



unopar

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LEITE E  
DERIVADOS**

ANA CRISTINA PINESSO RIBEIRO

**COMPORTAMENTO PROTEOLÍTICO DE *Pseudomonas* spp.  
ISOLADA DE LEITE CRU REFRIGERADO**

---

Londrina  
2015

**ANA CRISTINA PINESSO RIBEIRO**

**COMPORTAMENTO PROTEOLÍTICO DE *Pseudomonas* spp.  
ISOLADA DE LEITE CRU REFRIGERADO**

Dissertação apresentada à UNOPAR, como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia  
de Leite e Derivados.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elsa Helena Walter de Santana

Londrina  
2015

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação**  
**Universidade Norte do Paraná**  
**Ana Cristina Gasparini Freitas**  
**Bibliotecária CRB9/792**

R367c Ribeiro, Ana Cristina Pinesso  
Comportamento proteolítico de *Pseudomonas* ssp. isolada de leite cru refrigerado / Ana Cristina Pinesso Ribeiro. Londrina: [s.n], 2015.  
42f.

Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Universidade Norte do Paraná.

Orientadora: Profª Drª. Elsa Helena Walter de Santana

1- Tecnologia do leite - dissertação de mestrado - UNOPAR 2- Lácteo 3- Protease 4- Fatores extrínsecos 5- Gram negativo I- Santana, Elsa Helena Walter de, orient. II- Universidade Norte do Paraná.

CDU 637.1

ANA CRISTINA PINESSO RIBEIRO

COMPORTAMENTO PROTEOLÍTICO DE *Pseudomonas* spp. ISOLADA DE LEITE CRU  
REFRIGERADO

Dissertação apresentada à UNOPAR, no Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, área de concentração Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

---

Profa. Dra. Elsa Helena Walter de Santana  
UNOPAR

---

Profa. Dra. Francielle Gibson da Silva Zacarias  
*UENP- Campus Luis Meneghel*

---

Profa. Dra. Lina Casale Aragon Alegro  
UNOPAR

Londrina, 13 de Abril de 2015.

Dedico este trabalho a minha família pelo apoio e amor incondicional, meu esposo e filhos amados.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao nosso divino criador, pela oportunidade no labor deste digno e gratificante trabalho.

Agradeço a minha orientadora e amiga Elsa, muito companheira em dias muito difíceis de minha existência, pelos momentos de incentivo e apoio para prosseguir, por todo ensinamento compartilhado e principalmente pela habilidade de saber ouvir, tudo está eternizado no meu coração.

Às amigas e professoras Lina, Cíntia, Joice, pelo companherismo, por suas idéias, seus conhecimentos e grande ajuda.

Aos demais professores deste programa que contribuíram com seus ensinamentos.

Aos colegas de laboratório, as técnicas Flávia e Geyci que sempre me socorreram e cooperaram e aos colaboradores queridos: Ítalo, Samera, Marcela, Sara, Flávia, Daniel, Leticia e Luis muito obrigada pela dedicação.

Às minhas amigas do mestrado Ana Amélia, Isadora, Bárbara, Evelyn, Marisa, por toda amizade sincera e ajuda mútua que existiu durante esses dois anos.

Às minhas amigas de trabalho que me incentivaram e me acompanharam nesta etapa, Marilsa, Beatriz, Aline e Cristina.

Aos meus pais, por todo amor e por sempre me orientar em o melhor caminho a escolher.

"Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!"  
Chico Xavier

RIBEIRO, A. C. P. **Comportamento proteolítico de *Pseudomonas* spp. isolada de leite cru refrigerado.** 2015. 42f. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados – UNOPAR- Unidade Piza, Londrina, 2015.

## RESUMO

O conhecimento do comportamento proteolítico de *Pseudomonas* spp. em diferentes tempos e temperaturas é importante para determinação das melhores condições de estocagem do leite cru refrigerado. Objetivou-se avaliar durante 96 horas, a capacidade de multiplicação e de proteólise, de *Pseudomonas* spp. isoladas de leite cru refrigerado de produtores de Londrina-PR e incubadas em 2°C, 4°C e 8°C. As cepas a serem testadas tiveram o gênero confirmado pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Em seguida, foram recuperadas com inoculação em 200 mL de leite integral reconstituído a 12% (21°C/48 h). A população de *Pseudomonas* foi determinada e diluições decimais foram realizadas até 10<sup>2</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> UFC/mL. O estudo foi realizado a partir de alíquotas de 400 mL de leite integral reconstituído a 12% e esterilizado a 121°C/ 15 minutos, inoculado com as três populações determinadas e incubados a 2°C, 4°C, 8°C. A contagem de *Pseudomonas* spp foi à ágar base para *Pseudomonas* com suplemento CFC (30°C/ 48 h). A proteólise foi determinada através do método de Kjeldahl, Nitrogênio total, Nitrogênio não caseico (NNC) e nitrogênio não proteico (NNP), utilizando os índices de proteólise primária e secundária. A menor velocidade de multiplicação do inóculo de 10<sup>2</sup> UFC de *Pseudomonas* spp. /mL foi observado a 2°C e o tempo máximo ideal de estocagem para não haver aumento na população foi de 48 horas. Em populações iniciais de 10<sup>5</sup> UFC de *Pseudomonas* spp, as temperaturas mais baixas não retardaram o tempo de crescimento do micro-organismo. Já no inóculo de 10<sup>6</sup>UFC/mL, o tempo e a temperatura não influenciaram (p>0,05) na multiplicação da população. Assim, independente da população inicial de *Pseudomonas* spp, a temperatura de incubação influenciou na multiplicação bacteriana somente a partir de 96 horas de estocagem do leite. Verificou-se também que, de maneira geral, independente do inóculo inicial testado, não houve diferença (p> 0,05) dentro da mesma temperatura de incubação e do mesmo tempo de estocagem. Os índices de proteólise primária observadas neste estudo diminuíram somente após 96 horas de estocagem, mantendo-se relativamente estáveis ao longo das 72 horas, independentemente do inóculo inicial e da temperatura de armazenamento. Ainda, a temperatura, dentro do mesmo tempo de estocagem, não teve efeito no índice de proteólise primária. O tempo de incubação para o índice de proteólise secundária não teve efeito, independente da temperatura de estocagem e do inóculo inicial testado. Quanto à influência da temperatura de estocagem na proteólise secundária, foi observada (p< 0,05) somente nos inóculos 10<sup>2</sup> e 10<sup>6</sup>UFC/mL com 48 horas de estocagem, onde a proteólise secundária foi maior a 8°C quando comparada com as menores temperaturas testadas (4°C e 2°C). Ao analisarmos os inóculos na mesma temperatura e tempo, pode-se observar que independente do inoculo inicial de *Pseudomonas* spp. Testado, o índice de proteólise foi o mesmo. Assim, a contaminação do leite com *Pseudomonas* spp, independente da população inicial e forma de estocagem, acarretará prejuízos à composição proteica do leite, favorecendo defeitos de sabor e redução no rendimento industrial.

**Palavras-chave:** Lácteo. Protease. Fatores extrínsecos. Gram negativo.



RIBEIRO, A. C. P. **Proteolytic behavior of *Pseudomonas* spp. isolated from refrigerated raw milk.** 2015. 42f. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados – UNOPAR- Unidade Piza, Londrina, 2015.

### ABSTRACT

knowledge of proteolytic behavior of *Pseudomonas* spp. at different times and temperatures it is important to determine the best storage conditions of refrigerated raw milk. aimed to evaluate for 96 hours, the multiplication of capacity and proteolysis of *Pseudomonas* spp. strains. isolated from refrigerated raw milk producers of londrina pr and incubated at 2°C, 4°C and 8°C. the strains to be tested have the genre confirmed by reaction technique polymerase chain (pcr). they were then recovered inoculated in 200 mL of whole milk reconstituted to 12% (21°C /48 h). the population of *Pseudomonas* was determined and decimal dilutions were performed up to 10<sup>2</sup>, 10<sup>5</sup> and 10<sup>6</sup>CFU /mL. the study was conducted from rates of 400 mL of whole milk reconstituted to 12% and sterilized at 121°C / 15 minutes, inoculated with the three certain populations and incubated at 2°C, 4°C, 8°C. *Pseudomonas* spp count agar was the basis for *Pseudomonas* CFC supplement (30°C / 48 h). The proteolysis was determined by the kjeldahl method, total nitrogen, nitrogen not caseico (NNC) and non-protein nitrogen (NPN) using the contents of primary and secondary proteolysis. The lowest multiplication speed of inoculum of 10<sup>2</sup> CFU *Pseudomonas* spp. / ml was observed at 2°C and the optimal maximum storage time for no increase in the population was 48 hours. In initial population of 10<sup>5</sup>CFU of *Pseudomonas* spp. Lower temperatures did not slowed the rise time of the microorganism. I inoculum 10<sup>6</sup> CFU / mL, time and temperature do not affect (p> 0.05) in the multiplication of the population. Therefore, regardless of the initial population of *Pseudomonas* spp. incubation temperature influenced only bacterial growth from a 96 hour milk storage. It was also found that, in general, regardless of initial inoculum tested, there was no difference (p> 0.05) within the same incubation temperature and the same storage time. The primary proteolysis observed in this study, decreased only after 96 hours of storage, remained relatively stable over 72 hours, regardless of the initial inoculum and the storage temperature. Also, the temperature within the same storage time had no effect on proteolysis primary index. The incubation time for the secondary ripening index had no effect, regardless of storage temperature and the initial inoculum tested. As the influence of storage temperature on the secondary proteolysis was observed (p <0.05) only in inocula 10<sup>6</sup> CFU 10<sup>2</sup> and / mL with 48 hours of storage, where the secondary proteolysis to 8°C was higher compared with the lower temperatures tested ( 4°C and 2°C). By analyzing the inoculum at the same temperature and time, it can be seen that regardless of the initial inoculum of pseudomonas spp. tested, the rate of proteolysis was the same. thus, the contamination of milk with *Pseudomonas* spp. independent of the initial population and form of storage, will cause losses to the protein content of milk composition, favoring flavor defects and reduced industrial output.

