

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E RENDIMENTO DO
QUEIJO FRESCO SEM SAL E IOGURTE NATURAL PRODUZIDOS A PARTIR DE
LEITE CONTAMINADO COM MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS
PRODUTORES DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS**

JULIANA QUERINO GOULART

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Marisa da Costa
Co-orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Andrea Troller Pinto

Porto Alegre
Setembro/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E RENDIMENTO DO
QUEIJO FRESCO SEM SAL E IOGURTE NATURAL PRODUZIDOS A PARTIR DE
LEITE CONTAMINADO COM MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS
PRODUTORES DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS**

Juliana Querino Goulart
Médica Veterinária

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia de
Alimentos Processados e "in Natura"

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Marisa da Costa
Co-orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Andrea Troller Pinto

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Setembro/2017

AGRADECIMENTOS

A CAPES, pelo apoio financeiro;

Ao Dr. Fabiano Barreto (LANAGRO) pela colaboração nas análises;

Ao Professor Dr. João Moraes, pelo auxílio com as análises estatísticas;

À minha orientadora, Professora Dr.(a) Marisa da Costa, pelo apoio e dedicação a este trabalho, que foram fundamentais a conclusão desta dissertação;

À minha co-orientadora, Professora Dr.(a) Andrea Troller Pinto, pelos sete anos de trabalhos em parceria e de amizade;

Ao meu marido, Flávio Malysz Sgaravatti, por me apoiar nos momentos mais difíceis;

À minha irmã de coração, Professora Dr.(a) Magaly Mendonça (*in memoriam*), cujos passos na pesquisa científica quis seguir desde criança;

Ao meu pai, um grande homem que me ensinou o valor do trabalho;

E ao grande amor da minha vida, minha mãe, cuja existência me motiva a lutar todos os dias da minha vida.

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E RENDIMENTO DO QUEIJO FRESCO SEM SAL E IOGURTE NATURAL PRODUZIDOS A PARTIR DE LEITE CONTAMINADO COM MICRORGANISMOS PSICOTRÓFICOS PRODUTORES DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Autor: Juliana Querino Goulart

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Marisa da Costa

Co-orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Andrea Troller Pinto

RESUMO

O resfriamento do leite na unidade produtora favorece a multiplicação de microrganismos psicrotróficos que podem produzir enzimas extracelulares termorresistentes com potencial para degradar os componentes do leite. Visando avaliar os prejuízos gerados pela ação destas enzimas, este estudo teve por objetivo analisar os parâmetros físico-químicos e o rendimento dos queijos frescos sem sal e iogurtes naturais produzidos a partir de leite contaminado com microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas, nos tempos de armazenamento de 48 e 72h. Para isso, microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas líticas foram isolados do leite cru refrigerado. Esses microrganismos foram inoculados em leite pasteurizado e armazenados por 48 e 72 horas a temperatura de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após o período de armazenamento, o leite foi tratado termicamente e foram produzidos queijos frescos sem sal e iogurtes naturais, sendo posteriormente avaliados o rendimento e as características físico-químicas destes produtos. Os microrganismos psicrotróficos proteolíticos isolados foram PA17125, PA26115A e MB9122. As médias dos resultados das análises físico-químicas não apresentaram diferenças estatísticas entre os queijos produzidos com leite contaminado com PA17125, PA26115A, MB9122 e o controle (não inoculado). Em relação ao período de armazenamento, os queijos frescos sem sal apresentaram rendimentos menores e percentuais de umidade maiores quando produzidos com leites armazenados por 72 horas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Em relação aos iogurtes naturais produzidos, os teores de gordura e proteína foram significativamente maiores em iogurtes produzidos com os leites controles (não inoculados). Além disso, a acidez do iogurte produzido com leites armazenados por 72 horas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ foi significativamente maior no dia 0, independente dos microrganismos intencionalmente adicionados.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (77 p.) Setembro, 2017.

PHYSICAL CHEMICAL AND YIELD EVALUATION OF NO SALTING FRESH CHEESE AND NATURAL YOGURT MADE OF MILK CONTAMINATED WITH PROTEOLYTIC PSYCROTROPHICS MICRORGANISMS

Author: Juliana Querino Goulart

Advisor: Prof.(a) Dr.(a) Marisa da Costa

Co-Advisor: Prof.(a) Dr.(a) Andrea Troller Pinto

ABSTRACT

Cooling milk favors the multiplication of psychrotrophic microorganisms that can produce thermoresistant extracellular enzymes with potential for degradate milk components. The objective of this study was to evaluate the physicochemical parameters and the yield of the fresh cheese without salt and natural yoghurts produced with milk contaminated with psychrotrophic and proteolytic microorganisms, in the storage times of 48 and 72 hours. For this, psychrotrophic and proteolytic microorganisms were isolated from refrigerated raw milk. These microorganisms were inoculated in pasteurized milk for 48 and 72 hours at a temperature of $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. After the storage period, the milk was heat-treated and used to produce fresh cheese without salt and natural yoghurts, and its yield and physicochemical characteristics were subsequently evaluated. The psychrotrophic and proteolytic microorganisms isolated were PA17125, PA26115A and MB9122. The mean values of the physicochemical analyzes did not present statistical differences between the cheeses produced with milk contaminated with PA17125, PA26115A, MB9122 and control. Regarding the storage period, fresh cheeses without salt showed lower yields and higher humidity percentages when produced with stored milk for 72 hours at $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. About the natural yoghurts produced, the fat and protein content were higher in yoghurts produced with control milks (uninoculated). In addition, the acidity of the yogurt produced with milk stored for 72 hours at $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ was significantly higher on day 0, independent of the inoculated microorganism.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (77 p.) September, 2017.

SUMÁRIO	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Microbiota do leite, queijos e produtos lácteos fermentados	4
3.1.1 Identificação de microrganismos no leite e seus derivados	8
3.2 Aspectos físico-químicos do leite e de seus derivados: Características físico-químicas do leite cru refrigerado, do queijo fresco sem sal e iogurte natural	9
3.2.1 Componentes do leite	9
3.2.1.1 Gordura	10
3.2.1.2 Proteína	10
3.2.1.2.1 Enzimas	11
3.2.2 Composição do queijo fresco sem sal	13
3.2.3 Composição do iogurte natural	14
3.3 Transformação do leite em derivados lácteos: Processos envolvidos	15
3.3.1 Rendimento dos queijos	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Análises microbiológicas e físico-químicas do leite cru refrigerado utilizado para o isolamento de microrganismos produtores de enzimas líticas	19
4.1.1 Coleta de amostras	19
4.1.2 Isolamento de microrganismos psicotróficos	20
4.1.3 Identificação dos microrganismos psicotróficos utilizando testes bioquímicos	21
4.1.4 Identificação dos microrganismos psicotróficos utilizando sistema de espectrometria de massas com ionização por dessorção a laser assistida por matriz acoplado à espectrometria de massas em tempo de voo (MALDI TOF MS)	21

4.1.5 Identificação de microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas líticas	22
4.1.6 Caracterização físico-química do leite cru refrigerado	23
4.2 Estudo do comportamento dos microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas	23
4.2.1 Curvas de crescimento	23
4.2.2 Atividade enzimática do leite desnatado reconstituído a 10% contaminado com os microrganismos psicrotróficos proteolíticos isolados	24
4.3 Produção dos derivados de leite	25
4.3.1 Preparação da matéria-prima para produção dos derivados	25
4.3.2 Produção do queijo fresco sem sal	26
4.3.3 Produção de iogurte natural	27
4.3.4 Quantificação de microrganismos psicrotróficos e quantificação de enzimas proteolíticas	29
4.3.5 Análises físico-químicas dos queijos frescos sem sal e iogurtes naturais produzidos	29
4.4 Análise estatística	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Análises microbiológicas e físico-químicas do leite cru refrigerado utilizado para o isolamento de microrganismos produtores de enzimas líticas	31
5.1.1 Isolamento de microrganismos psicrotróficos	32
5.1.2 Identificação dos microrganismos psicrotróficos	34
5.1.3 Identificação de microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas líticas	37
5.2 Estudo do comportamento dos microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas	38
5.2.1 Curvas de crescimento	38
5.2.2 Atividade enzimática do leite desnatado reconstituído a 10% contaminado com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122	44

5.3 Análise microbiológica e físico-química dos derivados lácteos (queijos frescos sem sal e iogurtes naturais) produzidos com leite contaminado com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122	47
5.3.1 Contagens de microrganismos psicrotóxicos e atividade enzimática do leite contaminado com com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122 utilizado para a produção de queijos frescos sem sal e iogurtes naturais	47
5.3.2 Características físico-químicas dos queijos frescos sem sal produzidos com leites intencionalmente contaminados com com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122	50
5.3.3 Características físico-químicas do iogurte natural produzido com leites intencionalmente contaminados com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122	52
5.4 Perspectivas futuras	55
6 CONCLUSÃO	56
7 REFERÊNCIAS	57

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Médias dos resultados das análises microbiológicas do leite cru refrigerado coletado uma unidade produtora localizada no município de Porto Alegre/RS	31
Tabela 2: Médias dos resultados das análises físico-químicas do leite cru refrigerado coletado em uma unidade produtora localizada no município de Porto Alegre/RS	32
Tabela 3: Proporção dos microrganismos psicotróficos isolados no leite cru refrigerado amostrado	33
Tabela 4: Resultados da avaliação dos crescimentos dos microrganismos psicotróficos isolados em diferentes temperaturas	34
Tabela 5: Resultados dos testes bioquímicos dos microrganismos psicotróficos isolados	35
Tabela 6: Resultados da identificação por MALDI TOF MS dos microrganismos psicotróficos isolados	36
Tabela 7: Resultados dos testes para a produção de enzimas líticas	37
Tabela 8: Médias dos resultados das contagens de microrganismos psicotróficos e das atividades enzimáticas dos leites utilizados como matéria-prima do queijo fresco sem sal	48
Tabela 9: Médias dos resultados das contagens de microrganismos psicotróficos e das atividades enzimáticas dos leites utilizados como matéria-prima do iogurte natural	49
Tabela 10: Médias dos resultados das análises físico-químicas dos queijos frescos sem sal produzidos	51
Tabela 11: Média dos resultados das análises físico-químicas realizadas nos dias 0 e 30 após a produção dos iogurtes naturais	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Fluxograma referente a primeira etapa de atividades executadas	20
Figura 2: Fluxograma referente a segunda etapa de atividades executadas	24
Figura 3: Fluxograma referente a terceira etapa de atividades executadas	26
Figura 4: Fluxogramas de produção do queijo fresco sem sal e iogurte natural	28
Figura 5: Média da acidez titulável aferida no leite desnatado reconstituído a 10% contaminado com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122 ao final da curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$	43

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1: Curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado PA17125 em caldo BHI	39
Gráfico 2: Curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado PA17125 em leite desnatado reconstituído a 10%	39
Gráfico 3: Curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado PA26115A em caldo BHI	40
Gráfico 4: Curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado PA26115A em leite desnatado reconstituído a 10%	40
Gráfico 5: Curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado MB9122 em caldo BHI	41
Gráfico 6: Curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado MB9122 em leite desnatado reconstituído a 10%	41
Gráfico 7: Curva de crescimento a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado MB9122 em caldo BHI	42
Gráfico 8: Atividade enzimática aferida durante o aquecimento do leite contaminado com o isolado PA17125 durante a pasteurização lenta	44
Gráfico 9: Atividade enzimática aferida durante o aquecimento do leite contaminado com o isolado PA26115A durante a pasteurização lenta	45
Gráfico 10: Atividade enzimática aferida durante o aquecimento do leite contaminado com o isolado MB9122 durante a pasteurização lenta	45
Gráfico 11: Atividade enzimática aferida durante o aquecimento do leite não inoculado (controle negativo) durante a pasteurização lenta	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Caldo Infusão cérebro coração
IN	Instrução Normativa
MALDI TOF	Matriz assistida por laser de dessorção/ionização tempo de voo espectrometria de massa
PCA	Ágar de contagem padrão
RDC	Resolução diretoria colegiada
TSA	Ágar triptona de soja
UFC	Unidade formadora de colônia
UHT	Temperatura ultra alta

1 INTRODUÇÃO

A refrigeração do leite é uma das soluções mais eficazes na redução das perdas econômicas devido à deterioração por microrganismos mesófilos, que se multiplicam rapidamente no leite armazenado em temperatura ambiente. Porém, as baixas temperaturas facilitam a multiplicação de microrganismos psicotróficos, que se tornaram prevalentes na microbiota do leite cru refrigerado. Estes microrganismos são conhecidos por produzir enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite, causando alterações indesejáveis nos derivados lácteos.

