acetic acid solution. Silver nitrate staining was also used for the detection of casein degradation. It was found that, with two days of incubation at 7.0 °C, *P. fluorencens*, *A. baumannii* and *B. cepacia* caused casein hydrolysis. On the other hand, with four days of incubation at 7.0 °C, *P. fluorencens*, *S. maltophilia*, *P. luteola* and *B. cepacia* caused higher casein degradation. Considering that the degradation of milk caseins quantitatively and qualitatively compromises the quality of the raw material as a consequence of the activity of thermostable proteases of psychrotrophic bacteria, the importance of the prevention of microbial contaminations in the milk chain is reinforced through the implementation of good practices production, transport and processing of milk.

Keywords: Milk, Psychrotrophic microbiota, caseins.

INTRODUÇÃO

As proteínas do leite são constituídas por diferentes aminoácidos e representam, aproximadamente, 3% dos sólidos do leite bovino. A caseína é a principal proteína desse alimento e constitui cerca de 80% das proteínas lácteas totais. Embora seja extremamente termorresistente, é uma fosfoproteína sensível à acidez, com ponto isoelétrico de pH 4,6, precipitando-se em grandes micelas. A caseína é uma molécula complexa e, exclusivamente láctea, composta por aminoácidos como leucina, isoleucina, lisina, arginina, metionina, fenilalanina, histidina, triptofano, dentre outros (BELOTI, 2015; ARAÚJO, 2016).

A micela de caseína por possuir uma característica anfótera pode combinar-se com bases e com ácidos resultando na formação de caseinatos e de sais. Quase toda a caseína apresenta-se na forma de micelas e, inclui quatro tipos de cadeias polipeptídicas: α_1 , α_2 , β e κ que apresentam massas molares de 23,6 kDa, 23,5 a 24,0 kDa, 24 kDa e 19 kDa, respectivamente (ROMAN; SGARBIERI, 2005; ARAÚJO, 2016). Além disso, alguns derivados da caseína são formados por proteólise.

Do ponto de vista econômico, as caseínas são muito relevantes pelo seu alto valor nutricional a suas características físico-químicas que influenciam, diretamente, na fabricação de diversos derivados lácteos (HUPPERTZ et al., 2006; REIS et al., 2012). O processamento do leite em altas temperaturas é possível devido ao fato de que essas proteínas são estáveis ao calor.

Microrganismo psicotróficos produtores de enzimas extracelulares termorresistentes multiplicam-se no leite cru refrigerado e causam vários problemas tecnológicos para indústria de laticínios devidos a proteólise e lipólise (ZENI et al., 2013,).

As proteases produzidas por bactérias psicotróficas degradam preferencialmente a κ -caseína, seguido da β -caseína e α -caseína. Associado a sua natureza anfipática e localização na superfície na micela de caseína, a κ -caseína é

importante na estabilidade da micela e sua degradação pode resultar na coagulação do leite (ADAMS et al., 1976). Assim, as enzimas termorresistentes, como as lipases e as proteases microbianas, são de grande preocupação para a indústria, pois reduzem rendimento na fabricação de queijos, limitam a vida de prateleira, alteram sabores, odores e aparência dos produtos lácteos. As proteases possuem atividade hidrolítica em várias frações de caseína, sendo essas moléculas facilmente degradadas, devido sua estrutura não helicoidal. A k-caseína está localizada na superfície da micela e, quando hidrolisada causa desestabilização da mesma, podendo levar a coagulação e alterações nas características sensoriais do leite (BRITO et al., 2000; HANTSIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007). A composição proteica do leite pode ser determinada por diferentes técnicas, dentre elas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato (SDS-PAGE), a qual é uma técnica bioquímica versátil, relativamente simples, rápida e de grande poder informativo. Esta técnica consiste na migração de moléculas ionizadas na mesma direção, as quais se repelem mutuamente mantendo sua estrutura e propriedades intactas, possibilitando assim a separação em várias frações (BRAMMER, 2001).

Objetivou-se comparar o potencial de hidrólise de bactérias psicrotróficas sobre as caseínas do leite pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados sete gêneros bacterianos, fortemente proteolíticos, isolados de leite cru refrigerado granelizado, por Condé (2018): *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas luteola*, *Acinetobacter junni/johnsonii*, *Aeromonas hydrophyla/caviae* e *Burkholderia cepacia*. Amostras de leite cru foram coletadas no Departamento de Zootecnia do IF Sudeste MG, campus Rio Pomba, de animais ordenhados de acordo com as Boas Práticas de Produção. Posteriormente, inocularam-se, isoladamente, uma concentração de células de cada isolado psicrotrófico proteolítico de, aproximadamente, 10^4 UFC/mL em 100 mL de leite pasteurizado e, após, procedeu-se a incubação a 7,0 °C por 48 e 96 horas.