**Key words:** Milk. Protease. Extrinsic factors. Gram negative.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	09
<b>2 OBJETIVO</b> .....	11
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
3.1 QUALIDADE DO LEITE.....	12
3.2 MICROBIOTA PSICROTRÓFICA .....	13
3.3 ENZIMAS EXTRACELULARES .....	14
3.4 PROTEASES BACTERIANAS .....	15
<b>4 ARTIGO</b> .....	18
<b>5 CONCLUSÃO GERAL</b> .....	37
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	38

## 1 INTRODUÇÃO

O leite, por tratar-se de um alimento perecível, merece atenção especial na sua produção, beneficiamento, comercialização e consumo, pois estará sempre sujeito a uma série de alterações (FURTADO et al., 2004). Segundo Nero et al. (2005), a adoção do resfriamento do leite nas propriedades e a granelização da coleta são importantes medidas para melhorar a qualidade microbiológica do leite. De acordo com a Instrução Normativa n.62 de 2011 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o leite deve ser resfriado por expansão direta até temperatura igual ou inferior a 4°C, no máximo em 3h após o término da ordenha e deve chegar à indústria beneficiadora em até 48 horas a 10°C (BRASIL, 2011).

A estocagem do leite cru refrigerado por períodos maiores que 48 horas é um problema para a qualidade do leite e, principalmente, de derivados, pois aumenta a contagem de micro-organismos psicotróficos, refletindo negativamente na qualidade do leite cru refrigerado (SANTOS et al., 2009). Os psicotróficos encontrados no leite são, em sua maioria, Gram negativos, provenientes do meio ambiente e equipamentos de ordenha (CATANIO et al., 2012; FAGUNDES et al., 2006; SANTANA et al., 2001; SILVA et al., 2011; YAMAZI et al., 2010) apresentando aumento na população quando o leite é produzido em más condições higiênicas (GUERREIRO et al., 2005; SILVA et al., 2011; VALLIN et al., 2009; VIDAL-MARTINS et al., 2005; YAMAZI et al., 2010). Os psicotróficos, a partir de uma população mínima entre  $10^6$  e  $10^7$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL (COSTA et al., 2002; FURTADO, 1999; MAHIEU, 1991; MUIR, 1996), produzem proteases e/ou lipases extracelulares termorresistentes (ARCURI et al., 2008; COUSIN, 1982; CRAVEN; MACAULEY, 1992; MUIR, 1996; TEBALDI et al., 2008; VIDAL-MARTINS et al., 2005), resultando na perda de qualidade e na redução de vida útil do leite e de outros produtos lácteos, pois podem provocar alterações sensoriais, perda de consistência e geleificação (MU et al., 2009; NÖRNBERG, TONDO; BRANDELLI, 2009).

Espécies de *Pseudomonas* representam as bactérias Gram negativa mais comumente isolada em leite cru refrigerado (ARCURI et al., 2008; COUSIN, 1982; FAGUNDES et al., 2006; PINTO et al., 2006; SILVA, 2005;

SORHAUNG;STEPANIAK, 1997), por apresentar melhor capacidade de multiplicação em ambiente refrigerado quando comparadas a outras bactérias Gram negativas (KUMARESAN et al., 2007; SMITHWELL; KAILASAPATHY, 1995).

A produção enzimática de proteases, lipases e fosfolipases pelos micro-organismos está relacionada com a temperatura, fase de crescimento do micro-organismo, disponibilidade de oxigênio e composição do meio, sendo sua atividade dependente de temperatura, pH e concentração do substrato (NUÑEZ; NUÑEZ, 1983). A produção de enzimas por espécies de *Pseudomonas* ocorre principalmente no final da fase log de crescimento celular (MAHIEU, 1991) e em temperaturas mais baixas que aquelas ótimas para a multiplicação do micro-organismo (MAHIEU, 1991; SANTANA et al., 2001).

Apesar da importância dos psicrotróficos na qualidade do leite cru e dos derivados lácteos, o MAPA não estipula um padrão de identidade e qualidade do leite baseado na população destes micro-organismos. Contudo, é considerado um risco a utilização de leite em que a população de psicrotróficos tenha excedido  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL, pois, nesse caso, é grande a possibilidade da presença de enzimas hidrolíticas extracelulares (SHIRAI, 2010).

Assim, o estudo do comportamento proteolítico de cepas de *Pseudomonas* spp. em diferentes populações e temperaturas ao longo de 96h, é importante para determinar as melhores condições de estocagem do leite cru refrigerado, a fim de prolongar a vida útil do leite processado e de seus derivados.

## **2 OBJETIVO**

Avaliar a capacidade de multiplicação e de proteólise de diferentes populações de *Pseudomonas* spp. ( $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL) em leite em pó reconstituído e incubado a 2°C, 4°C e 8°C, durante 96h.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 QUALIDADE DO LEITE

O leite produzido no Brasil apresenta, de maneira geral, baixa qualidade (CATANIO et al., 2012; LANGONI et al., 2011; MARTINS et al., 2008; MELO et al., 2010; NERO et al., 2009). Fatores como a qualidade bacteriológica das águas, utensílios higienizados inadequadamente, problemas com a sanidade dos ordenhadores e dos animais, contribuem, de modo decisivo, para a carga microbiológica do leite (YAMAZI et al., 2010).

Visando a melhoria da qualidade do leite, foi regulamentada a sua refrigeração nas propriedades, o transporte a granel em caminhões isotérmicos e padrões mínimos de contagem bacteriana total e de células somáticas pelo MAPA (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011).

De acordo com a regulamentação em vigor (BRASIL, 2011) o leite armazenado em tanque de refrigeração por expansão direta deve ter temperatura igual ou inferior a 4°C e em tanques de refrigeração por imersão a temperatura deve ser igual ou inferior a 7°C, em um tempo máximo de três horas após o término da ordenha. Quando o leite é recebido no estabelecimento beneficiador sua temperatura pode ser igual ou inferior a 10°C, sendo o tempo máximo de 48 horas para a chegada do leite cru na indústria (BRASIL, 2002; BRASIL, 2011).

Porém, a estocagem do leite cru refrigerado por períodos maiores que 48 horas são um problema para a qualidade do leite e principalmente de derivados, pois aumenta a contagem de micro-organismos psicotróficos (SANTOS et al., 2009), que têm a capacidade de se multiplicar a 7°C ou menos (FRANK et al., 1992). Estes micro-organismos são provenientes do meio ambiente e equipamentos de ordenha (FAGUNDES et al., 2006; SANTANA et al., 2001; SILVA et al., 2011; YAMAZI et al., 2010) e produzem enzimas termorresistentes que comprometem a qualidade do leite cru refrigerado e dos derivados. Assim, mesmo nas temperaturas de refrigeração, deve ocorrer perda da qualidade do leite se não for realizado um controle efetivo da contaminação inicial (MARTINS et al., 2004; SANTOS et al., 2009) através de boas práticas de ordenha (GUERREIRO et al., 2005; SILVA et al., 2011; VALLIN et al., 2009; YAMAZI et al., 2010).

A população de psicrotróficos no leite cru refrigerado varia com a temperatura e o tempo de estocagem. Pinto et al. (2004) avaliaram amostras de leite inoculadas com, aproximadamente,  $10^4$  UFC/ml de *P. fluorescens* incubadas a 2, 4, 7 e 10°C e constataram que as temperaturas de 2°C e 4°C foram efetivas para o controle do crescimento de *P. fluorescens* após 24 horas de incubação. Após 48 horas, a população dessa bactéria foi de  $10^4$  UFC/mL a 2°C,  $10^5$  UFC/mL a 4°C,  $10^6$  UFC/mL a 7°C e de  $10^7$  UFC/mL a 10°C. Esses autores afirmaram que mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas pela legislação pode ocorrer a perda de qualidade da matéria-prima se não for realizado controle efetivo da contaminação inicial. Kumaresan et al. (2007) encontraram resultados semelhantes ao comparar o crescimento de psicrotróficos em diferentes temperaturas de incubação. Para os autores, 2°C foi a temperatura que apresentou o menor crescimento bacteriano significativo, além de menores atividades proteolítica e lipolítica.

Embora o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento não estipule um padrão de identidade e qualidade do leite, baseado na contagem de psicrotróficos, considera-se que em condições sanitárias adequadas, as bactérias psicrotróficas representam menos de 10% da microbiota total do leite cru; no manejo higiênico não satisfatório, os micro-organismos psicrotróficos podem ultrapassar 75% (NIELSEN, 2002).

### 3.2 MICROBIOTA PSICROTRÓFICA

As bactérias psicrotróficas encontradas no leite não constituem um grupo taxonômico específico, sendo incluídos pelo menos 15 gêneros pertencentes aos grupos de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Os principais gêneros envolvidos na alteração do leite são *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Serratia*, *Corynebacterium* e *Clostridium* (SHIRAI, 2010).

Os psicrotróficos Gram negativos são os mais comumente isolados em leite cru refrigerado (CATANIO et al., 2012), sendo o gênero *Pseudomonas* o principal associado a deterioração deste produto (ARCURI et al., 2008; PINTO et al., 2006; SANTOS et al., 2010; SILVA, 2005) em razão do curto tempo de geração em temperaturas de refrigeração (SANTOS et al., 2010; SHIRAI, 2010). Arcuri et al. (2008) avaliaram 108 cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de leite cru e 60,57%

apresentaram tanto atividade de proteólise como de lipólise. Também verificaram que do total de cepas psicrotróficas isoladas de leite cru refrigerado, 81.2% eram Gram negativas, e, entre aquelas cujas espécies foram identificadas, 58.4% era *P. fluorescens*, a psicrotrófica Gram negativa mais comumente encontrada, caracterizada por um crescimento rápido e intensa capacidade proteolítica (ARCURI et al., 2008; GLORIA et al., 2011).