Os microrganismos psicotróficos têm a capacidade de crescer em baixas temperaturas, porém, não em superiores a 40°C. Desse grupo, representantes do gênero *Pseudomonas* sp. são bastante prevalentes no leite cru refrigerado. Muitas cepas são produtoras de enzimas proteolíticas ou lipolíticas, que causam degradação dos componentes do leite como as proteínas e lipídeos.

A pasteurização do leite elimina grande parte dos microrganismos psicotróficos, já que a maioria não resiste a temperaturas muito superiores à sua temperatura ótima de crescimento. Porém, as enzimas produzidas por estes microrganismos podem ser termorresistentes e continuar presentes no produto após o processamento térmico. Como permanecem ativas, essas enzimas podem degradar os componentes dos derivados lácteos durante o seu período de estocagem (validade do produto) e durante a maturação, no caso dos queijos. Relatos mais comuns estão relacionados ao leite UHT (*ultra high temperature*) porém, a ação das enzimas proteolíticas ainda não foi bastante estudada em derivados como nos queijos e iogurtes.

Os queijos são produtos da coagulação enzimática do leite, onde uma enzima exógena (quimosina) provoca a agregação das micelas de caseína e forma a coagulo. A integridade destas micelas pode ser determinante para a ação da quimosina, sendo que a ação prévia de enzimas proteolíticas de origem microbiana pode afetar a organização do coágulo, reduzindo assim, o rendimento dos queijos. Além disso, sua ação na molécula de caseína pode dar origem a peptídeos amargos, que podem afetar o sabor dos derivados lácteos. Já o iogurte, produto obtido pela coagulação e diminuição do pH do leite por fermentação láctica, pode ter sua consistência alterada pela diminuição do conteúdo de caseína. A ação de enzimas proteolíticas pode formar peptídeos menores a partir da caseína, tornando

o coágulo menos denso, e o iogurte menos consistente. Esse efeito, dependendo do produto pode ser indesejado.

As perdas geradas pelas enzimas proteolíticas produzidas pelos microrganismos psicotróficos ainda não foram contabilizadas pela indústria. A redução do rendimento e as alterações nas características físico-químicas dos derivados lácteos podem gerar prejuízo diretamente (menor rendimento) ou indiretamente (alterações das características físico-químicas e sensoriais que podem reduzir o consumo, pela modificação das características do produto). Visando aprofundar os estudos relacionados aos efeitos nos derivados lácteos provocados pela contaminação por microrganismos psicotróficos proteolíticos, este trabalho teve por objetivo avaliar os parâmetros físico-químicos e rendimento dos queijos frescos sem sal e iogurtes naturais produzidos a partir de leite contaminado com microrganismos psicotróficos produtores de enzimas proteolíticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as características físico-químicas e rendimentos dos queijos frescos sem sal e iogurtes naturais produzidos a partir de leites contaminados com microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas em leite cru refrigerado;
- Verificar a influência do tempo de armazenamento do leite a 7°C nas características físico-químicas e rendimento dos derivados;
- Verificar a ação das enzimas proteolíticas no rendimento dos queijos frescos sem sal produzidos;
- Verificar a ação das enzimas proteolíticas nas características físico-químicas dos queijos frescos sem sal e dos iogurtes naturais.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Microbiota do leite, queijos e produtos lácteos fermentados

Apesar de ser considerado estéril na glândula mamária saudável, o leite adquire os microrganismos que estão presentes na pele do animal e no ambiente no momento em que é ordenhado. Microrganismos ambientais e os que fazem parte da microbiota dos animais de produção leiteira normalmente se multiplicam bem em temperatura ambiente ou na temperatura corporal dos animais. Esses microrganismos são denominados mesófilos e normalmente tem caráter deteriorante nos alimentos. Além disso, o leite é um alimento completo, e isto o torna um meio de cultura adequado para microrganismos, inclusive os patogênicos. Sua qualidade está associada à carga microbiana inicial, sendo elas influenciadas pelo estado sanitário do rebanho, manejo dos animais e higienização dos utensílios utilizados na ordenha (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006; MONTEL et al., 2014; MOREIRA e MONTANHINI, 2014).

Visando controlar a extensa multiplicação de microrganismos, a fim de promover a qualidade do leite, tornou-se obrigatório o seu resfriamento na unidade produtora. O armazenamento refrigerado de leite cru é universalmente aceito para prolongar a vida útil e evitar a deterioração por microrganismos mesófilos. Porém favorece o crescimento de microrganismos psicotróficos, já que se reduz a competição pela inibição dos primeiros. No Brasil, não existe uma regulamentação específica quanto ao número de microrganismos psicotróficos que podem estar presentes no leite cru destinado ao processamento (PINTO, MARTINS e VANETTI; 2006).

Os microrganismos psicotróficos têm a capacidade de crescer em baixas temperaturas, tendo seu crescimento inibido em temperaturas superiores a 40°C. As baixas temperaturas influenciam o crescimento bacteriano, afetando a conformação de macromoléculas celulares e outros constituintes. Conseqüentemente, a adaptação da célula requer enzimas que sejam ativas nesta condição, além de proporções aumentadas de ácidos graxos insaturados que acarretam na redução do ponto de fusão dos lipídios. Este fenômeno serve para manter a fluidez da membrana plasmática, o que permite o transporte de soluto, a secreção de enzimas extracelulares e sua fluidez (MOYER e MORITA, 2007; OLIVEIRA et al., 2015)

A microbiota do leite cru refrigerado é composta por diferentes populações, havendo uma sucessão de acordo com os fatores de crescimento disponíveis no leite. Para alguns microrganismos, a lactose pode não ser uma fonte de energia adequada. Outros dependem de aminoácidos livres como fonte de nitrogênio e o leite fresco os contém em pequenas quantidades. Conseqüentemente, tais microrganismos muitas vezes começam a crescer após outros terem hidrolisado a lactose ou as proteínas. Portanto, dependendo da contaminação inicial, do tempo de refrigeração, da temperatura, entre outros fatores, a população que compõe a microbiota do leite é diferente. Von Neubeck et al. (2015), a partir de leite coletado em tanques de armazenamento em fazendas e indústrias e estocado por 2-3 dias a temperatura de 4-5°C determinou que a microbiota era constituída basicamente por 55% de bactérias Gram negativas, 41% Gram positivas e 4% de leveduras. A maior prevalência de bactérias Gram negativas pode estar relacionada ao resfriamento do leite, sendo este grupo detentor dos microrganismos psicotróficos mais presentes em leite cru refrigerado (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS, 2006; MACHADO et al., 2017).

Os principais gêneros de microrganismos cultiváveis no leite cru refrigerado são bolores, leveduras, bactérias Gram negativas dos gêneros *Acinetobacter* sp., *Acromobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Arthrobacter* sp., *Chryseobacterium* sp., *Enterobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Hafnia* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Rahnella* sp. e *Serratia* sp., e bactérias Gram positivas dos gêneros *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Kocuria* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Microbacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Paenibacillus* sp., *Rhodococcus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. (LAFARGE et al, 2004; FRICKER et al, 2011; KUEHN et al., 2013; QUIGLEY et al. 2013; OIKONOMOU et al., 2014; VITHANAGE et al., 2016). Estudos que utilizam técnicas que não envolvem o cultivo dos microrganismos, têm identificado os gêneros *Aeribacillus* sp., *Anaerococcus* sp., *Bacteroides* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Comamonas* sp., *Fecalibacterium* sp., *Fusobacterium* sp., *Pelomonas* sp., *Porphyromonas* sp., *Propionibacterium* sp., *Psychrobacter* sp., *Ralstonia* sp., *Sphingomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., além dos microrganismos cultiváveis já relatados (KUEHN et al., 2013; QUIGLEY et al., 2013; OIKONOMOU et al., 2014). Dentre todos estes, o gênero *Pseudomonas* sp. foi o que exibiu maior prevalência na microbiota do leite cru refrigerado.

Pertencente ao filo Proteobacteria, classe Gamaproteobacteria, família Pseudomonadacea, espécies do gênero *Pseudomonas* são representantes bastante numerosos da microbiota do leite cru. São bacilos retos ou ligeiramente curvos com larguras de 0,5 a 1,0 μm e comprimentos de 1,5 a 5,0 μm . São Gram negativos, oxidase positivo ou negativo, catalase positivo e não fermentam açúcares. Possuem uma característica morfológica que os diferencia dos demais gêneros pertencentes à família Pseudomonadacea que é a incapacidade de acumular grânulos endocelulares de poli- β -hidroxibutirato (PHB) quando crescem em meios de baixo teor de nitrogênio e com várias fontes de carbono. Podem crescer em meio mínimo, quimicamente definido, com uma fonte de nitrogênio e uma fonte de carbono. A maioria das espécies não depende de fatores de crescimento específicos. O metabolismo das representantes do gênero *Pseudomonas* sp. é tipicamente respiratório com oxigênio como aceptor terminal de elétrons, mas algumas espécies também podem usar nitrato. São microrganismos conhecidos pela diversidade metabólica, seus membros foram isolados de vários ambientes e fontes incluindo animais, plantas, solo e água. Algumas espécies são patogênicas para animais, seres humanos ou vegetais. Podem ser psicrotróficos, sendo seu crescimento favorecido pela estocagem a frio. Algumas espécies são bastante adaptadas a temperaturas mais baixas, atingindo a fase estacionária de crescimento em 3 a 4 dias em temperatura de 6°C. Apesar de serem pouco resistentes à pasteurização, indivíduos deste gênero são capazes de produzir enzimas extracelulares termorresistentes que estão relacionadas à deterioração dos produtos lácteos durante o armazenamento, limitando a sua vida útil (MOORE et al., 2006; DE JONGHE et al., 2011; ADDIS, et al. 2016; VON NEUBECK, et al., 2016; STOECKEL et al., 2016; MARCHAND et al., 2017).

A pasteurização é um processo térmico onde o alimento, neste caso o leite, é submetido à alta e, logo em seguida, à baixa temperatura. Pode ser lenta, onde a temperatura utilizada varia entre 62° e 65°C, durante 30 min, ou rápida onde se aplicam temperaturas de 72° a 75°C durante 15 a 20 segundos. Independente do tipo de processo, o resfriamento deve ser imediato. A pasteurização tem a função de reduzir a carga microbiana, além de eliminar microrganismos patogênicos. A maioria dos microrganismos deteriorantes no leite cru, como coliformes, bactérias ácido-láticas e bactérias psicrotróficas são eliminadas pela pasteurização. Porém, algumas cepas de *Staphylococcus aureus*, micrococos resistentes ao calor como o

Microbacterium sp., alguns estreptococos termófilos e esporos bacterianos podem sobreviver a este tratamento térmico (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006; YOON, LEE e CHOY, 2016, BRASIL, 2017). Estudo realizado por Junior e colaboradores (2017) identificaram fungos psicrotróficos termodúricos como *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia geniculatus* e *Geotrichum candidum* no leite cru refrigerado.

A pasteurização elimina mais de 90% dos microrganismos presentes no leite, além de inativar algumas enzimas que podem ser responsáveis pela produção dos componentes que darão sabor ao queijo. Sendo assim, a microbiota dos queijos produzidos a partir de leite pasteurizado será bastante diferente da dos queijos produzidos a partir de leite cru. A presença de microrganismos Gram positivos é favorecida já que são mais resistentes ao tratamento térmico que os Gram negativos. Fatores ambientais e da produção também podem afetar as espécies de microrganismos presentes nos queijos. Além disso, a maturação é um fator determinante da microbiota dos queijos (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006).

A microbiota de queijos não maturados e produzidos a partir de leite pasteurizado e que não sofreram maturação, têm suas maiores influências no leite que lhe serviu como matéria-prima e no ambiente onde foi produzido. Exemplo de queijo fresco é o queijo Minas Frescal, que pode ser consumido imediatamente após a produção. A diferença do queijo Minas Frescal para o queijo fresco sem sal, produzido no presente estudo, é a ausência de salga no processo produtivo do segundo. Apesar do efeito conservante do sal, espera-se que a microbiota do queijo fresco sem sal seja semelhante a do queijo Minas Frescal (BRASIL, 1996).