O efeito do crescimento dos sete isolados bacterianos sobre as caseínas do leite foram avaliados por SDS-PAGE com modificações do método de Laemmli (1970), com 2 e 4 dias de estocagem. As amostras do leite foram preparadas como descrito por

Adams et al. (1976), com adaptações. Alíquotas de 10 mL do leite refrigerado foram acidificadas para pH 4,0 com ácido clorídrico 1,0 mol/L, sob agitação constante. Posteriormente, foram centrifugadas, por 10 minutos, a 10.000 g, em centrífuga refrigerada (Thermo Fisher Scientific, Sorvall™ Stratos™ Centrifuge Series, Alemanha). O soro foi eliminado, a caseína precipitada e o volume original foi reconstituído com solução tampão Tris-HCl, corrigindo-se o pH para 6,90. As amostras do leite controle, ou seja, amostras de leite não inoculadas foram submetidas às mesmas condições.

O sistema de eletroforese descontínuo contendo poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi utilizado para a separação das proteínas. A concentração do gel de separação foi de 15% e do gel de empilhamento foi de 5%. As concentrações finais de tampão Tris-HCl e de SDS no gel de separação e de empilhamento foram àquelas recomendadas por Laemmli (1970). Os géis foram polimerizados quimicamente, com tetrametileno diamina (TEMED) e de persulfato de amônio (APS). O tampão de corrida, pH 8,60, continha Tris-base, glicina e SDS. A concentração de proteína, em cada uma das amostras inoculadas, foi quantificada de acordo com Bradford (1976). Alíquotas contendo 20 µg de proteína foram adicionadas de tampão de amostra (1:3 v/v) e submetidas a tratamento térmico, por imersão em banho de água fervente, por três minutos. Posteriormente, foram aplicadas no gel de poliacrilamida. A eletroforese foi conduzida a 80 V, por 60 minutos, para empilhamento e 100 V, por duas horas e trinta minutos, para separação das frações proteicas. Os géis foram corados, por duas horas, à temperatura ambiente, em solução de *Coomassie R brilliant blue*. Posteriormente, foram revelados e transparentizados em solução de ácido acético.

A coloração dos géis foi também empregada com nitrato de prata. Para a revelação dos mesmos utilizou-se solução fixadora de metanol, por 40 minutos, sob agitação leve. Após, aplicou-se solução de etanol a 50% por três vezes, por 10 minutos. Em seguida, o gel foi lavado por três vezes com água ultrapura, por 1 minuto. Logo após a lavagem, aplicou-se uma solução de tiosulfato de sódio 0,02%, por 20 minutos. Posteriormente, os géis foram lavados, por mais três vezes, com água ultrapura, por 1 minuto. Em seguida, aplicou-se aos géis uma solução de nitrato de prata (0,1g de nitrato de prata, 0,013 mL de formaldeído 37%, 50 ml de água ultrapura), por 30 minutos, sob agitação leve. Em seguida, os géis foram lavados com água

ultrapura, por três vezes, por um minuto. Após, aplicou-se a solução reveladora constituída de 2 g de carbonato de sódio, 1 mL de tiosulfato de sódio 0,02%, 0,025 mL de formaldeído 37%. Completou-se o volume com água ultrapura até cobertura completa dos géis. Deixando-os sob agitação até a visualização das bandas de proteína. Então, o processo de revelação das bandas foi interrompido pela adição de 20 mL de ácido acético.

A identificação das frações de caseína foi feita por comparação das amostras com padrões de α , β e κ -caseínas purificados de leite bovino (Sigma, Chemical Co, St Louis, MO, USA) e com marcador de massa molecular (Jena Bioscience®). Desta forma, avaliou-se, qualitativamente, a hidrólise das caseínas em função do gênero de bactéria psicotrófica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados bacterianos proteolíticos apresentaram perfis de degradação das caseínas do leite diferentes, resultado indicativo da diferença de potencial de deterioração da caseína. As amostras inoculadas com *P. fluorescens*, por dois dias (Figura 1, A e B, canaleta 6) apresentaram hidrólise das frações proteicas.

Após quatro dias de incubação, constatou-se hidrólise das frações de caseína por *P. fluorescens*, *S. maltophilia*, *P. luteola* e *B. cepacia* (Figura 2, A e B). *A. junii* e *A. hydrophyla/caviae* causaram uma menor degradação nas frações de caseínas (Figura 2 - A e B, canaletas 10 e 11, respectivamente).

O gel revelado com azul de Coomassie – R250 demonstrou um alto arraste de proteínas, o que ocorre em função da degradação de fosfoproteínas presentes no leite em peptídeos de menor peso molecular. Em outros estudos também foi observado o alto potencial de bactérias psicotróficas como *P. fluorescens* de hidrolisar, de forma rápida, a κ -caseína (COSTA et al., 2002; CHEN et al. 2003; PINTO et al., 2014).