### 3.3 ENZIMAS EXTRACELULARES

O metabolismo dos micro-organismos psicrotróficos em temperaturas inferiores a 10°C torna-se predominantemente lipo-proteolítico, expressando-se pela produção de enzimas intra e extracelulares termorresistentes (ARCURI et al., 2008; COUSIN, 1982; CRAVEN; MACAULEY, 1992; MONTANHINI, 2012; MUIR, 1996; TEBALDI et al., 2008; VIDAL- MARTINS et al., 2005).

Um número mínimo de micro-organismos psicrotróficos é necessário para que a ação das enzimas extracelulares (proteases e lipases) produzidas por estas bactérias possam promover alterações no leite e seus derivados, valores estes que variam entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/ml (FURTADO, 1999; MAHIEU, 1991; MUIR, 1990). Segundo Shirai (2010), é considerada inviável a utilização de leite em que a contagem de psicrotróficos tenha excedido  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL, pois, nesse caso, é grande a possibilidade da presença de enzimas hidrolíticas extracelulares durante a fase log.

Wiking et al. (2002) e Haryani et al. (2003) detectaram aumento da proteólise após estocagem do leite a 2, 4 e 8°C, mesmo com baixa contagem de bactérias psicrotróficas.

A produção enzimática de proteases, lipases e fosfolipases está relacionada à temperatura, fase de crescimento do microrganismo, disponibilidade de oxigênio e composição do meio, sendo sua atividade dependente de temperatura, pH e concentração do substrato (NUÑEZ e NUÑEZ, 1983). A produção destas enzimas por cepas de *Pseudomonas*, em refrigeração ocorre principalmente no final da fase log de crescimento celular (MAHIEU, 1991) e na fase estacionária, sendo a sua síntese maior abaixo da temperatura ótima de crescimento que é de 20 a 30°C. (ARCURI, 2003). De acordo com Sorhaug e Stepaniak (1997), *Pseudomonas fluorescens* sintetiza seis vezes mais proteases a 3°C que a 29°C. Já de acordo com Arcuri et al. (2008), do total de 94 cepas de *P. fluorescens* isoladas em leite cru refrigerado, todas foram lipolíticas a 4°C,



7°C, 10°C e 21°C, sendo que a atividade proteolítica a estas temperaturas foi verificada, respectivamente, em 66%, 74,5%, 88,3% e 95,7% das estirpes.

As proteases produzidas por *Pseudomonas* são ativadas em temperatura e pH baixos (SORHAUNG e STEPANIAK, 1997). Segundo Mahieu (1991), o pH ótimo para proteases é 7,8, ocorrendo a atividade máxima entre 40°C e 45°C, mantendo-se ativas mesmo em temperatura e pH inferiores. As lipases são produzidas em maior quantidade em temperatura entre 20°C e 21°C (MAHIEU, 1991), podendo manter sua atividade em 50% a 0°C.

Os problemas ou defeitos atribuídos a *Pseudomonas* spp. são rancidez, sabor amargo, geleificação em leite UHT, instabilidade térmica do leite, instabilidade do leite ao etanol, resultado falso-positivo na pesquisa por fraude de leite com soro por meio da dosagem do ácido siálico e redução no rendimento na fabricação de queijos (ARCURI et al., 2008).

### 3.4 PROTEASES BACTERIANAS

A proteólise em leite pode ser causada por proteases naturais deste alimento (plasmina) ou por enzimas produzidas por micro-organismos psicrotóxicos durante a estocagem sob refrigeração. Estes dois tipos de enzimas diferem entre si pela especificidade nas proteínas do leite. As proteases produzidas pelos psicrotóxicos são geralmente metaloproteinases, isto é, precisam de um íon como o cálcio, para atingir sua atividade ótima. A plasmina tem o aminoácido serina como sítio ativo (NIELSEN, 2002).

A plasmina é a principal enzima proteolítica natural do leite fresco com baixa Contagem de células Somáticas e baixa contagem bacteriana. Em casos de leite mastítico verifica-se um aumento na concentração de plasmina. Esta enzima é derivada do seu precursor inativo, o plasminogênio. O leite tem quatro vezes mais plasminogênio do que plasmina e ambos são associados à micela de caseína. Qualquer fator que converta plasminogênio a plasmina pode ter um impacto negativo sobre a proteína do leite, uma vez que esta hidrolisa prontamente  $\alpha$ - e  $\beta$ -caseínas (FOX E MCSWEENEY, 1998).

A ação das proteases bacterianas, principalmente do gênero *Pseudomonas*, é similar à da quimosina, enzima empregada na coagulação enzimática do leite para obtenção de queijo. Esta atua sobre a  $\kappa$ -caseína, causando a ruptura do

enlace Phe105-Met106, provocando a desestabilização e desnaturação das micelas de caseína, levando à formação de dois peptídeos: a para- $\kappa$ -caseína, que permanece nas micelas de caseína, e o glicomacropéptido, formado pelos resíduos de aminoácidos 106 a 169 (TULLIO, 2007).

O acúmulo e a ação de enzimas extracelulares, proteolíticas e lipolíticas, são normalmente correlacionados com a deterioração da qualidade do leite e dos produtos lácteos (tabela 1) (SØRHAUG E STEPANIAK, 1997). As proteases produzidas por psicotróficos são capazes de degradar kapa, alfa s-1, e beta caseínas, todas ligadas a geleificação do leite UHT (COUSIN, 1982). Segundo Santos et al. (2009), a atividade proteolítica não está relacionada somente com a alta contagem de micro-organismos psicotróficos; o tipo da bactéria que se encontra presente e a atividade de enzimas endógenas no leite são citados como fatores de importância.

A geleificação perda de fluidez do leite com formação de gel, pode ser causada por protease natural do leite (plasmina), quando o leite cru é de boa qualidade, ou por proteases de psicotróficos, quando o leite cru é de baixa qualidade (FOX e McSWEENEY, 1988).

Quando o leite é mantido em temperatura de refrigeração 4°C, uma de suas características é a dissociação das caseínas da micela, especialmente da  $\beta$ -caseína (FOX E MCSWEENEY, 1998). Nesta condição a ação das proteases é favorecida e responsável pela liberação de peptídeos que podem causar sabor desagradável no leite pasteurizado.

**Tabela 1.** Efeito da multiplicação de psicotróficos em leite cru antes do tratamento térmico, sobre a qualidade dos produtos lácteos e leites processados.

Produto	População de psicotróficos no leite cru (Log UFC/ml)	Efeito sobre a qualidade do produto
Leite UHT	5,9 6,9- 7,2	Geleificação após 20 semanas. Geleificação após 2-10 semanas desenvolvimento gradual de sabor amargo, sujo e envelhecido.
Leite em pó	6,3- 7,0	Redução da capacidade térmica e aumento da capacidade de formar espuma em leite reconstituído.
Leite pasteurizado	5,5	Sabor de qualidade inferior quando comparado a leite pasteurizado produzido com outro leite sem psicotróficos.
Queijos duros	6,5- 7,5 7,5- 8,3	Rancidez Alteração de sabor, principalmente rancidez e sabor de sabão. Redução de rendimento na fabricação
Queijo Cottage	5,0-7,8	Sabor amargo
Manteiga	Não determinado	Desenvolvimento mais rápido de rancidez em manteiga feita a partir de leite refrigerado do que de leite fresco, lipase de <i>Pseudomonas</i> estava ativa na manteiga congelada.
Iogurte	7,6- 7,8	Gosto amargo, sabor sujo ou de fruta, dependendo da microbiota.

Dados compilados por Sorhaug e Stepaniak (1997)

**ARTIGO****COMPORTAMENTO PROTEOLÍTICO DE *PSEUDOMONAS* SPP. ISOLADAS DE LEITE CRU REFRIGERADO**

Ana Cristina Pinesso RIBEIRO<sup>1</sup>, Lina Casale ARAGON-ALEGRO<sup>2</sup>, Elsa Helena Walter de SANTANA<sup>3</sup>, Cínthia Hoch Batista de SOUZA<sup>4</sup>, Joice Sifuentes dos SANTOS.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Mestranda em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, UNOPAR. Av Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: ana.pinesso@gmail.com.

<sup>2</sup>Bióloga, doutora em Ciência dos Alimentos pela Univerisade de São Paulo, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, UNOPAR. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: lcalegro@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Médica veterinária, doutora em Ciência Animal pela Universidade Estadual de Londrina, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, UNOPAR. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail:elsahws@hotmail.com. (autora para correspondência).

<sup>4</sup>Bióloga, doutora em Tecnologia de Alimentos pela Universidade de São Paulo, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, UNOPAR. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail:cinthiahoch@yahoo.com.br.

<sup>5</sup>Farmacêutica, doutora em Ciencia dos Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, UNOPAR. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil.E-mail: joice.sifuentes@gmail.com.