O regulamento que estabelece os parâmetros microbiológicos para os queijos é Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Ela estipula contagens máximas de 5.000 unidades formadoras de colônia/25g (UFC/25g) de coliformes a 45°C/g, 1.000 UFC/25g de estafilococos coagulase positiva para o queijo Minas Frescal. Também determina as ausências de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em 25g. Estudo realizado por Loguercio e Aleixo (2001), que avaliou a qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal produzido artesanalmente, determinou que 93% se encontravam com contagens acima do padrão para coliformes fecais e 96% apresentavam contagens superiores ao padrão legal aceitável para estafilococos coagulase positiva. Dias et al. (2016) também avaliaram as características microbiológicas, comparando-as com

os requisitos estabelecidos na legislação. Porém, os queijos Minas Frescal avaliados eram produzidos com leite não pasteurizado, o que não é permitido pela legislação. Estudos mais recentes também têm detectado a presença de *Escherichia coli* enterotoxigênica na linha de produção do queijo Minas Frescal (BRASIL, 2001; FONSECA et al., 2014).

Já os produtos lácteos fermentados, o que inclui o iogurte, contêm grande diversidade microbiana. São naturalmente afetados pela microbiota da matéria-prima (o leite), porém, como são adicionados de fermentos lácteos, os microrganismos que compõem sua microbiota são, em grande parte os componentes dos fermentos. Estudo realizado por Zhong e colaboradores (2016) avaliou 85 amostras de leites fermentados coletados em uma vasta região da China, Mongólia e Rússia. Os filos mais prevalentes compartilhados entre as amostras foram Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, e Actinobacteria, que juntos representaram 99% das seqüências bacterianas. Os gêneros predominantes foram *Acetobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp. e *Macroccoccus* sp., *Streptococcus* sp. que em conjunto corresponderam a 96,63% de seqüências bacterianas. Tamang, Watanabe e Holzapfel (2016) relataram que os microrganismos mais prevalentes em iogurtes foram o *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* Bulgaricus, *Lactobacillus gasserii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Streptococcus salivarius* Thermophilus. A prevalência do *S. salivarius* Thermophilus e do *L. delbrueckii* Bulgaricus é esperada, já que estes microrganismos são os componentes do fermento lácteo utilizado para a produção de iogurtes.

3.1.1 Identificação de microrganismos no leite e seus derivados

A identificação de microrganismos presentes em alimentos ainda é bastante dependente do cultivo. A partir do isolamento dos microrganismos, testes bioquímicos e/ou sequenciamento são úteis na identificação de microrganismos em nível de gênero ou espécie, dependendo do grau de sensibilidade. Mais recentemente a identificação de microrganismos isolados utilizando matriz assistida por laser de dessorção/ionização tempo de voo e espectrometria de massa (MALDI TOF MS), tem acelerado este processo. O MALDI TOF MS é capaz de identificar

espécies de microrganismos através da determinação de proteínas altamente específicas, tendo alta resolução dentro da gama de massas de 2 a 20 kDa, o que cobre predominantemente proteínas ribossômicas que demonstram diferenças importantes ao nível de uma espécie (WOLTERS et al., 2011; EGLI et al., 2015; TAGG et al., 2015). Além da identificação de microrganismos ao nível de espécie, alguns estudos objetivam diferenciar indivíduos de mesma espécie com diferentes características fenotípicas (JOSTEN et al., 2014).

Estudos recentes, que aplicam técnicas moleculares para determinação da microbiota de alimentos, têm proporcionado grandes avanços quando se trata da microbiota do leite ao longo do período entre a ordenha e o processamento, facilitando a avaliação do potencial espoliativo dos microrganismos que a compõe e o provável prejuízo na produção dos derivados do leite. O estudo da ecologia microbiana utilizando a metagenômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica tem sido utilizado para entender o comportamento de microrganismos em produtos alimentares (ERCOLINI, 2013; QUIGLEY et al., 2013).

3.2 Aspectos físico-químicos do leite e de seus derivados: Componentes do leite cru refrigerado e composição do queijo fresco sem sal e iogurte natural

Leite é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. É um dos alimentos mais complexos, sendo uma combinação de diversos elementos sólidos em água. Os elementos sólidos representam aproximadamente 12 a 13% do leite, e a água aproximadamente 87%. Os principais elementos sólidos são lipídios (3,5% a 5,3%), onde a maioria é composta por triglicerídeos; carboidratos (4,7% a 5,2%), sendo o mais representativo a lactose; proteínas (3% a 4%), onde a caseína é mais presente; sais minerais e vitaminas (1%). Esses elementos, suas distribuições e interações são determinantes para a estrutura, propriedades funcionais e aptidão do leite para processamento (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006; BRASIL, 2017).

3.2.1 Componentes do leite

Os componentes do leite se comportam de diferentes formas devido a suas

diferentes solubilidades em água, tornando o leite uma solução coloidal. As proteínas do soro, a lactose, os minerais e algumas vitaminas são solúveis em água, formando uma solução perfeita. Em compensação, as caseínas (proteínas mais abundante no leite) estão sob a forma de micelas insolúveis em água e a gordura, em emulsão (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006).

3.2.1.1 Gordura

A gordura é o componente do leite que sofre maior variação. Maior parte da gordura se encontra em pequenos glóbulos formando uma emulsão em água. Os ácidos graxos constituintes da gordura do leite provêm de duas fontes: ácido acético e butírico, sintetizados pelas células secretoras e provenientes do sangue, oriundos da dieta ou da mobilização das reservas corporais. Legalmente, os teores de gordura devem ser superiores a 3% em leite cru refrigerado (ORDOÑEZ et al., 2005; WALSTRA, WOUTERS e GEURTS, 2006; BRASIL, 2011; NASCIMENTO et al, 2016).

3.2.1.2 Proteínas

Cerca de 95% do nitrogênio presente no leite está sob a forma de proteínas. As proteínas do leite formam uma mistura complexa e de difícil separação já que algumas estão intimamente relacionadas. O isolamento destas proteínas agrega valor ao produto, já que é possível a produção de diversos produtos funcionais a partir delas separadamente, por exemplo, soluções concentradas de caseínas podem ser utilizadas na produção de queijos (CHAI, YE, CHEN; 2017).

As proteínas do leite podem ser divididas em três categorias: caseínas, proteínas do soro e outras. As caseínas são proteínas não globulares que estão presentes no leite em grandes aglomerados denominados micelas. Em pH 4,6 estas proteínas precipitam, as demais proteínas, permanecem solúveis. É a proteína mais abundante no leite, constituindo 80% do conteúdo proteico total. Podem ser distinguidas α S1, α S2, β e κ -caseína. Dentre estas, a α S1-caseína, que é uma fosfoproteína, é a mais abundante, com 34% das proteínas totais. A κ -caseína apresenta-se sob a forma de moléculas glicosiladas em graus diferentes. A β -caseína, em parte, é dividida pelas enzimas proteolíticas em γ -caseína e peptona

protease. Elas são fosfoproteínas que precipitam na presença de íons cálcio, porém são protegidas da precipitação pela κ -caseína. No entanto, κ -caseína reage facilmente com o coalho (HARAGUCHI, ABREU, DE PAULA; 2006). O coalho é uma quimosina que pode ser de origem animal ou microbiana produzido, por exemplo, pelo *Aspergillus niger* var. Awamori. Essas reações são a base da coagulação do leite por coalho e, portanto, da produção de queijos (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006).

As proteínas do soro, diferente das caseínas, apresentam uma estrutura globular. São constituídas de: α -lactoglobulina, β -lactoalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas e glicomacropéptidos (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006).

O percentual de proteína pode variar de acordo com as estações do ano, volume da produção, raça do animal, fase da lactação, alimentação, etc. A Instrução Normativa nº62/2011, estabelece mínimos de 2,9% para seu teor no leite cru refrigerado (BRASIL, 2011; TAFFAREL et al., 2015).

3.2.1.2.1 Enzimas

Enzimas são substâncias de origem normalmente proteica, que tem função de acelerar reações químicas e que podem exercer suas atividades intra ou extracelularmente. Estão presentes nos mais diferentes organismos vivos e substâncias biológicas, entre elas, o leite. Este contém uma grande variedade de enzimas sendo muitas delas excretadas pela glândula mamária (sintetizadas por células secretoras); outras derivadas do sangue. Além destas, enzimas como a catalase estão presentes em células que se desprendem da glândula mamária após a ordenha (SILANIKOVE, MERIN e LEITNER; 2006; WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006).

A ação das enzimas pode ter efeitos positivos ou negativos na indústria de laticínios. Como efeitos positivos destaca-se a utilização de enzimas na fabricação de produtos lácteos que geram qualidades desejáveis a eles. Já os efeitos negativos estão relacionados à produção de características não desejadas como a redução de consistência no iogurte por exemplo. Os microrganismos contribuem com a produção de enzimas que estão presentes no leite. Algumas, que são produzidas por bactérias ácido-láticas, podem ser utilizadas para produzir sabores e texturas

diferenciadas em queijos e iogurtes. Porém, outras podem ter efeito negativo, degradando os componentes do leite e acarretando em menor rendimento ou perda de qualidade dos derivados lácteos (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006, TEH et al., 2014).

As enzimas bacterianas (proteases ou lipases) podem ser produzidas por uma variedade de bactérias, incluindo espécies dos gêneros *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Serratia* sp., que são encontradas no ambiente de unidades produtoras de leite e laticínios. A produção das enzimas ocorre normalmente no final da fase exponencial e início da fase estacionária do crescimento bacteriano. É um processo complexo influenciado pelos mais diferentes fatores ambientais e fatores intrínsecos dos microrganismos (TEH et al., 2014).

Dentre os microrganismos produtores de enzimas espoliativas, os psicotróficos compõem o grupo mais estudado na atualidade. Apesar de serem destruídos pela pasteurização, as enzimas por eles produzidas podem manter sua atividade. Além de agir no leite antes da pasteurização, as enzimas termorresistentes podem continuar agindo nos derivados, causando degradações nos componentes proteicos e lipídicos, principalmente em queijos e manteigas que ficam armazenados por longos períodos. As enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos psicotróficos presentes no leite podem degradar as micelas de caseína e liberar peptídeos menores e aminoácidos solúveis que serão perdidos no soro, resultando em menores teores de proteínas no coágulo do queijo produzido (SØRHAUG e STEPANIAK, 1997; CARDOSO, 2006; NORBERG, TONDO e BRANELLI, 2009; TEH et al., 2014; GLUCK et al., 2016; PUKANČÍKOVÁ et al., 2016; MARCHAND et al., 2017).

Estudo realizado por von Neubeck e colaboradores (2015), observaram que dentro do gênero *Pseudomonas* aproximadamente 85% dos isolados possuíam a capacidade de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas, sendo a capacidade proteolítica muito mais abundante. Já Vithanage e colaboradores (2016) também identificaram, além dos representantes dos gêneros *Pseudomonas* sp., representantes dos gêneros *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Hafnia* sp. e *Microbacterium* sp. como os mais ativos enzimicamente.

As enzimas proteolíticas hidrolisam ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas e são pertencentes a quatro subgrupos: proteinases de serina; proteinases de cisteína; proteinases de ácido aspártico e

metaloproteinases alcalinas. Exemplos de enzimas destes grupos são a plasmina, uma proteinase de serina e a catepsina, uma proteinase do ácido aspártico. As metaloproteinases alcalinas são relatadas como estáveis à altas temperaturas e podem ser produzidas por microrganismos psicrotróficos presentes no leite (CHEN, DANIEL e COLLBEAR, 2003; GLUCK et al., 2016; PUKANČÍKOVÁ et al., 2016).

As enzimas proteolíticas produzidas pelos microrganismos psicrotróficos têm capacidade de coagular o leite, agindo na α , β e κ caseína. Também agem nas proteínas do soro, porém seu potencial de ação é menor. Têm sua atividade máxima em pH entre 6,5 e 8. Os principais defeitos causados pelas enzimas proteolíticas em derivados de leite são a rancidez, sabor amargo, sabor de fruta e geleificação em leite UHT. Também podem causar 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. Os microrganismos psicrotróficos têm sido responsabilizados por estes defeitos nos derivados lácteos, devido a sua capacidade de produzir enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Segundo alguns autores, a produção destas enzimas se inicia em contagens de microrganismos superiores a 10^6 UFC/mL (PINTO, MARTINS e VANETTI; 2006; NORBERG et al., 2009; dos SANTOS et al., 2013).