A predominância de bactérias psicotróficas Gram-negativas, em especial espécies do gênero *Pseudomonas* é apontada em estudos (Arcuri et al., 2008). Essas bactérias produzem proteases inespecíficas. Recio et al. (2000) trabalharam com a fração peptídica produzida a partir da proteólise do leite, mais especificamente da κ -caseína, e analisaram sua degradação associada à ação da quimosina ou de proteases produzidas pela *P. fluorescens* B52. A identificação e fracionamento das moléculas

foram determinados por metodologia aplicada com RP-HPLC, acoplada a espectrometria de massa. Os autores encontram frações peptídicas idênticas às encontradas no leite UHT estocado por longas datas e deduziram que as proteases produzidas por micro-organismos psicrotróficos também clivam a caseína na ligação 105-106, sendo menos específicas do que a quimosina, o que sugere que a presença de caseinomacropéptido (CMP) não é um indicador exclusivo de fraude em leite com soro de queijo.

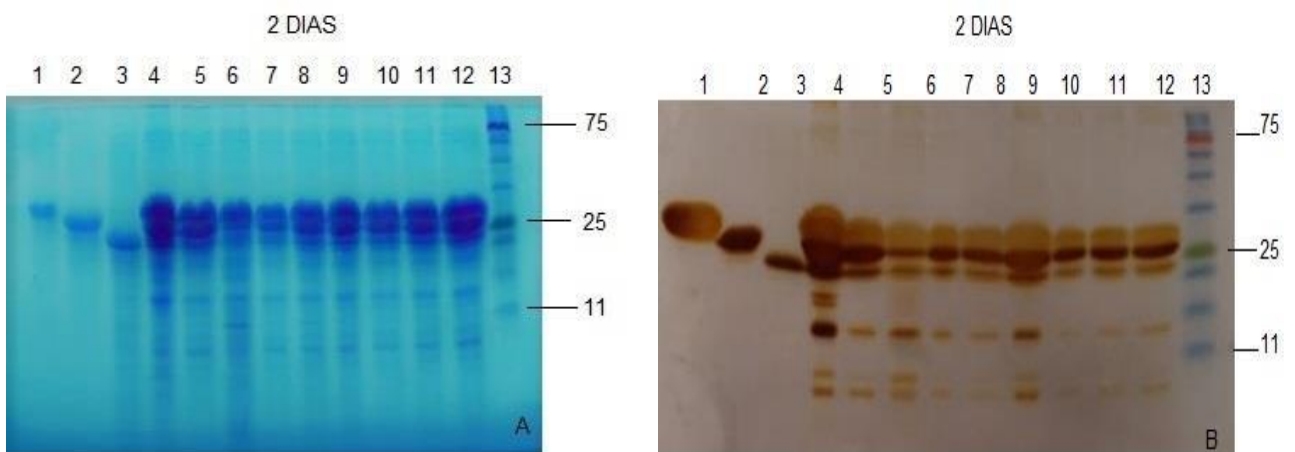


Figura 1 – SDS- PAGE (15%) das caseínas provenientes de amostras do leite controle e de amostras de leite inoculadas, intencionalmente, e incubadas 7,0 °C, por 2 dias e coradas com *Coomassie R brilliant blue* (A) e nitrato de prata (B). Canaletas: **1-** Padrão de α -caseína, **2-** Padrão de β -caseína, **3-** Padrão de K-caseína, **4-** Controle tempo zero, **5-** Controle tempo dois dias, **6-** *P. fluorescens*, **7-** *A. baumannii*, **8-** *S. maltophilia*, **9-** *P. luteola*, **10-** *A. junii\johnsonii*, **11-** *A. hydrophyla\caviae* **12-** *B. cepacia*, **13-** Marcador de Peso Molecular (kDa).