## RESUMO

Objetivou-se avaliar durante 96 horas, a capacidade de multiplicação e de proteólise, de cepas de *Pseudomonas* spp. isoladas de leite cru refrigerado e incubadas em 2°C, 4°C e 8°C. As cepas tiveram o gênero confirmado pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Em seguida, foram recuperadas com inoculação em leite integral reconstituído a 12% (21°C/48 h). A população de *Pseudomonas* foi determinada e diluições decimais foram realizadas até 10<sup>2</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> UFC/ ml. O estudo foi realizado a partir de alíquotas de 400 mL de leite integral reconstituído a 12% (121°C/ 15 minutos), inoculado com as três populações determinadas e incubados a 2°C, 4°C, 8°C. A contagem de *Pseudomonas* spp foi à ágar base para *Pseudomonas* com suplemento CFC (30°C/ 48 h). A proteólise foi determinada através do método de Kjeldahl, Nitrogênio total, Nitrogênio não caseico (NNC) e nitrogênio não proteico (NNP), utilizando os índices de proteólise primária e secundária. A menor velocidade de multiplicação do inóculo de 10<sup>2</sup> UFC de *Pseudomonas* spp. /mL foi observado a 2°C e o tempo máximo ideal de estocagem foi de 48 horas. Em populações iniciais de 10<sup>5</sup> UFC de *Pseudomonas* spp, as temperaturas mais baixas não retardaram o tempo de crescimento do micro-organismo. Já no inóculo de 10<sup>6</sup>UFC/mL, o tempo e a temperatura não influenciaram (p>0,05) no crescimento. Assim, independente da população inicial de *Pseudomonas* spp, a temperatura de incubação influenciou na multiplicação bacteriana somente a partir de 96 horas. Verificou-se também que, independente do inóculo inicial testado, não houve diferença (p> 0,05) dentro da mesma temperatura de incubação e do mesmo tempo de estocagem. Os índices de proteólise primária diminuíram somente após 96 horas, mantendo-se relativamente estáveis ao longo das 72 horas, independentemente do inóculo inicial e da temperatura de armazenamento. Ainda, a temperatura, dentro do mesmo tempo de estocagem, não teve efeito no índice de proteólise primária. O tempo de incubação para o índice de proteólise secundária não teve efeito, independente da temperatura de estocagem e do inóculo inicial testado. Quanto à influência da temperatura de estocagem na proteólise secundária, foi observada (p< 0,05) somente nos inóculos 10<sup>2</sup> e 10<sup>6</sup>UFC/mL com 48 horas, onde a proteólise secundária foi maior a 8°C que a 4°C e 2°C. Ao analisarmos os inóculos na mesma temperatura e tempo, pode-se observar que o índice de proteólise foi o mesmo. Assim, a contaminação do leite com *Pseudomonas* spp, independente da população inicial e forma de estocagem, acarretará prejuízos à composição proteica do leite, favorecendo defeitos de sabor e redução no rendimento industrial.

**Palavras-chave:** Lácteo. Protease. Fatores extrínsecos. Gram negativo.

## 1 INTRODUÇÃO

O leite, por tratar-se de um alimento perecível merece atenção especial na sua produção, beneficiamento, comercialização e consumo, pois estará sempre sujeito a alterações (FURTADO et al., 2004). A adoção do resfriamento do leite nas propriedades e a granelização da coleta são importantes medidas para melhorar a qualidade microbiológica do leite (NERO et al., 2005). De acordo com a Instrução Normativa n.62 de 2011 preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), desde 2011 o leite deve ser resfriado por expansão direta até temperatura igual ou inferior a 4°C no máximo em 3hs após o término da ordenha e deve chegar à indústria beneficiadora em até 48 horas a 10°C (BRASIL, 2011).

A estocagem do leite cru refrigerado por períodos maiores que 48 horas é um problema para sua qualidade e, principalmente, de seus derivados, pois um aumento da população de micro-organismos psicotróficos, refletindo negativamente na qualidade deste leite (SANTOS et al., 2009). Os psicotróficos encontrados no leite são em sua maioria Gram negativos, provenientes do meio ambiente e equipamentos de ordenha (CATANIO et al., 2012; FAGUNDES et al., 2006; SANTANA et al., 2001; SILVA et al., 2011; YAMAZI et al., 2010) apresentando aumento na população quando o leite é produzido em más condições higiênicas (GUERREIRO et al., 2005; SILVA et al., 2011; VALLIN et al., 2009; VIDAL-MARTINS et al., 2005; YAMAZI et al., 2010). Os psicotróficos, a partir de uma população mínima entre  $10^6$  e  $10^7$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL (COSTA et al., 2002; FURTADO, 1999; MAHIEU, 1991; MUIR, 1996), podem produzir proteases e/ou lipases extracelulares termorresistentes (ARCURI et al., 2008; COUSIN, 1982; CRAVEN; MACAULEY, 1992; MUIR, 1996; TEBALDI et al., 2008; VIDAL- MARTINS et al., 2005), resultando na perda de qualidade e na redução de vida útil do leite e de outros produtos lácteos, devido a alterações sensoriais, perda de consistência e geleificação (MU et al., 2009; NÖRNBERG, TONDO; BRANDELLI, 2009).

*Pseudomonas* representa a espécie psicotrófica Gram negativa mais comumente isolada em leite cru refrigerado (ARCURI et al., 2008; COUSIN, 1982; FAGUNDES et al., 2006; PINTO et al., 2006; SILVA, 2005; SORHAUNG;STEPANIAK, 1997) devido a sua melhor capacidade de multiplicação em ambiente refrigerado comparada às bactérias Gram negativas (KUMARESAN et al., 2007; SMITHWELL; KAILASAPATHY, 1995).

A produção enzimática de proteases, lipases e fosfolipases pelas *Pseudomonas* está relacionada com a temperatura, disponibilidade de oxigênio e composição do meio, além da fase de crescimento do micro-organismo, sendo sua atividade dependente de temperatura, pH e concentração de substrato (NUÑEZ; NUÑEZ, 1983). A produção de enzimas por cepas de *Pseudomonas* ocorre principalmente no final da fase log de crescimento celular (MAHIEU, 1991) e a temperaturas mais baixas que aquelas ótimas para a multiplicação do micro-organismo (MAHIEU, 1991; SANTANA et al., 2001).

Apesar da importância dos psicrotróficos na qualidade do leite cru e dos derivados lácteos, o MAPA não estipula um padrão de identidade e qualidade do leite baseado na contagem destes micro-organismos. Contudo, é considerado um risco a utilização de leite em que a população de psicrotróficos tenha excedido  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL, pois, nesse caso, é grande a possibilidade da presença de enzimas hidrolíticas extracelulares (SHIRAI, 2010).

O tempo de estocagem do leite refrigerado em temperaturas recomendadas até 10°C representa um fator importante para qualidade do leite e seus derivados e, conforme rotina de empresas de beneficiamento, o armazenamento chega a ser de até 96h em média após a ordenha. Desta maneira neste trabalho objetivou-se avaliar a capacidade de multiplicação e de proteólise de diferentes populações de *Pseudomonas* spp. ( $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL) em leite em pó reconstituído e incubado a 2°C, 4°C e 8°C, durante 96h.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparo do inóculo

As cepas de *Pseudomonas* spp. Utilizadas foram isoladas de amostras de leite cru refrigerado, coletadas no período de 11 de junho de 2013 e 24 de fevereiro de 2014, de cinco produtores do município de Londrina-PR, para estudo da avaliação da população de *Pseudomonas* spp e *P. fluorescens* em leite cru refrigerado, apresentado em Dissertação de Mestrado de Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná (ALMEIDA, 2014). As cepas foram mantidas em caldo Brain Heart Infusion (B.H.I), (Himedia, Mumbai, Índia) com 40% de glicerol, a 0°C no

laboratório de microbiologia da Universidade Norte do Paraná, devidamente identificadas.

#### 2.1.1 Confirmação do gênero *Pseudomonas* spp.

Para confirmação do gênero *Pseudomonas* spp. Oito cepas foram identificadas pelo método de extração de DNA (ácido desoxirribonucleico) genômico bacteriano, utilizando o Kit “Wizard Genomic DNA Purification Kit Promega” (Promega Corporation., Madison, USA) e realizado a PCR (Polymerase Chain Reaction)

#### 2.1.2 Extração de DNA

Foi pipetado 1 mL da cultura bacteriana em tubo de 1,5mL, centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos e desprezado o sobrenadante. Em seguida foi adicionado 600µl de solução de Lise e ressuspendido, incubado em banho-maria a 80°C por 5 minutos e resfriado a temperatura ambiente. Depois, foi adicionado 3µL de solução de RNase e homogeneizado, acrescentado 200µL de solução de precipitação e agitado vigorosamente por 20 segundos, novamente incubado no gelo por 5 minutos e centrifugado a 13.000 rpm por 3 minutos. Foi transferido 700µL do sobrenadante para novo tubo, adicionado 600µL de isopropanol, homogeneizado por inversão lentamente e centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e retirado o excesso de líquido invertendo o tubo sobre papel absorvente por 15 minutos. Foi adicionado 100µL de solução de hidratação e incubado a 4°C *Over night*.

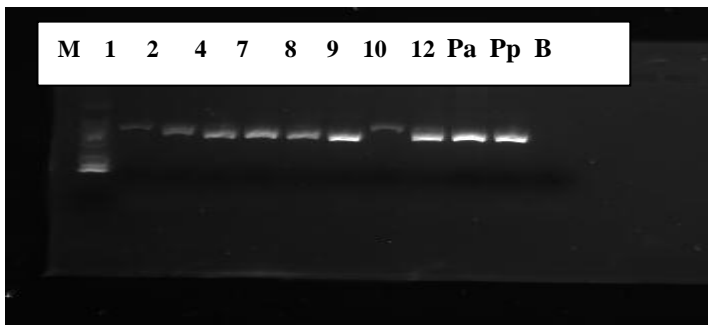
Para realização da PCR, protocolo descrito por Louws et al (1994) com modificações, cada amostra foi preparada com um mix de: água 15,8µl, DNA: 2µl, tampão: 2,5µl, mgcl<sub>2</sub>(25mM): 1,5µl, dntPs(2,5mM): 2,0µl, PGSF: 0,5µl. Primers PGSR: 0,5µl e Taq (enzima): 0,2µl. Foi colocado em cada tubo 23µl do mix + 2µL de cada amostra correspondente. Estas amostras foram levadas ao termo ciclador, obedecendo ao seguinte ciclo: 95°C- 2 minutos, 95°C- 40 segundos, 54°C- 30 segundos, 72°C- 45 segundos, 72°C- 7 minutos, este ciclo é repetido 39X.