3.2.2 Composição dos queijos frescos

Queijos frescos são obtidos por coagulação enzimática do leite pasteurizado com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. Não sofrem maturação, podendo ser consumidos imediatamente após a produção. Um exemplo de queijo fresco é o queijo Minas Frescal, cuja composição depende de diversos fatores, desde a composição do leite utilizado como matéria-prima até os processos tecnológicos envolvidos na sua produção (BRASIL, 1997).

Para a produção das diversas variedades de queijo, podem ser aplicadas normas legais, tais como um conteúdo mínimo e máximo de matéria gorda na matéria seca. No Brasil, a legislação define que o queijo Minas Frescal deve ser um queijo semi-gordo (percentual de gordura varia entre 25 e 44,9%), de alta umidade (com percentuais de umidade entre 46,0 e 54,9%), com consistência macia, cor

esbranquiçada, sabor suave ou levemente ácido e formato cilíndrico. Como são permitidas adições de culturas lácteas ao leite para a produção deste queijo, ela pode ser um dos fatores que mais afetam a sua composição. As bactérias ácido-láticas específicas adicionadas ao leite matéria-prima na produção de queijo Minas Frescal fornecem proteção, melhoram atividade coagulante e facilitam a remoção do soro da coalhada. Estudos relacionados à composição do queijo Minas Frescal têm os mais variados resultados, de acordo com os fatores acima relacionados (CARVALHO, VIOTTO e KUAYE, 2005; FRITZEN-FREIRE et al., 2010; MAGENIS et al., 2014; DIAS et al., 2016).

O queijo fresco sem sal produzido no presente estudo tem sua produção semelhante a do queijo Minas Frescal. A diferença entre os dois queijos é que o primeiro não é salgado. Este passo foi excluído na produção do queijo produzido neste estudo para evitar que os teores de cloreto de sódio influenciassem no rendimento da coalhada, já que o sal atrai água para a trama de caseína do coágulo, aumentando os teores de umidade e, conseqüentemente afetando o rendimento. Apesar dos teores de cloreto de sódio tornarem suas composições pouco diferentes, a composição do queijo Minas Frescal é a que mais se aproxima do queijo fresco sem sal produzido.

3.2.3 Composição do iogurte natural

O iogurte é o produto obtido do leite adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH por fermentação láctica, mediante ação das bactérias *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. Neste processo ainda podem ser incluídos, de forma complementar, outras bactérias ácido-láticas que por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final. Estes microrganismos específicos devem estar viáveis, ativos e abundantes no produto final, durante seu prazo de validade. Os iogurtes podem ser classificados em integral, semidesnatado ou desnatado, de acordo com o teor de gordura. Independente da classificação, o teor mínimo de proteínas é de 2,9%. A acidez titulável deve estar entre 6 e 15g de ácido láctico/L de iogurte (BRASIL, 2007).

A composição do iogurte natural também varia de acordo com a composição do leite utilizado como matéria-prima. Os teores de proteínas e gordura estão

relacionados aos processos de padronização e adição de leite ou soro de leite em pó. Já o conteúdo de lactose diminui em relação à do leite, pois esta é convertida em ácido láctico. Bactérias ácido-láticas muitas vezes exigem vitaminas B para o crescimento e podem produzir outras vitaminas. Assim, as propriedades das culturas envolvidas determinam o grau de concentrações de vitaminas no leite fermentado em relação ao leite. No iogurte, o nível da maioria das vitaminas é um pouco reduzido; o teor de ácido fólico pode ser aumentado. Além disso, algumas bactérias podem produzir a vitamina K2. O conteúdo de vitaminas em produtos fermentados também é afetado pelas condições de armazenamento e pelo tratamento térmico do leite. Por exemplo, o tratamento do leite resulta numa diminuição das vitaminas B1, B12, C e ácido fólico (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006).

3.3 Transformação do leite em derivados lácteos: processos envolvidos

A degradação dos componentes do leite podem provocar alterações nas características físicas, como a acidez titulável, por exemplo. Ao degradar a lactose e convertê-la em ácido láctico, a concentração aumentada do segundo gera aumento na acidez titulável. O processo natural de acidificação do leite pode desestabilizar as micelas de caseína o que provoca sua agregação. O gel é formado e o soro separa-se da coalhada naturalmente. O aquecimento do leite ácido pode acelerar esta separação e a massa resultante pode ser enformada e prensada. Porém a fabricação do queijo acaba não envolvendo processos naturais de acidificação, sendo a coagulação do leite promovida por enzimas ou ácidos adicionados intencionalmente (FOX et al., 2000).

As enzimas adicionadas ao leite removem o caseinomacropéptido da κ -caseína e as micelas de paracaseína resultantes ficam agregadas formando o gel. As micelas só agregam quando a maior parte do caseinomacropéptido é removida, de modo que a repulsão eletrostática das micelas é suficientemente diminuída. A agregação, isto é, a aderência conjunta de micelas de paracaseína, é em parte devido a ligações covalentes entre moléculas, mas atração entre elas não é suficiente. O cálcio tem efeito fundamental nesta parte do processo de coagulação do leite. Presumivelmente, o efeito dos íons cálcio diminui a repulsão eletrostática neutralizando as micelas. Também podem fazer pontes (ligações salinas) nas micelas de paracaseína (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006).

O gel formado é propenso à separação espontânea, com a expulsão de soro. A expulsão do soro ocorre cortando-se o gel em pedaços e pela agitação da mistura coalhada-soro. A coalhada obtida compõe de 10 a 30% do volume de leite. Após o enforme e prensagem, cloreto de sódio é adicionado à coalhada na proporção de 1 a 4%. O sal afeta durabilidade, sabor e consistência do queijo, além de possuir efeitos na maturação. Posteriormente ocorre a fusão de grãos de coalhada e o queijo pode adquirir uma casca, que protege o interior. De acordo com o tipo de queijo, ele sofre um processo de maturação específico, que é o principal fator determinante de seu sabor e textura típica. Para conseguir isso, o queijo é mantido por um tempo variável sob condições adequadas. As condições de armazenagem variam de acordo com o tipo de queijo envolvido (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006).

A principal enzima utilizada na fabricação de queijo é a quimosina. É uma endopeptidase, que divide a proteína em fragmentos relativamente grandes. Ela quebra especialmente as ligações entre os aminoácidos fenilalanina e a metionina na posição 105 e 106 da κ -caseína. Outras enzimas podem ser utilizadas, como por exemplo, a pepsina suína, as enzimas de origem vegetal ou fúngica e de microrganismos recombinantes (FOX et al., 2000).

O queijo Minas Frescal normalmente tem um roteiro de produção semelhante nas indústrias de laticínios. Inicia-se com a padronização, homogeneização e pasteurização do leite. A seguir, o leite pasteurizado é aquecido a 38°C e são adicionados o cloreto de cálcio e o coalho. Alguns fabricantes podem adicionar fermentos lácteos (o que é permitido pela legislação). A mistura fica coagulando por cerca de uma hora. A massa é cortada e movimentada para a remoção do soro. Após a dessoragem a massa é enformada. Após 30 min a massa é virada e permanece na forma por mais 30 min e, em seguida, é desenformado. O queijo é salgado, embalado e armazenado a 5°C. Esse tipo de queijo não sofre processo de maturação (CARVALHO et al., 2007).

O iogurte é um derivado produzido a partir da fermentação láctea por duas bactérias específicas, o *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. Estes microrganismos atuam em cooperação, onde o *L. delbrueckii* *Bulgaricus* aumenta o crescimento do *S. salivarius* subsp. *Thermophilus* pela produção de aminoácidos que estimulam o crescimento do primeiro (sendo o principal aminoácido a valina). Já o *S. salivarius* subsp. *Thermophilus* aumenta o crescimento do *L. delbrueckii* *Bulgaricus* pela formação de

ácido fórmico a partir de ácido pirúvico. Devido à mútua estimulação durante o crescimento combinado das bactérias do iogurte, a produção se torna muito mais rápida (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006).

O iogurte é uma rede de partículas de caseína que inclui glóbulos de gordura e soro. A existência de uma rede contínua implica na formação de um gel. Suas etapas da preparação compreendem (1) o aquecimento do leite a 85°C, com a finalidade de desnaturar as proteínas do soro e garantir a firmeza do produto; (2) o período de incubação a 43°C com o crescimento dos microrganismos iniciadores (*Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) com a produção de metabólitos que determinam as características do produto; (3) e o resfriamento a 5°C para impedir o crescimento microrganismos mesófilos e, conseqüentemente parar a produção de ácidos (LEE e LUCEY, 2010).

Os metabólitos formados são principalmente ácido láctico, acetaldeído e diacetil. O ácido láctico é produzido a partir de glicose. A galactose, formada durante a decomposição da lactose, não é convertida. O acetaldeído, componente essencial ao aroma do iogurte, é produzido a partir da treonina (um componente natural do leite). Já o diacetil é formado a partir do ácido pirúvico, produto da fermentação de açúcares promovida pelos microrganismos iniciadores. Também estão presentes cadeias de polissacarídeos ricos em galactose e outros glicídios, que são secretadas pelo *S. salivarius* subsp. *Thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006).

3.3.1 Rendimento dos queijos

O rendimento é medido pelo volume de litros de leite necessários para produzir um quilo de queijo. Pode ser afetado por diversos fatores como, por exemplo, a composição do leite e do queijo, perdas no corte da coalhada, tipo de coalho utilizado, contagens de células somáticas e contagem de bactérias psicrótróficas. O rendimento dos queijos é bastante variável e afetado diretamente pelos teores de umidade. O processo de transformação do leite em queijo faz com que os constituintes do leite se separem em dois grupos. O primeiro grupo é dos constituintes que ficam retidos no coágulo e o segundo, os que são perdidos no soro. No coágulo ficam retidos a caseína e grande parte da gordura do leite. Já o

soro é formado principalmente por lactose, minerais, proteínas do soro e água (CARDOSO, 2006).

A contaminação do leite por microrganismos psicrotróficos tem sido investigada por diversos grupos de pesquisa com a intenção de avaliar as avarias que esta poderia causar (NORNBERG, TONDO e BRANDELLI, 2009; BAUR et al., 2015; STOECKEL et al., 2016). Os microrganismos em si podem ser destruídos pelos tratamentos térmicos, porém enzimas termorresistentes por eles produzidas permanecem ativas nos derivados lácteos. Os efeitos destas enzimas nos derivados lácteos são vastamente estudados no leite UHT, mas em queijos e iogurtes é pouco descrita. Basicamente, a comparação entre os derivados produzidos com leite altamente contaminado e derivados produzidos com leites pouco contaminados pode auxiliar na elucidação de parte das causas dos prejuízos ocorridos na indústria. Estas informações podem ser utilizadas como base em estudos futuros de avaliação das perdas econômicas ocorridas na indústria.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades foram divididas em três etapas: A primeira etapa se refere às análises do leite cru refrigerado utilizado para o isolamento e identificação de microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas líticas (item 4.1). Nesta etapa, o leite cru refrigerado coletado em uma unidade produtora, foi avaliado quando às suas características microbiológicas e físico-químicas, além de serem isolados dele microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas líticas. O resumo das atividades executadas nesta etapa é apresentado na figura 1. Já a segunda etapa (item 4.2), trata do comportamento dos microrganismos isolados, avaliando as taxas de crescimento em dois diferentes meios: Caldo infusão cérebro e coração (BHI) e leite desnatado. Também foi avaliada a atividade enzimática do leite desnatado contaminado com os microrganismos psicrotróficos proteolíticos isolados durante o tratamento térmico (Figura 2). A terceira etapa está relacionada à produção dos derivados lácteos (item 4.3) com leite pasteurizado contaminado intencionalmente com os microrganismos isolados na primeira etapa.

4.1 Análises microbiológicas e físico-químicas do leite cru refrigerado utilizado para o isolamento de microrganismos produtores de enzimas líticas

As análises microbiológicas e físico-químicas do leite cru refrigerado foram realizadas em triplicata.