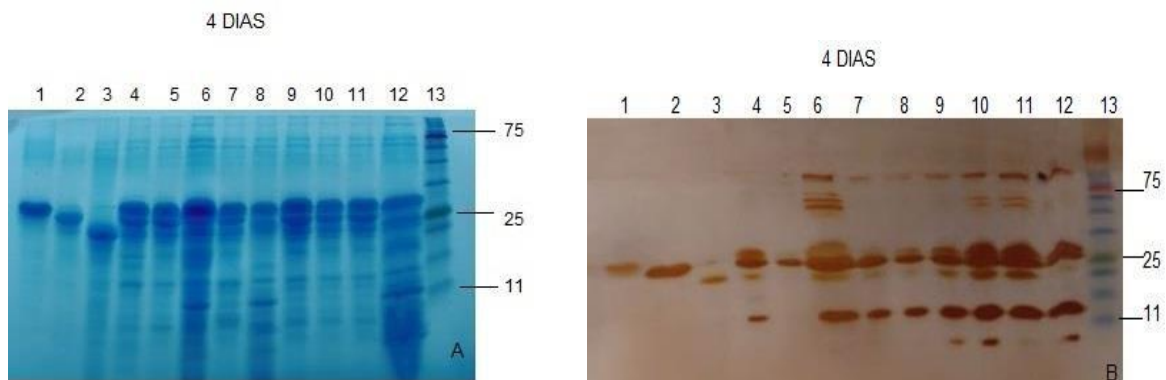


Figura 2 – SDS- PAGE (15%) das caseínas provenientes de amostras do leite controle e de amostras de leite inoculadas, intencionalmente, e incubadas 7,0 °C, por 4 dias e coradas com *Coomassie R brilliant blue* (A) e nitrato de prata (B). Canaletas: 1- Padrão de α -caseína, 2- Padrão de β -caseína, 3- Padrão de K-caseína, 4- Controle tempo zero, 5- Controle tempo dois dias, 6- *P. fluorencens*, 7- *A. baumannii*, 8- *S. maltophilia*, 9- *P. luteola*, 10- *A. junii* \ *johnsonii*, 11- *A. hydrophyla* \ *caviae* 12- *B. cepacia*, 13- Marcador de Peso Molecular (kDa).

Desta forma, pode-se afirmar que a estocagem do leite cru sobre refrigeração, antes do processamento, pode resultar na perda de qualidade da matéria-prima em consequência da atividade de enzimas termoestáveis de bactérias psicrotróficas, com consequente comprometimento da qualidade dos produtos lácteos.

CONCLUSÃO

O perfil de hidrólise das caseínas é variável com a espécie bacteriana e com o seu potencial proteolítico. A demonstração da degradação proteica pelo método de eletroforese permitiu visualizar e demonstrar o efeito deletério de bactérias psicrotróficas sobre as caseínas, o que implica na perda de estabilidade térmica, de qualidade e de rendimento de produtos lácteos em função da perda proteica. Desta forma, reforçou-se a importância da prevenção de contaminações microbianas do leite para a sua integridade, que é um fator imprescindível para garantir condições adequadas de processamento, aumento na vida útil dos produtos lácteos e obtenção de produtos de acordo com os padrões de identidade e qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2250-2255, 2008.

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.

ARAÚJO, J. P. A. Estabilidade alcoólica do leite: relação com frações proteicas e outros componentes. 2016. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados). Universidade Norte do Paraná, Unidade Piza, Londrina, 2016.

BELOTI, V. L. **Obtenção, Inspeção e Qualidade**. Londrina: Editora Planta, p. 417. 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAMMER, S. P. **A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, p. 13, 2001.

BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F.; BRITO, J. R. F. Testando a qualidade do leite. In: DURÃES, M. C.; MARTINS, C. E.; DERESZ, F.; BRITO, J. R. F.; FREITAS, A. F.; PORTUGAL, J. A. B.; COSTA, C. N. Minas Leite. 2000, Juiz de Fora. Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira. **Anais**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 83-94, 2000.

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.

COSTA L. M.; GÓMEZ M. F.; MOLINA L. H.; ROMERO, A. 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.

CONDÉ, P. R. Potencial deteriorador e diversidade da microbiota do leite cru granelizado. 145 f. 2018. Dissertação de mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos), IFSudeste MG, campus Rio Pomba, Minas Gerais, 2018.

HUPPERTZ, T.; SMIDDY, M. A.; UPADHYAY, V. K.; KELLY, A. L. High-pressure-induced changes in bovine milk: a review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 2, p. 58-66, 2006.

HANTSIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, p. 7162-7168, 2007.

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

PINTO, C. L. O; MACHADO, G. S.; CARDOSO, R. R.; ALVES, R. M.; VANETTI, M. C. D.; Proteolytic potential of *Pseudomonas fluorescens* isolated from refrigerated raw milk. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 4, n. 2, p. 16-25, 2014.

RECIO, I.; GARCIA-RISCO, M. R.; RAMOS, M.; LOPEZ-FANDIÑO, R. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic on kappa-casein. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 4, p. 625-630, 2000.

REIS, A. M.; COSTA, M. R.; COSTA, R. G.; SUGUIMOTO, H. H.; SOUZA, C. H. B.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. Efeito do grupo racial e do número de lactações sobre a produtividade e a composição do leite bovino. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 3421-3436, 2012.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da quimosina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 468- 474, 2005.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

ZENI, M. P.; MARSAN, M. H. S.; SILVA, G. P. R.; CARLI, E. M.; PALEZI, S. C. Influência dos microrganismos psicrotóxicos sobre qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc & Ciência – ACET**, v. 4, p. 61-70, 2013.