Depois de concluído o ciclo, as amostras foram retiradas do aparelho, enumerados novos tubos de 1,5mL e adicionados 7µL de cada amostra mais 7µL de solução tampão. Foram aplicadas 10µL de cada amostra no gel de agarose e submetidas



por aproximadamente 3 a 4 horas à eletroforese gel. Após, foi visualizado sob luz ultravioleta em trans-iluminador, onde foi verificada a presença de fragmentos amplificados, analisados com parâmetros de similaridade.

Figura 1- Perfil eletroforético de cepas de *Pseudomonas* spp.



M: Marcador padrão molecular 1kb DNA  
 1,2,4,7 a 10 e 12: amostras  
 B: Branco  
 Pp: *Pseudomonas putida* (Controle positivo)  
 Pa: *Pseudomonas aeruginosa* (Controle positivo)

### 2.1.3 Recuperação das cepas e Determinação da população de *Pseudomonas* spp.

Das 8 cepas confirmadas para o gênero *Pseudomonas* spp, três foram utilizadas para o experimento.

Realizou-se a recuperação das cepas de *Pseudomonas* spp. Estocadas a 0° C inoculando-as em 200 mL (SILVA et al., 2009) de leite desnatado em pó (Ninho, Nestlé, São Paulo, Brasil) reconstituído a 12% (SANTOS et al., 2010) e posteriormente incubado a 21°C/48 hs. Após este tempo a população de *Pseudomonas* spp. foi determinada através do plaqueamento em superfície, a ágar base para *Pseudomonas* com suplemento CFC (Himedia, Mumbai, Índia), seguido de incubação a 30°C durante 48h (APHA; FAGUNDES et al., 2006). A partir da definição da população, foram realizadas diluições decimais em solução salina 0,85% até atingir as populações de 10<sup>2</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> UFC/ ml. Cada diluição selecionada foi imediatamente utilizada como cultura para o experimento.

### 2.2 Capacidade de Multiplicação e de Proteólise

Alíquotas de 400 mL de leite integral em pó (Ninho, Nestlé, São Paulo, Brasil) reconstituído a 12% e esterilizado a 121°C/ 15 min, foram adicionadas separadamente, de 4 ml dos inóculos de *Pseudomonas* previamente preparados ( $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/ mL) e incubadas a 2°C, 4°C e 8°C, durante 96h. As análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas a cada 24h em duplicata e triplicata, respectivamente. Foram realizados três experimentos, em cada um utilizando uma das cepas selecionadas.

### 2.2.1 Enumeração de *Pseudomonas* spp.

As amostras de leite inoculadas com *Pseudomonas* foram diluídas em solução salina 0,85% e plaqueadas em superfície em *Pseudomonas* Ágar Base, com adição de suplemento Cefalotina, Ácido Fusídico, Ceftriaxona (CFC) e incubadas a 30° C por 48 horas (FAGUNDES et al., 2006).

### 2.2.2 Avaliação de proteólise

As frações proteicas foram determinadas pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995), através do teor de nitrogênio total (NT), nitrogênio não caseico (NNC) e nitrogênio não proteico (NNP). O NNP foi avaliado a partir do filtrado após precipitação do leite pela adição de ácido tricloroacético (TCA 24 %) e o NNC foi avaliado a partir do filtrado após precipitação do leite ao ponto isoelétrico da caseína (pH 4,6).

O índice de proteólise primária foi determinado a partir da relação NNC (Nitrogênio não caseico) /NT (Nitrogênio Total) e o de proteólise secundária pelo NNP (Nitrogênio não proteico) /NT.

Foram utilizadas as seguintes equações:

$$1) \%NNC = 1,4007 \times (V_a - V_b) \times N \times f_c \times 2 \times 0,994 / p_a$$

Onde

V<sub>a</sub>= volume de titulante gasto p/ titular a amostra

V<sub>b</sub>= volume de titulante gasto p/ titular o branco

N = normalidade do HCl f<sub>c</sub> = fator de correção do HCl utilizado

pa= peso de amostra, em gramas

0,994 = correção do volume de precipitado, considerando leite integral.

2) **Proteólise primária**=  $NNC/NT \times 100$

3)  $\%NNP = V.N.Fc. 1,4008 \times 20 / pa. Pb$

Onde:

V, fc, N = HCl utilizado na titulação.

pa e pb = peso das alíquotas, em g.

20 = diluição

4) **Proteólise secundária**=  $NNP/NT \times 100$

### 2.3 Análise dos Dados

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), com auxílio do programa Statistica (STATSOFT, 2008).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 INFLUÊNCIAS DO TEMPO E DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO NA MULTIPLICAÇÃO DE DIFERENTES POPULAÇÕES DE *PSEUDOMONAS* SPP. INOCULADAS EM LEITE INTEGRAL.

De acordo com a tabela 2, observando cada inóculo em 3 temperaturas (2°C, 4°C e 8°C) ao longo de 96 h, verificou-se que a população inicial de *Pseudomonas* spp. de  $10^2$  UFC/mL, quando estocada a 2°C, apresentou-se estável ( $p > 0,05$ ) até 48 horas de incubação, seguido da multiplicação bacteriana a partir de 72 horas ( $p < 0,05$ ). Já nas temperaturas de 4°C e 8°C, foi observado aumento populacional com 48 horas ( $p < 0,05$ ) de incubação, mantendo-se estável ao longo das 96 horas estudadas. Assim, a menor velocidade de multiplicação do inóculo de  $10^2$  UFC de *Pseudomonas* spp. /mL foi observado a 2°C e o tempo máximo ideal de estocagem para não haver aumento na população foi de 48 horas. Santos et al (2009) relataram que a estocagem do leite cru refrigerado por períodos maiores que 48 horas são um problema para a qualidade do

leite e principalmente de derivados, pois aumenta a contagem de micro-organismos psicrotróficos, verificando um aumento crescente da contagem desse grupo à medida que aumentou o tempo de armazenamento. Verificaram que psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos, apresentaram ao longo do tempo diferença significativa de 24 horas para 216 horas do leite estocado na fonte de produção

Quando o inóculo de  $10^5$ UFC de *Pseudomonas* spp./mL foi incubado nas diferentes temperaturas, observou-se aumento na contagem da população ( $p < 0,05$ ), em relação a população zero, a  $2^\circ\text{C}$  a partir de 24 horas, a  $4^\circ\text{C}$  com 72 horas e a  $8^\circ\text{C}$  com 48 horas (Tabela 2). Pode-se observar então que em populações iniciais maiores de *Pseudomonas* spp, as temperaturas mais baixas não retardaram o tempo de crescimento do micro- organismo. Já no inóculo de  $10^6$ UFC/mL, o tempo e a temperatura não influenciaram ( $p > 0,05$ ) na multiplicação da população de *Pseudomonas* spp.

**Tabela 2.** Populações médias de *Pseudomonas* em log UFC/mL em leite integral a partir de diferentes inóculos iniciais ( $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL) incubado à ( $2^\circ\text{C}$ ,  $4^\circ\text{C}$  e  $8^\circ\text{C}$ ) durante 96h.

População Inicial (UFC/mL)	T $^\circ\text{C}$	Tempo (horas)				
		0	24	48	72	96
$10^2$	2	2,3 <sup>A,b,<math>\alpha</math></sup>	5,1 <sup>A,a,b,<math>\alpha</math></sup>	5,2 <sup>A,a,b,<math>\beta</math></sup>	5,5 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	5,5 <sup>B,a,<math>\alpha</math></sup>
	4	2,3 <sup>A,b,<math>\alpha</math></sup>	4,7 <sup>A,a,b,<math>\beta</math></sup>	5,4 <sup>A,a,<math>\beta</math></sup>	5,7 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	5,8 <sup>A,B,a,<math>\alpha</math></sup>
	8	2,3 <sup>2A,b,<math>\alpha</math></sup>	6,2 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	6,4 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	6,6 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	7,0 <sup>A,a,<math>\beta</math></sup>
$10^5$	2	5,3 <sup>A,b,<math>\alpha</math></sup>	6,9 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	7,1 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	7,3 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	6,7 <sup>B,a,b,<math>\alpha</math></sup>
	4	5,3 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	6,6 <sup>A,a,b,<math>\alpha</math></sup>	6,9 <sup>A,a,b,<math>\alpha,\beta</math></sup>	7,4 <sup>A,b,<math>\alpha</math></sup>	7,4 <sup>A,B,b,<math>\alpha</math></sup>
	8	5,3 <sup>A,b,<math>\alpha</math></sup>	7,4 <sup>A,a,b,<math>\alpha</math></sup>	7,9 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	8,1 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	8,3 <sup>A,a,<math>\alpha,\beta</math></sup>
$10^6$	2	6,6 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	6,6 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	7,1 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	7,2 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	7,1 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>
	4	6,6 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	8,2 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	7,8 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	7,6 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	7,9 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>
	8	6,6 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	7,7 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	8,1 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	8,5 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>	10,2 <sup>A,a,<math>\alpha</math></sup>

<sup>A,B</sup> Letras maiúsculas diferentes sobrescritas em uma mesma coluna indicam diferença significativas ( $p < 0,05$ ) na temperatura de incubação, no mesmo tempo, e mesmo inóculo inicial.

<sup>a,b,c</sup> letras minúsculas sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de incubação.

<sup>$\alpha,\beta$</sup>  Letras gregas sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nas temperaturas nos diferentes tempo de incubação, entre os três inóculos ( $10^2$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ).