4.1.1 Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de leite cru refrigerado armazenado em tanque de expansão, em uma unidade produtora localizada no município de Porto Alegre, em duas diferentes oportunidades, com o objetivo de isolar microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas e/ou lipolíticas. A primeira amostra foi coletada em novembro/2015 e a segunda em dezembro/2015. A alíquota coletada correspondeu a 400 mL e as amostras foram acondicionadas em frascos estéreis e mantidas em temperaturas inferiores a 10°C até a chegada ao Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Leites e Derivados, Ovos e Mel da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LEITECIA – UFRGS).

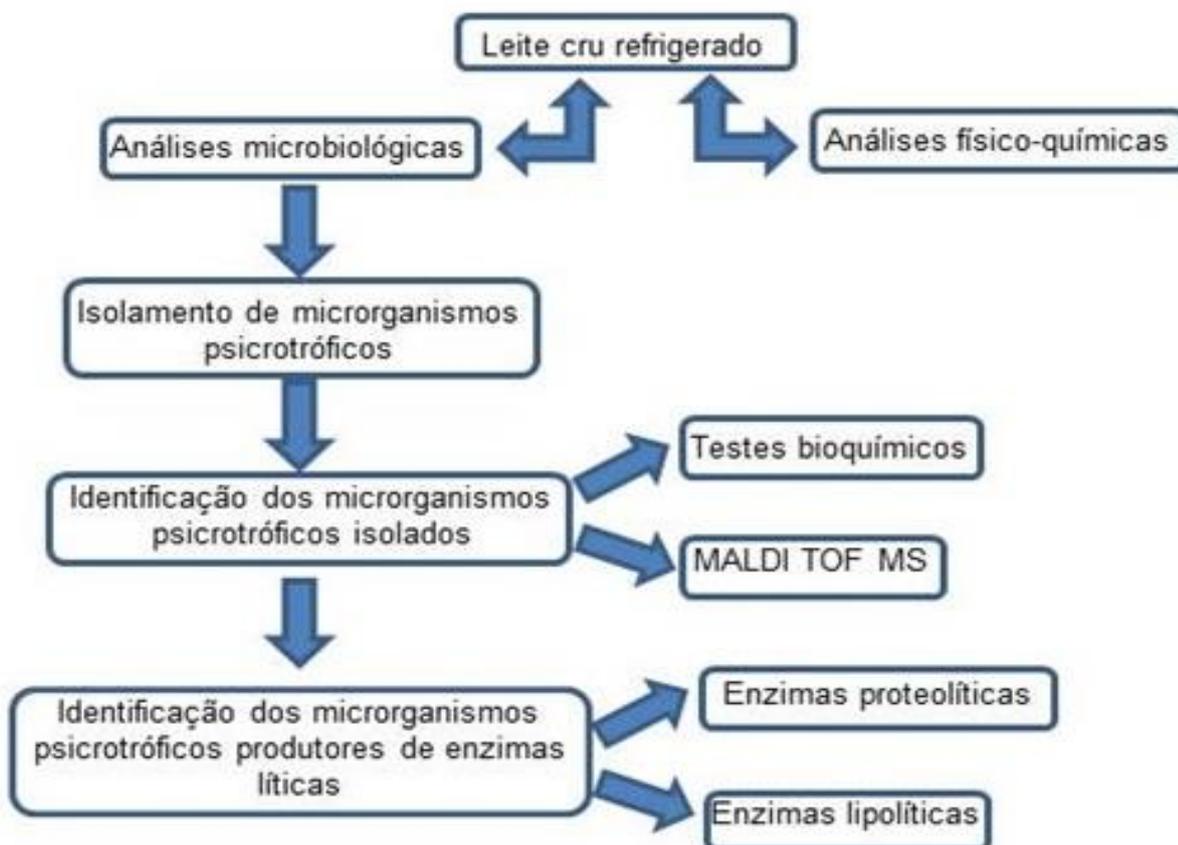


Figura 1: Fluxograma das análises microbiológicas e físico-químicas do leite cru e do isolamento de microrganismos psicotróficos produtores de enzimas líticas

4.1.2 Isolamento de microrganismos psicotróficos

Imediatamente após a chegada ao laboratório foram feitas diluições decimais das amostras e inoculados 100 μ L em ágar de contagem padrão (PCA) e placas mantidas a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas para as contagens de microrganismos mesófilos. Já para a contagem de psicotróficos as placas foram acondicionadas a aproximadamente $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 dias. Para a quantificação de leveduras mesófilas e psicotróficas foram feitas diluições decimais das amostras e inoculados 100 μ L em ágar batata-dextrose acidificado (BDA) e as placas foram acondicionadas às temperaturas de $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 dias, respectivamente. Apesar da instrução normativa nº62/2003 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento sugerir temperaturas de 25°C para bolores e leveduras, o crescimento excessivo de bolores tornou impossível a contagem de leveduras. Assim, se optou por manter as placas de BDA em temperatura de $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para favorecer o crescimento das leveduras. Após o tempo de incubação foi

realizada contagem de UFC total (BRASIL, 1993; SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2001; BRASIL, 2003; ALFENAS et al., 2009).

Baseado nas diferentes morfologias de colônia observadas, os microrganismos foram isolados e mantidos em cultura pura. Para avaliar a capacidade de crescimento nas temperaturas de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, os isolados foram inoculados em ágar triptona de soja (TSA) e incubados nessas temperaturas por 10 dias, 3 dias e 48 horas respectivamente.

4.1.3 Identificação dos microrganismos psicrotróficos utilizando testes bioquímicos

Os microrganismos psicrotróficos isolados foram submetidos à coloração de Gram. Foram visualizados ao microscópio óptico e observados quanto à sua forma. A seguir foram testados quanto à sua capacidade de crescer em ágar Mac Conkey. Após, foram realizados os testes de oxidase. Os microrganismos também foram testados quanto à sua capacidade de oxidar e fermentar a glicose, produzir ácido sulfídrico e indol, possuir motilidade, fermentar a lactose, formar coágulos e formar gás (*Litmus milk*). Os testes foram realizados a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e os tubos incubados por 10 dias.

4.1.4 Identificação dos microrganismos psicrotróficos utilizando sistema de espectrometria de massas com ionização por dessorção a laser assistida por matriz acoplado à espectrometria de massas em tempo de voo (MALDI TOF MS)

A identificação dos microrganismos psicrotróficos utilizando MALDI TOF MS foi realizada no Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO – MAPA).

Os microrganismos isolados foram semeados por esgotamento em TSA (Kasvi®) e incubados a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco dias. As colônias mais isoladas foram selecionadas, transferidas para tubos contendo 300 μL de água ultrapura e adicionadas de 900 μL de etanol absoluto (Exodo científica® 99,9%). O conteúdo foi centrifugado e o sobrenadante descartado. Ao precipitado formado foi adicionado 25 μL de ácido fórmico 70% seguido de homogeneização utilizando agitador tipo vórtex,

visando promover a lise dos microrganismos. Em seguida foi adicionado 25 μ L de acetonitrila seguidos de homogeneização utilizando agitador tipo vórtex e centrifugação a 12.000g, a temperatura de 5°C por 2 min. Foi aplicado 1 μ L do sobrenadante na placa do MALDI TOF MS e manteve-se em temperatura ambiente para a secagem. Em seguida foi adicionado 1 μ L da matriz e aguardou-se a secagem. A matriz consiste em uma solução saturada de ácido α -cyano-4-hydroxycinâmico na concentração de 10 mg/mL preparada em uma solução água: acetonitrila; ácido trifluoroacético (47,5:50:2,5;v/v).

Foi utilizado um sistema MALDI-TOF, modelo Autoflex Speed[®], utilizando o software de aquisição FlexControl[®] e tratamento de dados pelo uso do software Biotyper[®] (Bruker, Alemanha). A avaliação da performance do equipamento foi realizada por meio da calibração de massas utilizando-se de padrões comerciais disponibilizados pelo fabricante, na faixa de avaliação de m/z 2.000-20.000. Como controle positivo foi utilizada uma espécie de referência de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Para a interpretação dos resultados, os pontos de corte recomendados pelo fabricante foram utilizados para determinar a identificação segura ao nível de espécie (≥ 2.300), identificação segura ao nível de gênero e provável identificação ao nível de espécie (2.000 a 2.299), identificação provável ao nível de gênero (1.700 a 1.999) e sem identificação confiável (<1.699) (ALMUZARA et al., 2015).

4.1.5 Identificação de microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas líticas

Os microrganismos psicrotróficos foram avaliados quanto à sua capacidade de produzir enzimas proteolíticas. Para isso foram inoculados em TSA (Kasvi[®]) suplementado com 5% de leite desnatado reconstituído a 10% e incubados nas temperaturas de 37 $^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C por 48 horas e 7 $^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C por 10 dias. Cepas positivas para a produção de enzimas proteolíticas foram identificadas pela formação de halo transparente ao redor da zona de crescimento da colônia. Para verificar a qualidade do meio teste foi utilizada como controle positivo a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), conhecida por sua capacidade de produzir enzimas proteolíticas. Já a produção de enzimas lipolíticas foi testada através da inoculação dos isolados em ágar tributirina (Sigma Aldrich[®]) 1% e incubação nas temperaturas de 37 $^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C por

48 horas e $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 dias. Testes positivos se caracterizavam pela presença de halo transparente ao redor da colônia. Como controle positivo foi utilizado o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), conhecido por sua capacidade de produzir enzimas lipolíticas (BRASIL, 1993).

4.1.6 Caracterização físico-química do leite cru refrigerado

Foram quantificadas densidade, percentuais de gordura, extrato seco desengordurado e acidez titulável conforme análises definidas pela IN68/2006 MAPA (Instrução Normativa n°68/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) (BRASIL, 2006).

4.2 Estudo do comportamento dos microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas

4.2.1 Curvas de crescimento

Os microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas foram avaliados quanto ao seu tempo de geração em duas diferentes temperaturas $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e em dois diferentes meios: Caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e em meio leite desnatado reconstituído a 10%.

As curvas de crescimento a $36^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ teve suas contagens aferidas 1, 2, 4, 6, 10, 14, 20 e 26 horas após a inoculação. Já as curvas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ teve suas contagens aferidas 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a inoculação. Todas as análises foram feitas em triplicata.

4.2.2 Atividade enzimática em leite desnatado reconstituído a 10% contaminado com os microrganismos psicrotróficos proteolíticos isolados

Os microrganismos psicrotróficos proteolíticos isolados foram cultivados em caldo BHI por sete dias a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após este período, foi transferido 1 mL deste caldo para 99 mL de leite desnatado reconstituído a 10% (segundo a curva de crescimento as concentrações destes microrganismos seriam superiores a 10^6 UFC/mL no leite desnatado) e acondicionado a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. Em seguida, foi submetido à pasteurização lenta, sendo coletadas amostras para mensuração da

atividade enzimática à medida que o leite foi aquecendo. Foram quantificadas as atividades enzimáticas nas temperaturas de 10°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 65°C e durante os 10, 20 e 30 min de manutenção na temperatura de 65°C. Todas as análises foram feitas em duplicata.

A determinação da atividade das enzimas proteolíticas foi realizada pelo método de hidrólise da gelatina solúvel. Alíquotas de 100 µL de leite contaminado foram diluídas em 100 µL de tampão acetato de amônio 3,24 M a pH 5,5. Adicionou-se 10 µL de cisteína (Exodo científica®) 0,1 M e após 5 min a reação foi iniciada pela adição de 300 µL de solução 10 mg/mL de gelatina (Exodo científica®). A mistura foi incubada por 60 min a 37°±1°C e após foi adicionado 660 µL de isopropanol (Exodo científica®) e os tubos foram incubados por 15 min em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 10.000 g e os sobrenadantes resultantes removidos com auxílio de uma pipeta Pasteur. A absorbância foi determinada pelo espectrofotômetro a 280 nm. O espectrofotômetro foi calibrado utilizando-se uma solução idêntica à da análise de atividade enzimática, porém esta solução não foi incubada a 37°±1°C, impedindo a degradação provocada na gelatina pelas enzimas presentes no leite (NORNBERG, TONDO e BRANDELLI, 2009).