Ao analisarmos a influência, na multiplicação bacteriana, da temperatura de estocagem de cada inóculo dentro do mesmo tempo de incubação, pode-se observar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na população de *Pseudomonas* spp apenas entre 2°C e 4°C, no tempo 96 horas e somente nos inoculos  $10^2$  e  $10^5$  UFC/mL. Desta forma, independente da população inicial de *Pseudomonas* spp, a temperatura de incubação influenciou na multiplicação bacteriana somente a partir de 96 horas de estocagem do leite

Observou-se que, de maneira geral, independente do inóculo inicial testado, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) dentro da mesma temperatura de incubação e do mesmo tempo de estocagem. Mudanças populacionais foram observadas somente quando os inóculos foram incubados a 2°C, onde, com 48 horas de incubação, houve menor crescimento bacteriano ( $p < 0,05$ ) do inóculo inicial de  $10^2$  UFC/mL. O mesmo ocorreu a 4°C com 24 horas de incubação onde a menor população ( $p < 0,05$ ) foi encontrada no inóculo  $10^2$  UFC/mL e a 8°C, onde com 96 horas, a população do inóculo inicial de  $10^2$  UFC/mL diferiu ( $p < 0,05$ ) de  $10^6$  UFC/mL (tabela 2).

### 3.2 INFLUENCIA DO TEMPO E DA TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO NA PROTEÓLISE PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA EM LEITE INTEGRAL INOCULADO COM DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Pseudomonas* spp.

Na proteólise primária, chamada de índice de extensão, grandes micelas de caseína são clivadas em peptídeos, solubilizando a caseína. Quanto maior a proteólise primária, mais peptídeos solúveis serão liberados da caseína, sendo para-  $\kappa$ -caseína e glicomacropéptidos os mais importantes (FOX, 1989). A porcentagem de proteólise primária indica a hidrólise da caseína do leite, pois é expressa pela relação nitrogênio não caseico em relação ao nitrogênio total da amostra, indicando o percentual de hidrólise da caseína. Para Muir (1996) a fração  $\kappa$ -caseína localizada na superfície da micela de caseína é preferencialmente hidrolisada por proteases de psicrotóxicos, e esta hidrólise causa o desenvolvimento de gosto amargo e induz o aumento da viscosidade, com eventual formação de gel do leite UAT/UHT, quando submetido a prolongado período de armazenamento.

Na proteólise primária, não foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os inóculos testados ( $10^2, 10^5$  e  $10^6$  UF/mL) (tabela 3) quando incubados

na mesma temperatura e tempo de incubação. Assim, tempos menores de estocagem a temperaturas mais baixas não foram efetivas no controle da proteólise primária quando o leite apresenta uma população mais elevada de *Pseudomonas* spp.

**Tabela 3.** Resultados médios de proteólise primária em porcentagem (%) das amostras de leite inoculado com *Pseudomonas* spp. com 3 diferentes populações ( $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL) incubadas a (2°C, 4°C e 8°C) durante 96h.

População Inicial (UFC/mL)	T°	Tempo (horas)			
		24	48	72	96
$10^2$	2	7,65 <sup>B,a,α</sup>	7,67 <sup>A,a,α</sup>	8,65 <sup>A,a,α</sup>	5,41 <sup>A,a,α</sup>
	4	9,70 <sup>A,B,a,α</sup>	7,71 <sup>A,a,α</sup>	8,70 <sup>A,a,α</sup>	7,02 <sup>A,a,α</sup>
	8	10,64 <sup>A,a,α</sup>	10,21 <sup>A,a,b,α</sup>	9,58 <sup>A,a,b,α</sup>	5,36 <sup>A,b,α</sup>
$10^5$	2	8,48 <sup>A,a,α</sup>	8,44 <sup>A,a,α</sup>	10,96 <sup>A,a,α</sup>	5,20 <sup>A,a,α</sup>
	4	9,65 <sup>A,a,α</sup>	8,54 <sup>A,a,α</sup>	7,72 <sup>A,a,b,α</sup>	4,97 <sup>A,b,α</sup>
	8	10,14 <sup>A,a,α</sup>	9,67 <sup>A,a,α</sup>	10,73 <sup>A,a,α</sup>	4,71 <sup>A,b,α</sup>
$10^6$	2	8,41 <sup>A,a,α</sup>	9,61 <sup>A,a,b,c,α</sup>	8,51 <sup>A,a,b,α</sup>	5,21 <sup>A,c,α</sup>
	4	7,08 <sup>A,a,α</sup>	7,21 <sup>A,a,α</sup>	8,60 <sup>A,a,α</sup>	4,91 <sup>A,b,α</sup>
	8	8,42 <sup>A,a,α</sup>	9,44 <sup>A,a,α</sup>	8,79 <sup>A,a,α</sup>	7,07 <sup>A,b,α</sup>

<sup>A,B</sup> Letras maiúsculas diferentes sobrescritas em uma mesma coluna indicam diferença significativas ( $p < 0,05$ ) na temperatura de incubação, em cada inóculo.

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de incubação, para cada inóculo.

<sup>α,β</sup> Letras gregas sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na mesma temperatura nos diferentes tempo de incubação, entre os três inóculos ( $10^2$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ).

Ao avaliarmos o efeito do tempo na proteólise primária para o inóculo inicial de  $10^2$ UFC/mL, apenas sob refrigeração a 8°C foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com redução neste índice no tempo 96hs, quando comparado com 24 horas de incubação. No inóculo inicial de  $10^5$  UFC/mL a estocagem a 4°C com 96 horas promoveu redução no índice de proteólise primária, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do tempo de 24 e 48 horas de incubação. No inóculo  $10^6$ UFC/mL, a redução no índice de proteólise primária, quando comparada com as primeiras 24 horas ( $p < 0,05$ ), aconteceu com 96 horas (Tabela 3).

Se considerarmos o efeito da temperatura dentro do mesmo tempo e inóculo, não houveram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no índice de proteólise

primária, exceto no inóculo de  $10^2$ UFC de *Pseudomonas* spp/mL onde no tempo de 24 horas a proteólise primária à 24 horas foi menor a 2°C que a 8°C.

Assim, de maneira geral, os índices de proteólise primária observadas neste estudo, caracterizada pela solubilização da caseína por ação das proteases bacteriana, diminuíram somente após 96 horas de estocagem, mantendo-se relativamente estáveis ao longo das 72 horas, independentemente do inóculo inicial e da temperatura de armazenamento. Ainda, a temperatura, dentro do mesmo tempo de estocagem, não teve efeito no índice de proteólise primária. Santos et al (2009) avaliando o efeito do tempo e da temperatura de refrigeração no crescimento de psicrotróficos em leite, encontraram dados, onde leite cru com alta contagem de bactérias psicrotróficas e psicrotróficas proteolíticas não possuem necessariamente, atividade proteolítica mais elevada em comparação com amostras de contagem baixa. Rodrigues et al (2013) observaram após inocular em leite desnatado cepas de *Pseudomonas fluorescens*, e incubar a 4 °C, 7 °C e 10 °C durante um período de dez dias a degradação da caseína presente no ágar-leite, evidenciando a atividade proteolítica desta bactéria.

A relação entre o nitrogênio não proteico e o nitrogênio total, NNP/NT, também chamado Índice da Profundidade e proteólise secundária libera peptídeos de baixo peso molecular (FOX, 1989). Na proteólise secundária analisa-se a relação de nitrogênio não proteico, que são os provenientes de aminas, amidas, lecitina, aminoácidos, com nitrogênio total, indicando o percentual de hidrólise de peptídeos de maior peso molecular para menor, resultando na alteração de sabor do leite e odor pútrido. Na maturação, principalmente de queijos macios e semiduros, o gosto amargo é associado à liberação de peptídeos de baixo peso molecular pela ação das proteases (FURTADO, 1999). Portanto o controle na ocorrência da proteólise secundária no leite cru evita o gosto amargo em queijos.

**Tabela 4.** Resultados do índice de proteólise secundária em leite inoculado com *Pseudomonas* spp. em três inóculos ( $10^2$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL) a três temperaturas (2°C, 4°C e 8°C), em tempos de estocagem de até 96 h

População Inicial Log/mL	T°C	Tempo (horas)			
		24	48	72	96
$10^2$	2	5,48 <sup>A,a,α</sup>	6,35 <sup>B,a,α</sup>	5,46 <sup>A,a,α</sup>	6,35 <sup>A,a,α</sup>
	4	5,89 <sup>A,a,α</sup>	6,70 <sup>B,a,α</sup>	7,84 <sup>A,a,α</sup>	7,99 <sup>A,a,α</sup>
	8	5,86 <sup>A,a,α</sup>	9,24 <sup>A,a,α</sup>	7,66 <sup>A,a,α</sup>	8,61 <sup>A,a,α</sup>
$10^5$	2	4,37 <sup>A,a,α</sup>	8,45 <sup>A,a,α</sup>	8,92 <sup>A,a,α</sup>	8,20 <sup>A,a,α</sup>
	4	6,57 <sup>A,a,α</sup>	5,78 <sup>A,b,α</sup>	7,85 <sup>A,a,α</sup>	7,52 <sup>A,a,b,β</sup>
	8	5,22 <sup>A,a,α</sup>	7,87 <sup>A,a,α</sup>	8,38 <sup>A,a,α</sup>	7,77 <sup>A,a,α</sup>
$10^6$	2	5,77 <sup>A,a,α</sup>	7,81 <sup>B,a,α</sup>	7,05 <sup>A,a,α</sup>	5,85 <sup>A,a,α</sup>
	4	5,71 <sup>A,a,α</sup>	6,10 <sup>B,a,α</sup>	7,26 <sup>A,a,α</sup>	6,65 <sup>A,a,β</sup>
	8	5,47 <sup>A,a,α</sup>	8,41 <sup>A,a,α</sup>	7,55 <sup>A,a,α</sup>	7,03 <sup>A,a,α</sup>

<sup>A,B</sup> Letras maiúsculas diferentes sobrescritas em uma mesma coluna indicam diferença significativas ( $p < 0,05$ ) na temperatura de incubação em cada inóculo.

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de incubação para cada inóculo.

<sup>α,β</sup> Letras gregas sobrescritas em uma mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em cada temperatura nos diferentes tempo de incubação, entre os três inóculos ( $10^2$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  UFC/mL).

O tempo de incubação para o índice de proteólise secundária não teve efeito, independente da temperatura de estocagem e do inóculo inicial testado. Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na proteólise secundária foi observada somente ao inocularmos a população de  $10^5$  UFC de *Pseudomonas* spp/mL a 4°C, onde observou-se um índice menor com 48 horas de estocagem, quando comparado aos tempos de 24 e 72 horas (tabela 4)

Quanto a influência da temperatura de estocagem na proteólise secundária, foi observada ( $p < 0,05$ ) somente nos inóculos  $10^2$  e  $10^6$  UFC/mL com 48 horas de estocagem, onde a proteólise secundária foi maior a 8°C, temperatura maior testada no experimento, quando comparada com as menores temperaturas testadas (4°C e 2°C) (tabela 4). A continuação da proteólise no leite resulta em sabores e odores



pútridos associados a produtos de degradação de baixo peso molecular, tais como a amônia, aminas e sulfetos (ARCURI, 2003).

Ao analisarmos os inóculos na mesma temperatura e tempo, pode-se observar que independente do inoculo inicial de *Pseudomonas* spp. testado, o índice de proteólise foi o mesmo. Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi observada somente entre os inóculos estocados a 4°C com 96 horas (Tabela 4)

#### 4 CONCLUSÃO

Reduzido tempo de estocagem e menor temperatura de incubação influenciaram no crescimento bacteriano somente na menor população inicial de *Pseudomonas* spp. estudada. No índice de proteólise primária somente o tempo teve influencia, com índices menores após 96 horas de estocagem. Para proteólise secundária, a temperatura menor de estocagem teve efeito na redução do índice apenas nas primeiras 48 horas. Assim, a contaminação do leite com *Pseudomonas* spp, independente da população inicial e forma de estocagem, acarretará prejuízos à composição proteica do leite, favorecendo defeitos de sabor e redução no rendimento industrial.

#### 5 REFERÊNCIAS

AHMED, H. Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization. Boca Raton: CRC Press, 2005.

ALMEIDA, A. A. P. Micro-organismo psicrotróficos em leite e derivados. *Rev. do ILCT*, Anais do Congresso nacional de laticínios, Juiz de Fora, v.53, p.90-93, n. 304, 1998.

ALMEIDA, Kelly Molin de. População de *Pseudomonas* spp. e *P. fluorescens* em leite cru refrigerado. 2014. 49 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, UNOPAR, Londrina, 2014.

ANDREWS, A. T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research*, v.50, n.1, p.45–55, 1983.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Milk and milk products. **In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** Washington: American Public Health Association (APHA), 1992, p.837-856.

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M. ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p.440-446, 2006.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotóficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. Washington, v. 1-2, 1995.

BRAMLEY, A. J.; McKINNON, C. H.; The Microbiology of Raw Milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk** 2.ed. London/New

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 62, de 29 de Dezembro de 2011**. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Seção 1, 30 de Dezembro de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002**. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 29 set. 2002. Seção 1, p.13.

CATANIO, S. F.; INAY, M. O.; SILVA, S. A.; PEREIRA, R. J.; TAMANINI, R.; M.; BELOTI, V.; COSTA, R. M.; SOUZA, B. H. C.; ALEGRO-ARAGON, C. L.; SANTANA, W. H. E. Refrigerated raw milk quality of a processing plant in the north of Parana after the implementation of changes imposed by NI 62 of 2011. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, suplemento 2 , p. 3171-3180, 2012.

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, n. 2, p. 1-13, 2002.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.45, n.2, p.172-207, 1982.

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, 2000.

FAGUNDES, C.M.; FISCHER, V.; SILVA, W. P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M. R. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 568-572, 2006.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Dairy Chemistry and Biochemistry. ed. 1, 1998.

FURTADO, M. A. M.; VILELA, M. A. P.; MEURER, V. M.; BARBOSA, F. A. Padrões físico-químicos de identidade e qualidade do leite UHT comercializado na cidade de Juiz De Fora, MG. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, p.130-131, 2004.

GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DURR, J.W., CARVALHO, M.P., SANTOS, M.V. **O Compromisso com a Qualidade do Leite**. Passo Fundo: Ed. UPF, 2004, v.1, p. 235-254.

GLORIA, A. B. M.; SARAIVA, RL. P.; RIGUEIRA,S. C.; BRANDAO,C. C. S. Bioactive amines changes in raw and sterilised milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens* stored at different temperatures, **International Journal of Dairy Technology**, Vol. 64, No 1 February 2011

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENARI, A. S. M. Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n.1, p. 216-222, fevereiro. 2005.

HOUGHTBY, G. A.; MARTURIN, L. J.; KOENIG, E. K.; MESSER, J. W. Microbiological count methods. In: MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16<sup>th</sup>. Washington: American Public Health Association, 1992. p. 213-246.

KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic Spoilage of Raw Milk at Different Temperatures of Storage. **Journal of Applied Sciences Research**, 3(11): 1383-1387, 2007.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011

LIMA, V. M. B.; COSTA, C. N.; YAMAGUCHI, L. C. A. Gisleite: inovando a gestão de sistemas de produção de leite com uso de software livre. In: YAMAGUCHI, Luiz Carlos Takao; et al. (Org.). Aspectos sócio-econômicos e ambientais da produção de leite. 1. ed. Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 2007.

LORENZETTI, Dayane Karina. Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da Região Sul. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.

LOUWS, F. J., FULLBRIGHT, D. W., STEPHENS, C. T., & DE BRUIJN, F. J. 1994. Specific genomic fingerprinting of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology** **60**: 2286-2295.

MC PHEE, J.D. AND M.W. GRIFFITHS, Psychrotrophic bacteria. *Pseudomonas* species. **In: Encyclopedia of Dairy Sciences**, Vol. 4, Ed. Roginsky, H., Fuquay, J.W. , Fox, P. F. Academic Press, p. 2340-2351, 2002

MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; ARRUDA, M. T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, 2008.

MELO, B A.; SANTOS, T. M. C.; BARBOSA, Y. R. S.; MOURA, C. T. R.; MONTALDO, Y. C. Aspectos microbiológicos de amostras de leite cru coletadas no município de Major Isidoro – Alagoas. **Revista Verde de Agricultura e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 5, n. 5, p.01-05, 2010.

MAHIEU, H. Modificaciones de la leche después de su recogida. In: LUQUET, F. M. **Leche y productos lácteos. la leche de la mama a la lechería**. Zaragoza: Acribia, p. 181-22, 1991.

MU, Z.; DU, M.; BAI, Y. Purification and properties of a heat-stable enzyme of *Pseudomonas Xuorescens* Rm12 from raw milk. **Eur Food Res Technol** 228:725–734, 2009.

MUIR, D.D. The Fresh- life of Dairy Products: 1. Factors Influencing Raw Milk and Fresh Products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.

NIELSEN, S. S. Plasmin System and Microbial Proteases in Milk: Characteristics, Roles and Relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6628-6624, 2002.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C; BRANDELLI, A. **Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado**. Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/37-2/art825.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2013.

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, dezembro, 1983.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI; DANTAS, M. C. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** [online], v.26, n.3, p.645-651, 2006.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do Leite em Diferentes Pontos do Processo de Produção: I. Microrganismos Aeróbios Mesófilos e Psicrotróficos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 22, n.2, p. 145-154, jul./dez. 2001.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; SOUZA, C. M.; ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Efeito do Tempo e da Temperatura de Refrigeração no Desenvolvimento de Microrganismos em Leite Cru Refrigerado na Macrorregião de Goiânia, v. 10, n. *Ciência Animal Brasileira* 4, p. 1237-1245, out./dez. 2009.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; MOREIRA, N. G.; BARROS, C. J.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Evolução da proteólise do leite inoculado *in vitro* com *Pseudomonas fluorescens*. **B. Ceppa**, Curitiba, v. 28, n.2, p. 313-320, jul./ dez.2010.

SHAH, N. P. Psychrotrophs in milk: A Review. *Milshiwissenschaft*, v.49, p. 432-437, 1994.

SHIRAI, M. A. Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono. **Dissertação** -(Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010.

SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; OVIDIO, L.; MATTOS, M. R.; ARRUDA, A. M. C. T.; PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, n. 1, p. 267-276, 2011.

SMITHWELL, N.; KAILASAPATHY, K. Psychrotrophic bacteria in pasteurized milk: problems with shelf life. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v.50, p.28-31, maio,1995.

STADHOUDERS, J. Microbes in Milk and Dairy Products. An Ecological Approach. *Neth. Milk Dairy Journal*, v.29, p.104-126, 1975.

STATSOFT, Inc. *STATISTICA 8.0 for Windows* [Data analysis software system]. Tulsa: Statsof, 2008.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and Their enzymes in milk and dairy products: Quality Aspects. *Trend In Food Science and technology*, Oxford, v.8, p. 35-37, 1997.

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.

TULLIO, L. T. Isolamento e caracterização do glicomacropéptido do soro de leite. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 97f, 2007.

VALLIN, V. M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H. L.; SILVA, L. C. C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas na ordenha de 19 municípios da região central do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 30, n. 1, p.181-188, 2009.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JUNIOR, O. R.; PENNA, A. L. B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v. 25, n. 4, p.698-704, 2005.