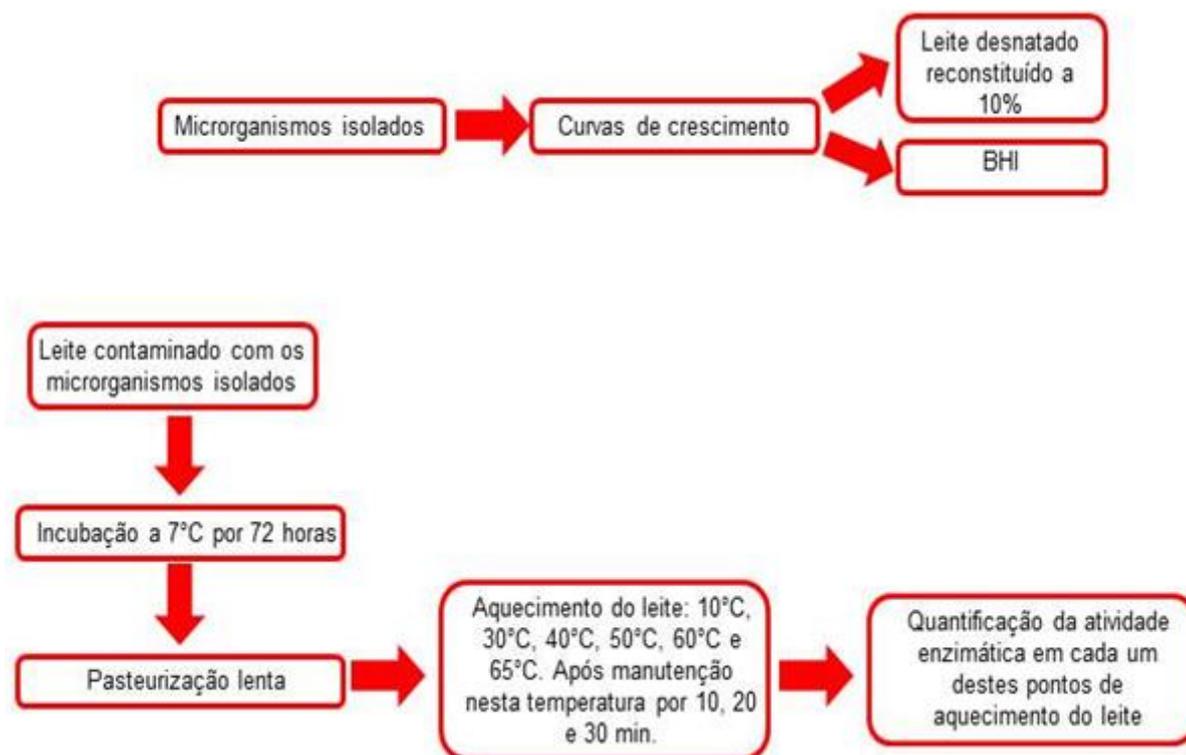


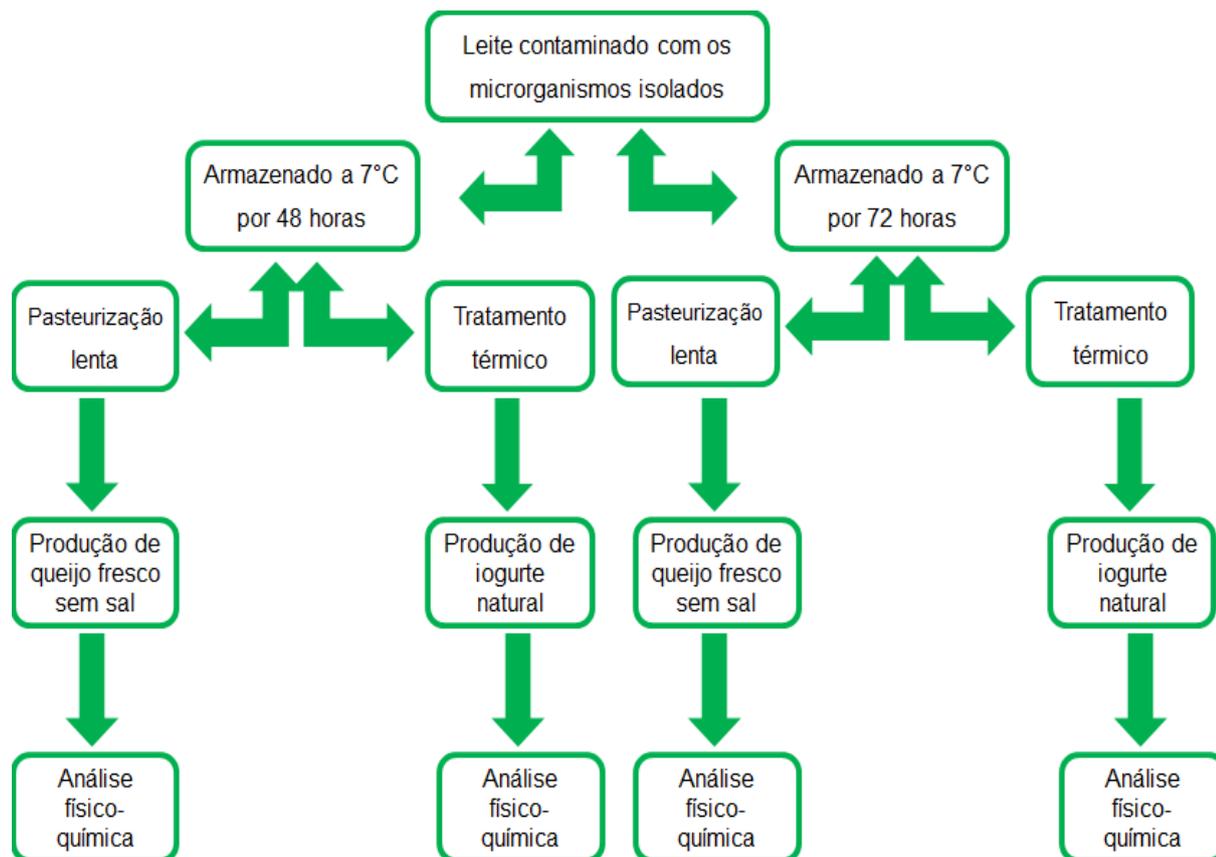
Figura 2: Fluxograma da avaliação das taxas de crescimento dos microrganismos produtores de enzimas proteolíticas e a atividade enzimática em leites com eles contaminados durante a pasteurização lenta

4.3 Produção dos derivados de leite

Os derivados foram produzidos em duplicata e realizadas três repetições por microrganismo psicrotrófico proteolítico inoculado. O resumo das atividades executadas nesta etapa é apresentado na figura 3.

4.3.1 Preparação da matéria-prima para produção dos derivados

Os microrganismos psicrotróficos proteolíticos isolados foram cultivados individualmente em tubos de ensaio contendo 20 mL de caldo BHI, a temperatura de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por sete dias (de acordo com a curva de crescimento, após uma semana, todos os microrganismos atingem concentrações superiores a 10^9 UFC/mL). Após os sete dias, 1 mL de cada tubo foi transferido para um Béquer contendo 1 litro de leite pasteurizado tipo B, sendo a concentração final de cada um destes microrganismos de aproximadamente 10^6 UFC/mL de leite pasteurizado. Como controle negativo (ou não inoculado) um mL de caldo BHI estéril foi adicionado a 1 litro de leite pasteurizado. Cada repetição continha 14 béqueres com 1 litro de leite pasteurizado, sendo quatro deles contaminados com cada um dos microrganismos isolados e dois controles negativos. A seguir, foram divididos em dois grupos iguais, sendo que sete béqueres foram armazenadas por 48 horas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e as outros sete por 72 horas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os leites eram, necessariamente, do mesmo lote e, conseqüentemente, tinham o mesmo prazo de validade.



Tratamento térmico: Aquecimento a 85°C, mantido nesta temperatura por 15 min e resfriado a 42°C imediatamente.

Figura 3: Fluxograma da preparação da matéria-prima para produção de queijo fresco sem sal e iogurte natural a partir de leite intencionalmente contaminados com microrganismos psicrotróficos proteolíticos

4.3.2 Produção do queijo fresco sem sal

A figura 4 mostra o fluxograma da produção do queijo fresco sem sal.

Após o armazenamento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 ou 72 horas, o leite contaminado com os microrganismos psicrotróficos proteolíticos isolados foi pasteurizado (pasteurização lenta, aquecimento a 65°C , manutenção nesta temperatura por 30 min e resfriamento rápido a 5°C). Em seguida foi aquecido a 38°C e adicionado 1 mL de cloreto de cálcio a 20% (EMSURE®). Após a homogeneização foi adicionado 5 mL de quimosina (Há-la®) diluído em água estéril na proporção de 1/10 (conforme indicado no rótulo do produto) e a mistura foi deixada em banho-maria a $38^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 40 min. Em seguida a massa resultante da coagulação do leite foi cortada e agitada por 10 min para promover a separação do soro. O conteúdo foi vertido em uma forma para queijos estéril e deixado em repouso por 30 min, quando foi realizada a viragem. Após outros 30 min o queijo fresco resultante foi acondicionado em

recipientes plásticos estéreis e armazenado em refrigeração a $4^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por dez dias. Não foi realizada a salga do produto para evitar que os teores de sal interferissem no rendimento final do queijo fresco produzido.

4.3.3 Produção de iogurte natural

A figura 4 mostra o fluxograma da produção do iogurte natural.

Após o armazenamento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 ou 72 horas, o leite contaminado com os microrganismos psicrotróficos proteolíticos isolados foi tratado termicamente a fim de desnaturar as proteínas do soro (85°C , mantido nesta temperatura por 15 min e resfriado a $43^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ imediatamente). Ao atingir a temperatura de $43^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ foi adicionado 1 grama de fermento para produção de iogurtes (Docina® fermentação rápida contendo os microrganismos *S. salivarius* Thermophilus e *L. delbrueckii* Bulgaricus) por litro de leite, conforme indicado pelo fabricante do produto. Após breve homogeneização, a mistura foi dividida em duas alíquotas iguais, acondicionadas em dois novos recipientes e incubada a $43^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 4h. O iogurte foi resfriado a $4^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e por 30 dias, sendo avaliado quanto às suas características físico-químicas nestes dois momentos (LEE e LUCEY, 2010).

Fluxograma de produção do queijo fresco sem sal



Fluxograma de produção do iogurte natural



Tratamentos térmicos: Queijo fresco sem sal (65°C por 30 min); iogurte natural (85°C por 15 min).

Figura 4: Fluxogramas de produção do queijo fresco sem sal e iogurte natural

4.3.4 Quantificação de microrganismos psicotróficos e quantificação de enzimas proteolíticas

As quantificações de microrganismos psicotróficos e das atividades enzimáticas do leite utilizado como matéria prima para a produção dos queijos frescos sem sal e iogurtes naturais foram realizadas em duplicata e em dois momentos: No tempo zero, ou seja, na preparação da matéria-prima para a produção dos derivados e nos tempos 48 ou 72 horas, que correspondem ao fim do tempo de armazenamento seguido do tratamento térmico (no caso dos queijos, pasteurização lenta; no caso dos iogurtes tratamento térmico a 85°C).

Para a contagem de microrganismos psicotróficos foram feitas diluições decimais e inoculados 100 µL em Ágar de Contagem Padrão (PCA) e as placas foram acondicionadas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 dias. As contagens foram feitas em duplicata.

A determinação da atividade das enzimas proteolíticas foi realizada pelo método de hidrólise da gelatina solúvel (NORNBERG, TONDO e BRANDELLI, 2009).

4.3.5 Análises físico-químicas dos queijos frescos sem sal e iogurte natural produzidos

As análises físico-químicas foram realizadas em duplicata conforme estabelecido na IN 68/2006 MAPA. Foram analisados os percentuais de gordura, umidade, proteína e acidez titulável nos queijos frescos sem sal produzidos. Os iogurtes foram avaliados quanto aos seus percentuais de gordura e proteína e acidez titulável (BRASIL, 2006).

4.4 Análise estatística

Os resultados médios das contagens de microrganismos psicotróficos e das quantificações da atividade enzimáticas em leite utilizado como matéria-prima para a produção de queijos frescos sem sal e iogurtes naturais foram testados pela correlação de *Pearson*.

As médias das contagens de microrganismos psicotróficos e das quantificações da atividade enzimáticas foram comparadas por ANOVA, avaliando-

se suas diferenças de acordo com o microrganismo inoculado e os diferentes tempos de armazenamento.