WIKING, L.; FRØST, M.B.; LARSEN, L.B.; NIELSEN, J.H. Effects of storage condition on lipolysis, proteolysis and sensory attribute in high quality raw milk. *Milchwissenschaft*, v. 57, n. 4, p. 190 – 194, 2002.

YAMAZI, A. K.; MORAES, P. M.; VIÇOSA, G. N.; ORTOLANI, M. B. T.; NERO, L. A. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 610-618, 2010.

ZENI, Maisa Paula et al. Influência dos microrganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. *Unoesc & Ciência-ACET*, v. 4, n. 1, p. 61-70, 2013

## 5 CONCLUSÃO GERAL

Observa-se que reduzido tempo de estocagem e menor temperatura de incubação influenciaram no crescimento bacteriano somente na menor população inicial de *Pseudomonas* spp estudada. No índice de proteólise primária somente o tempo teve influencia, com índices menores após 96 horas de estocagem. Para proteólise secundária, a temperatura menor de estocagem teve efeito na redução do índice apenas nas primeiras 48 horas. Assim, a contaminação do leite com *Pseudomonas* spp, independente da população inicial e forma de estocagem, acarretará prejuízos à composição proteica do leite, favorecendo defeitos de sabor e redução no rendimento industrial.

## 6 REFERÊNCIAS

AHMED, H. Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization. Boca Raton: CRC Press, 2005.

ALMEIDA, A. A. P. Micro-organismo psicrotróficos em leite e derivados. *Rev. do ILCT*, Anais do Congresso nacional de laticínios, Juiz de Fora, v.53, p. 90-93, n. 304, 1998.

ALMEIDA, Kelly Molin de. População de *Pseudomonas* spp. e *P. fluorescens* em leite cru refrigerado. 2014. 49 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, UNOPAR, Londrina, 2014.

ANDREWS, A. T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research*, v.50, n.1, p.45-55, 1983.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Milk and milk products. **In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** Washington: American Public Health Association (APHA), 1992, p.837-856.

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M. ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p.440-446, 2006.

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international.** Washington, v. 1-2, 1995.

BRAMLEY, A. J.; McKINNON, C. H.; The Microbiology of Raw Milk. In: ROBINSON, R.K. *Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk* 2.ed. London/New

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 62, de 29 de Dezembro de 2011.** Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Seção 1, 30 de Dezembro de 2011.



BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002**. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 29 set. 2002. Seção 1, p.13.

CATANIO, S. F.; INAY, M. O.; SILVA, S. A.; PEREIRA, R. J.; TAMANINI, R.; M.; BELOTI, V.; COSTA, R. M.; SOUZA, B. H. C.; ALEGRO-ARAGON, C. L.; SANTANA, W. H. E. Refrigerated raw milk quality of a processing plant in the north of Parana after the implementation of changes imposed by NI 62 of 2011. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, suplemento 2, p. 3171-3180, 2012.

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, n. 2, p. 1-13, 2002.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.45, n.2, p.172-207, 1982.

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, 2000.

FAGUNDES, C.M.; FISCHER, V.; SILVA, W. P.; CARBONERA, N.; ARAÚJO, M. R. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 568-572, 2006.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Dairy Chemistry and Biochemistry. ed. 1, 1998.

FURTADO, M. A. M.; VILELA, M. A. P.; MEURER, V. M.; BARBOSA, F. A. Padrões físico-químicos de identidade e qualidade do leite UHT comercializado na cidade de Juiz De Fora, MG. *Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios*. Juiz de Fora, p.130-131, 2004.

GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DURR, J.W., CARVALHO, M.P., SANTOS, M.V. **O Compromisso com a Qualidade do Leite**. Passo Fundo: Ed. UPF, 2004, v.1, p. 235-254.

GLORIA, A. B. M.; SARAIVA, RL. P.; RIGUEIRA,S. C.; BRANDAO,C. C. S. Bioactive amines changes in raw and sterilised milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens* stored at different temperatures, *International Journal of Dairy Technology*, Vol. 64, No 1 February 2011

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENRI, A. S. M. Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção. *Ciência Agrotecnologia*, Lavras, v. 29, n.1, p. 216-222, fevereiro. 2005.

HOUGHTBY, G. A.; MARTURIN, L. J.; KOENIG, E. K.; MESSER, J. W. Microbiological count methods. In: MARSHALL, R. T. *Standard methods for the examination of dairy products*. 16<sup>th</sup>. Washington: American Public Health Association, 1992. p. 213-246.

KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic Spoilage of Raw Milk at Different Temperatures of Storage. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(11): 1383-1387, 2007.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011

LIMA, V. M. B.; COSTA, C. N.; YAMAGUCHI, L. C. A. Gisleite: inovando a gestão de sistemas de produção de leite com uso de software livre. In: YAMAGUCHI, Luiz Carlos Takao; et al. (Org.). Aspectos sócio-econômicos e ambientais da produção de leite. 1. ed. Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 2007.

LORENZETTI, Dayane Karina. Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da Região Sul. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.

LOUWS, F. J., FULLBRIGHT, D. W., STEPHENS, C. T., & DE BRUIJN, F. J. 1994. Specific genomic fingerprinting of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology** **60**: 2286-2295.

MC PHEE, J.D. AND M.W. GRIFFITHS, Psychrotrophic bacteria. *Pseudomonas* species. In: **Encyclopedia of Dairy Sciences**, Vol. 4, Ed. Roginsky, H., Fuquay, J.W. , Fox, P. F. Academic Press, p. 2340-2351, 2002

MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; ARRUDA, M. T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, 2008.

MELO, B. A.; SANTOS, T. M. C.; BARBOSA, Y. R. S.; MOURA, C. T. R.; MONTALDO, Y. C. Aspectos microbiológicos de amostras de leite cru coletadas no município de Major Isidoro – Alagoas. *Revista Verde de Agricultura e Desenvolvimento Sustentável*, Mossoró, v. 5, n. 5, p.01-05, 2010.

MAHIEU, H. Modificaciones de la leche después de su recogida. In: LUQUET, F. M. *Leche y productos lácteos. la leche de la mama a la lechería*. Zaragoza: Acribia, p. 181-22, 1991.

MU, Z.; DU, M.; BAI, Y. Purification and properties of a heat-stable enzyme of *Pseudomonas Xuorescens* Rm12 from raw milk. *Eur Food Res Technol* 228:725–734, 2009.

MUIR, D.D. The Fresh- life of Dairy Products: 1. Factors Influencing Raw Milk and Fresh Products. *Journal of the Society of Dairy Technology*, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.

NIELSEN, S. S. Plasmin System and Microbial Proteases in Milk: Characteristics, Roles and Relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 22, p. 6628-6624, 2002.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C; BRANDELLI, A. **Bactérias psicrotólicas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado**. Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/37-2/art825.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2013.

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, dezembro, 1983.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI; DANTAS, M. C. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotólicas proteolíticas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online], v.26, n.3, p.645-651,2006.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do Leite em Diferentes Pontos do Processo de Produção: I. Microrganismos Aeróbios Mesófilos e Psicrotóxicos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 22, n.2, p. 145-154, jul./dez. 2001.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; SOUZA, C. M.; ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Efeito do Tempo e da Temperatura de Refrigeração no Desenvolvimento de Microrganismos em Leite Cru Refrigerado na Macrorregião de Goiânia, v. 10, n. *Ciência Animal Brasileira* 4, p. 1237-1245, out./dez. 2009.

SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P.; MOREIRA, N. G.; BARROS, C. J.; OLIVEIRA, A. N.; NICOLAU, E. S. Evolução da proteólise do leite inoculado *in vitro* com *Pseudomonas fluorescens*. *B. Ceppa*, Curitiba, v. 28, n.2, p. 313-320, jul./ dez.2010.

SHAH, N. P. Psychrotrophs in milk: A Review. *Milshiwissenschaft*, v.49, p. 432-437, 1994.

SHIRAI, M. A. Conservação do leite cru pela aplicação de dióxido de carbono. **Dissertação** -(Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2010.

SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; OVIDIO, L.; MATTOS, M. R.; ARRUDA, A. M. C. T.; PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, n. 1, p. 267-276, 2011.

SMITHWELL, N.; KAILASAPATHY, K. Psychrotrophic bacteria in pasteurized milk: problems with shelf life. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.50, p.28-31, maio, 1995.

STADHOUDERS, J. Microbes in Milk and Dairy Products. An Ecological Approach. Neth. **Milk Dairy Journal**, v.29, p.104-126, 1975.

STATSOFT, Inc. *STATISTICA 8.0 for Windows* [Data analysis software system]. Tulsa: Statsof, 2008.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and Their enzymes in milk and dairy products: Quality Aspects. **Trend In Food Science and technology**, Oxford, v.8, p. 35-37, 1997.

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.

TULLIO, L. T. Isolamento e caracterização do glicomacropéptido do soro de leite. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 97f, 2007.

VALLIN, V. M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H. L.; SILVA, L. C. C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas na ordenha de 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p.181-188, 2009.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JUNIOR, O. R.; PENNA, A. L. B. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 25, n. 4, p.698-704, 2005.

WIKING, L.; FRØST, M.B.; LARSEN, L.B.; NIELSEN, J.H. Effects of storage condition on lipolysis, proteolysis and sensory attribute in high quality raw milk. **Milchwissenschaft**, v. 57, n. 4, p. 190 – 194, 2002.

YAMAZI, A. K.; MORAES, P. M.; VIÇOSA, G. N.; ORTOLANI, M. B. T.; NERO, L. A. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 610-618, 2010.

ZENI, Maisa Paula et al. Influência dos microrganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. **Unoesc & Ciência-ACET**, v. 4, n. 1, p. 61-70, 2013