As médias dos resultados das características físico-químicas dos queijos frescos sem sal produzidos com leite contaminado com os microrganismos psicotróficos proteolíticos isolados e armazenados por 48 e 72 horas a temperatura de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, foram analisados por ANOVA avaliando-se as diferenças entre os microrganismos inoculados e os tempos de armazenamento nos teores de gordura, proteína e umidade, na acidez titulável e no rendimento.

Os iogurtes naturais produzidos com leite contaminado com os microrganismos psicotróficos proteolíticos isolados e armazenados por 48 e 72 horas a temperatura de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ foram avaliados quanto às diferenças entre os microrganismos inoculados e os tempos de armazenamento nos teores de gordura, proteína e acidez. Também foram comparados os resultados médios obtidos nas análises realizadas no dia 0 e 30 dias após a produção do iogurte.

Para diferenças significativas ($p < 0,05$), o teste de Tukey foi aplicado para identificar grupos com médias homogêneas.

5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Análises microbiológicas e físico-químicas do leite cru refrigerado utilizado para o isolamento de microrganismos produtores de enzimas líticas

As médias dos resultados das análises microbiológicas e físico-químicas são apresentadas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Médias dos resultados das análises microbiológicas do leite cru refrigerado coletado uma unidade produtora localizada no município de Porto Alegre/RS

Amostra	Bactérias		Leveduras	
	Mesófilas totais (Log10UFC/mL)	Psicrotróficas totais (Log10 UFC/mL)	Mesófilas totais (Log10 UFC/mL)	Psicrotróficas totais (Log10 UFC/mL)
1	5,23 ± 0,27	5,29 ± 0,29	2,83 ± 0,58	2,38± 0,50
2	6,45 ± 0,32	5,29 ± 0,17	N.C	N.C
Média	5,74 ± 1,80	5,29 ± 0,34	2,83 ± 0,58	2,38± 0,50

N.C – Não apresentou contagens

Amostras coletadas em novembro/2015 e dezembro/2015

As contagens de mesófilos totais apresentaram média de 5,74 (Log10 UFC) por mL de leite. A Instrução Normativa nº 62 de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece contagens máximas de mesófilos totais de 5,48 (Log10 UFC) por mL de leite cru refrigerado, o que torna a média das contagens superior ao valor legalmente estabelecido. As médias das contagens de psicrotróficos totais foram 5,29 (Log10 UFC)/ mL e as médias das contagens de leveduras mesófilas e psicrotróficas foram respectivamente, 2,83 e 2,38 (Log10 UFC)/mL de leite cru refrigerado. Não existem valores legalmente estabelecidos para as contagens de psicrotróficos totais, bolores e leveduras em leite cru refrigerado.

Os valores médios das contagens de mesófilos totais, psicrotróficos totais e leveduras são semelhantes aos obtidos em estudos anteriores realizados em leite cru refrigerado produzido no Estado do Rio Grande do Sul. Porém, as contagens de mesófilos, psicrotróficos e leveduras podem variar de acordo com a região onde o leite cru refrigerado é produzido, o tipo de ordenha realizado, o estado sanitário do rebanho, manejo dos animais e higienização dos utensílios utilizados na ordenha, etc. (SANTANA et al, 2001; MORAES et al., 2005; NERO et al., 2005; PINTO,

MARTINS e VANETTI, 2006; ARCURI et al, 2008; BORGES et al., 2009; BRASIL, 2011; SILVEIRA e BERTAGNOLLI, 2014; VARGAS et.al, 2014; RECHE et al, 2015).

A contagem de mesófilos totais, apesar de não ser uma análise rotineira na indústria, pode servir como um indicativo da qualidade do leite cru. Contagens elevadas de microrganismos mesófilos podem estar relacionadas a ambientes e utensílios de ordenha mal higienizados, assim como estocagem do leite em temperaturas elevadas (SANTANA et al., 2001; SILVA et al., 2011).

Tabela 2: Médias dos resultados das análises físico-químicas do leite cru refrigerado coletado em uma unidade produtora localizada no município de Porto Alegre/RS

Amostra	%Gordura	%Extrato seco total	Densidade a 15°C	Acidez (g/100mL)
1	3,00 ± 0,00	10,86 ± 0,00	1028,20 ± 0,00	0,141 ± 0,007
2	3,23 ± 0,08	11,23 ± 0,10	1029,20 ± 0,00	0,149 ± 0,015
Média	3,12 ± 0,30	11,13 ± 0,66	1028,70 ± 1,22	0,145 ± 0,019

* Amostras coletadas em novembro/2015 e dezembro/2015

Os resultados das análises físico-químicas apontam que as amostras de leite cru refrigerado se enquadraram dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira, com exceção do extrato seco total, que se apresentou abaixo dos mínimos 12,4%. Os percentuais de gordura apresentaram os mínimos 3% exigidos, enquanto a densidade e acidez titulável se encontraram dentro da faixa legalmente estabelecida (BRASIL, 2011).

O percentual de extrato seco total é obtido pela soma de todos os componentes sólidos do leite. Alterações neste parâmetro físico-químico podem estar relacionadas a problemas metabólicos do rebanho. Esses problemas metabólicos incluem a acidose, que pode estar associada ao déficit hídrico e ao aumento da temperatura relacionado ao início do verão (FONTANELLI, 2001). Além disso, a adição fraudulenta de cloreto de sódio e sacarose podem aumentar os teores de extrato seco total e a adição de água pode reduzi-lo (BRASIL, 1983; BRASIL, 2011; DIAS et al., 2016)

A qualidade do leite tem sido assunto recorrente nos últimos anos. Alguns pesquisadores têm demonstrado a qualidade do leite cru com base em parâmetros microbiológicos e físico-químicos, comparando-os com a legislação vigente. Esses estudos têm como resultados não conformidades nos parâmetros do leite cru

avaliados, independente da localização onde foram realizadas as amostragens (BORGES et al., 2009; VARGAS et.al, 2014; SILVEIRA e BERTAGNOLLI, 2014).

5.1.1 Isolamento de microrganismos psicrotróficos

Nove microrganismos foram isolados pela sua capacidade de se multiplicar a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. A proporção destes microrganismos na placa dos quais foram isolados é apresentada na tabela 3.

Tabela 3: Proporção dos microrganismos na placa da qual foram isolados

Isolados	Proporção na placa (%)
PA17125	9,40
PA26115A	1,40
MB9122	23,32
PA17124	7,22
PA17121	9,39
PA17122	13,60
PA26116	2,04
LPA26111	* 26,11
LPA26113	* 32,22

* Proporção de leveduras em BDA

As capacidades destes microrganismos de se multiplicar nas temperaturas de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ foram testadas, e os resultados são apresentados na tabela 4.

Dos microrganismos isolados, somente o MB9122 foi capaz de se multiplicar nas temperaturas de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os demais isolados multiplicaram-se somente na temperatura de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

A faixa de temperaturas nas quais os psicrotróficos podem se multiplicar é ampla. Segundo Moyer e Morita (2007), as temperaturas máximas de multiplicação dos psicrotróficos não ultrapassam 40°C . Porém Junior et al. (2017) identificaram diversos microrganismos psicrotróficos capazes de resistir a tratamentos térmicos semelhantes à pasteurização (SEEL, DERICHES e LIPSKI; 2016; TEIXEIRA et al., 2016).

Tabela 4: Resultados da avaliação dos crescimentos dos microrganismos psicrotróficos isolados em diferentes temperaturas

Isolados	37±1°C	25°±1C	7°±1C
PA17125	-	-	+
PA26115A	-	-	+
MB9122	+	+	+
PA17124	-	-	+
PA17121	-	-	+
PA17122	-	-	+
PA26116	-	-	+
LPA26111	-	-	+
LPA26113	-	-	+

5.1.2 Identificação dos microrganismos psicrotróficos

Os resultados dos testes bioquímicos são apresentados na tabela 5 e os resultados do MALDI TOF MS são apresentados na tabela 6.

Foram realizadas oito tentativas de identificação dos microrganismos isolados pelo sistema MALDI TOF MS, porém dos nove microrganismos isolados, apenas três foram identificados. Os microrganismos identificados ao nível de gênero foram o PA17125 e PA26115A, ambos classificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. Ao nível de espécie, foi identificado o MB9122 como *Butiauxella gavinae*.

A identificação por MALDI TOF MS tem sido utilizada atualmente devido à rápida resposta que ele proporciona. Este método se baseia na identificação dos microrganismos pela comparação do seu perfil proteico com os perfis proteicos contidos em um banco de dados. Sua desvantagem está relacionada à ausência de alguns perfis proteicos no banco de dados, o que impede a identificação de todos os microrganismos testados. Apesar disto, estudo realizado por Almuzara et al. (2015) na identificação de bacilos Gram negativos não fermentadores obtiveram como resultados percentuais superiores a 90% de compatibilidade entre as identificações do MALDI TOP MS em relação ao sequenciamento (TAGG et al., 2015).

Tabela 5: Resultados dos testes bioquímicos dos microrganismos psicrotróficos isolados

Isolado	Gram	Forma	Crescimento	Oxidase	Oxidação	Fermentação	Produção	Produção	Moti- Lidade	<i>Litmus milk</i>		Provável identificação
			Mac Conkey		glicose	glicose	H2S	Indol		Lactose	Grumos	
PA 17125	-	Bacilo uniforme	+	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
PA26115A	-	Bacilo uniforme	+	+	+	+	-	-	-	+	+	Vibrionaceae
MB9122	-	Bacilo uniforme	+	-	+	+	-	-	+	+	-	Enterobacteriaceae
PA17124	-	Bacilo uniforme	+	-	+	-	-	-	-	-	-	Não identificado
PA17121	-	Bacilo uniforme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Não identificado
PA17122	-	Bacilo uniforme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Não identificado
PA26116	-	Bacilo uniforme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Não identificado
LPA26111	L	Leveduriforme	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Não identificado
LPA26113	L	Leveduriforme	-	-	+	+	-	-	-	-	-	Não identificado

* L = Levedura

Tabela 6: Resultados da identificação por MALDI TOF MS dos microrganismos psicrotróficos isolados

Isolado	Identificação MALDI TOF MS	Escore MALDI TOF MS	Identificação conforme escore
PA 17125	<i>Pseudomonas synxantha</i>	2,169	<i>Pseudomonas</i> sp.(PA17125)
PA26115A	<i>Pseudomonas lundensis</i>	2,242	<i>Pseudomonas</i> sp.(PA26115A)
MB9122	<i>Butiauxella gaviniae</i>	2,307	<i>Butiauxella gaviniae</i>
PA17124	<i>Pseudomonas taetrolens</i>	1,912	Não identificado
PA17121	Não identificado	<1,70	Não identificado
PA17122	Não identificado	<1,70	Não identificado
PA26116	Não identificado	<1,70	Não identificado
LPA26111	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1,981	Não identificado
LPA26113	Não identificado	<1,70	Não identificado

Estudos realizados por Vithanage et al. (2016) e von Neubeck et al. (2015) identificaram espécies do gênero *Pseudomonas* sp. como umas das mais prevalentes em leite cru refrigerado. Também têm sido relatados em outros produtos de origem animal, principalmente os resfriados. A capacidade de alguns membros deste gênero de formar biofilme pode ser um dos fatores facilitadores a sua presença nestes produtos (HANTSIS-ZACHAROV e HALPERN, 2007; CREGENZÁN-ALBERTI et al., 2014; DE ALMEIDA et al., 2014; PINHO et al., 2014; CREGENZÁN-ALBERTI et al., 2015; LIU et al., 2015; LO et al., 2015; MARTINS et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; BEKKER et al., 2016; MACHADO et al. 2016; MORALES et al., 2016; PEREIRA, 2016; WALTER et al., 2016).

Espécies do gênero *Butiauxella* são raramente estudadas e há poucos relatos na literatura, sendo que as principais fontes de isolamento destas bactérias são solo e secreções. De Baere et al. (2002) isolou *B. gaviniae* de pacientes com patologia de medula espinhal e bexiga. Relatos em alimentos são escassos. Espécies do gênero *Butiauxella* sp. foram isoladas de leite pasteurizado, já a *B. gaviniae* foi identificada em carnes resfriadas (DWORKIN, 2006; HE et al., 2009; CANTONI E IBBA, 2013).

Os resultados da identificação proporcionada pelos testes bioquímicos foram, em parte, incompatíveis com os resultados obtidos por MALDI TOF MS. Por isso, os isolados utilizados nas próximas etapas do trabalho foram nominados por códigos e não por sua espécie.

5.1.3 Identificação de microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas líticas

A tabela 7 mostra os resultados dos testes com Agar TSA suplementado com 5% de leite desnatado reconstituído a 10% (produção de enzimas proteolíticas) e Agar tributirina 1% (produção de enzimas lipolíticas).

Quanto à capacidade de produzir enzimas proteolíticas, três microrganismos a apresentaram a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e somente um deles a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Figura 5). Os microrganismos produtores de enzimas proteolíticas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ foram o PA17125, o PA 26115A e MB9122. Nenhum dos microrganismos isolados apresentou capacidade de produzir enzimas lipolíticas nas temperaturas de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Estudo realizado por Baur et al (2015) identificou em leite cru refrigerado cepas de espécies do gênero *Pseudomonas* sp. que produziam predominantemente proteases, e tinham maior atividade enzimática em temperaturas próximas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, o que coincide com as temperaturas de resfriamento do leite. Von Neubeck et al. (2015) demonstraram que aproximadamente 85% dos isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. apresentaram capacidade de produzir enzimas líticas. Também afirmam que os representantes do gênero *Pseudomonas* sp. têm tendência a produzir enzimas proteolíticas isoladas ou em combinação com enzimas lipolíticas, enquanto a produção de enzimas lipolíticas isoladamente é mais rara.

Tabela 7: Resultados dos testes de avaliação da produção de enzimas líticas

Isolados	Lipólise		Proteólise	
	$37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$	$7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$	$37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$	$7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$
PA17125	-	-	-	+
PA26115A	-	-	-	+
MB9122	-	-	+	+
PA17124	-	-	-	-
PA17121	-	-	-	-
PA17122	-	-	-	-
PA26116	-	-	-	-
LPA26111	-	-	-	-
LPA26113	-	-	-	-

5.2 Estudo do comportamento dos microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas

As taxas de crescimento dos microrganismos isolados PA17125, PA26115A e MB9122 foram avaliadas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ com a intenção de mimetizar as condições de armazenamento na propriedade rural. Apesar da curva de crescimento ser feita com o microrganismo isolado, o que não corresponde à condição na qual ele se encontra no leite cru refrigerado, pode-se ter uma estimativa de sua taxa de crescimento.

5.2.1 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do PA17125 e PA 26115A e a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}$ e $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do MB9122 são apresentadas nos gráficos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.

As curvas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do PA17125, PA26115A e do MB9122 tiveram uma fase inicial com menores taxas de crescimento que durou aproximadamente 12 horas. Nas 180 horas seguintes os microrganismos cresceram exponencialmente, não atingindo a fase estacionária no período avaliado. O crescimento do PA17125 em 48 e 72h corresponde a aproximadamente quatro ciclos logarítmicos, independente do meio em que foi avaliado. Já o PA26115A e a MB9122 cresceram em 48 e 72h cerca de seis ciclos logarítmicos.

O crescimento a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do MB9122 tem sua fase exponencial a partir de duas horas após o início da incubação, mantendo-se nesta fase durante as 26 horas avaliadas. O crescimento dos microrganismos isolados foi muito semelhante nos dois diferentes meios testados.

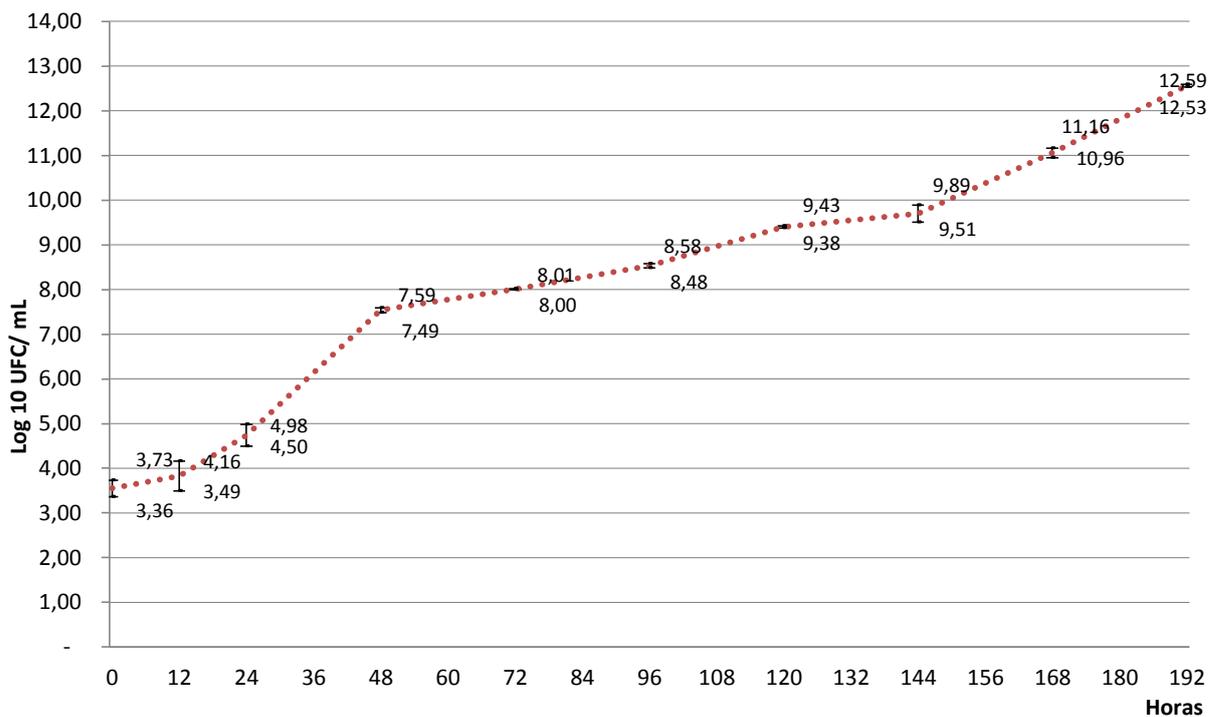
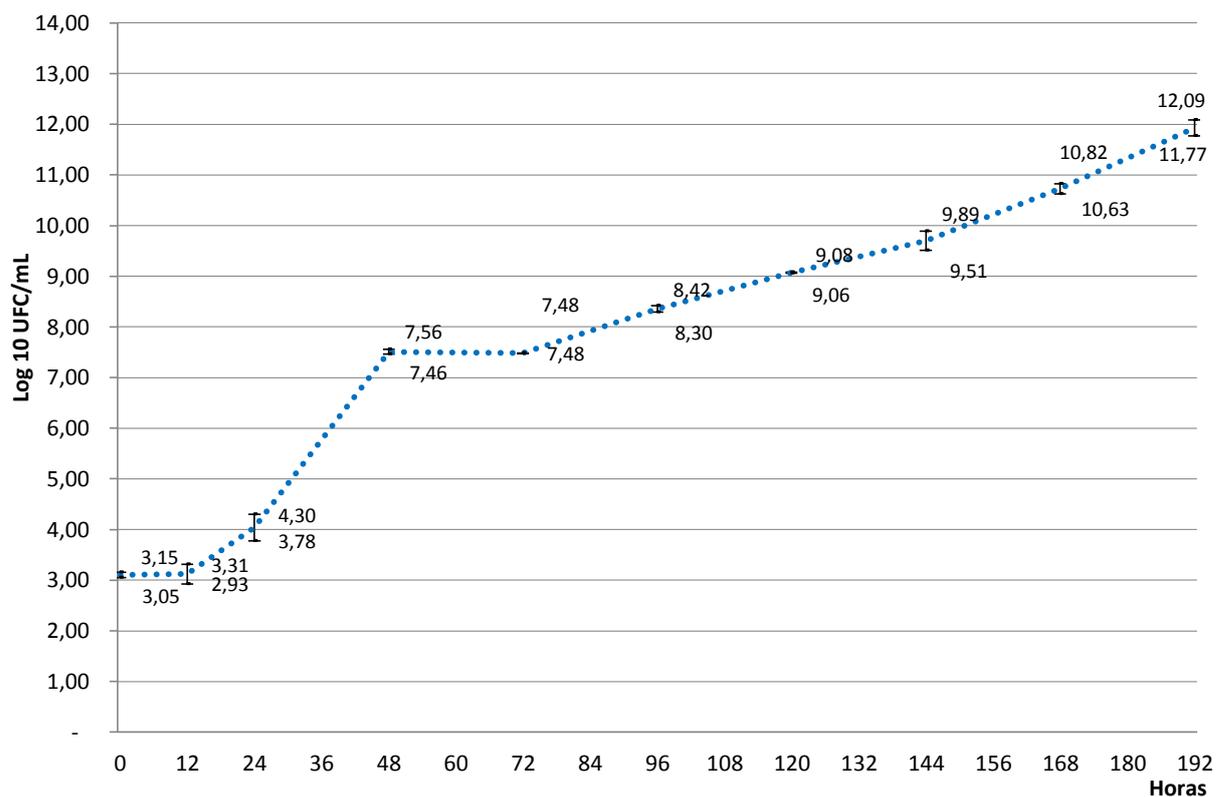
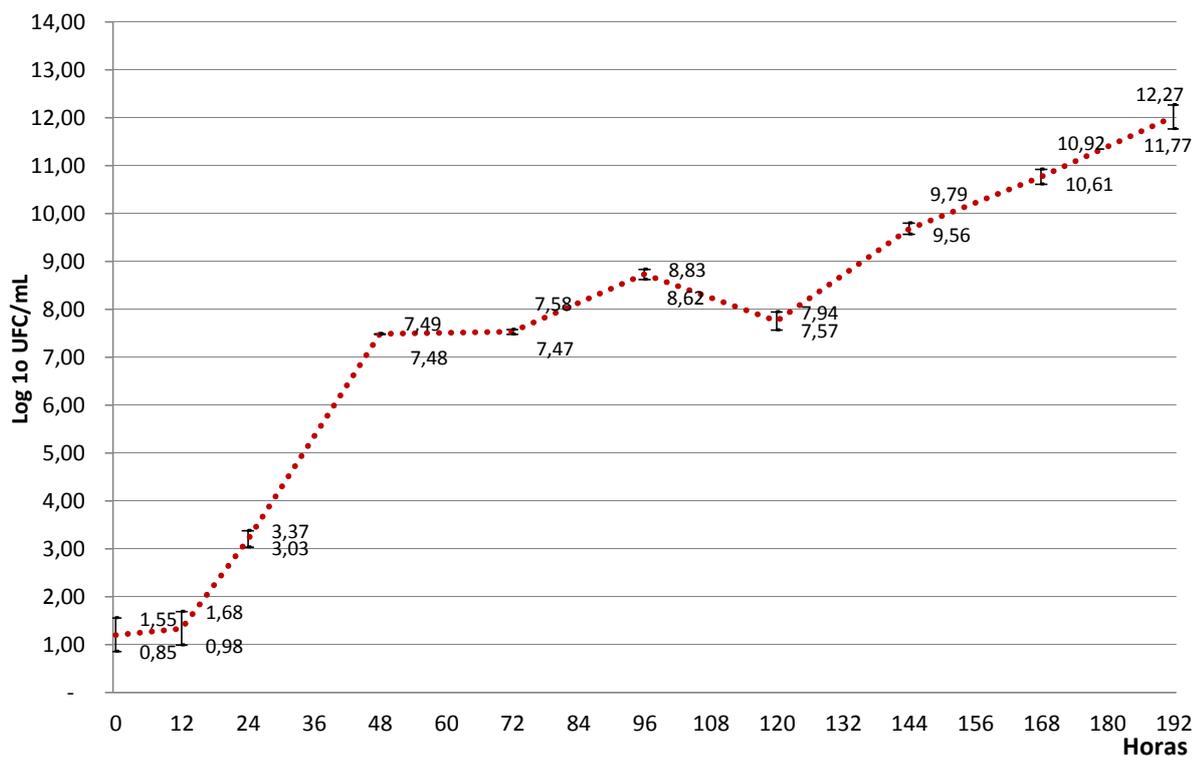
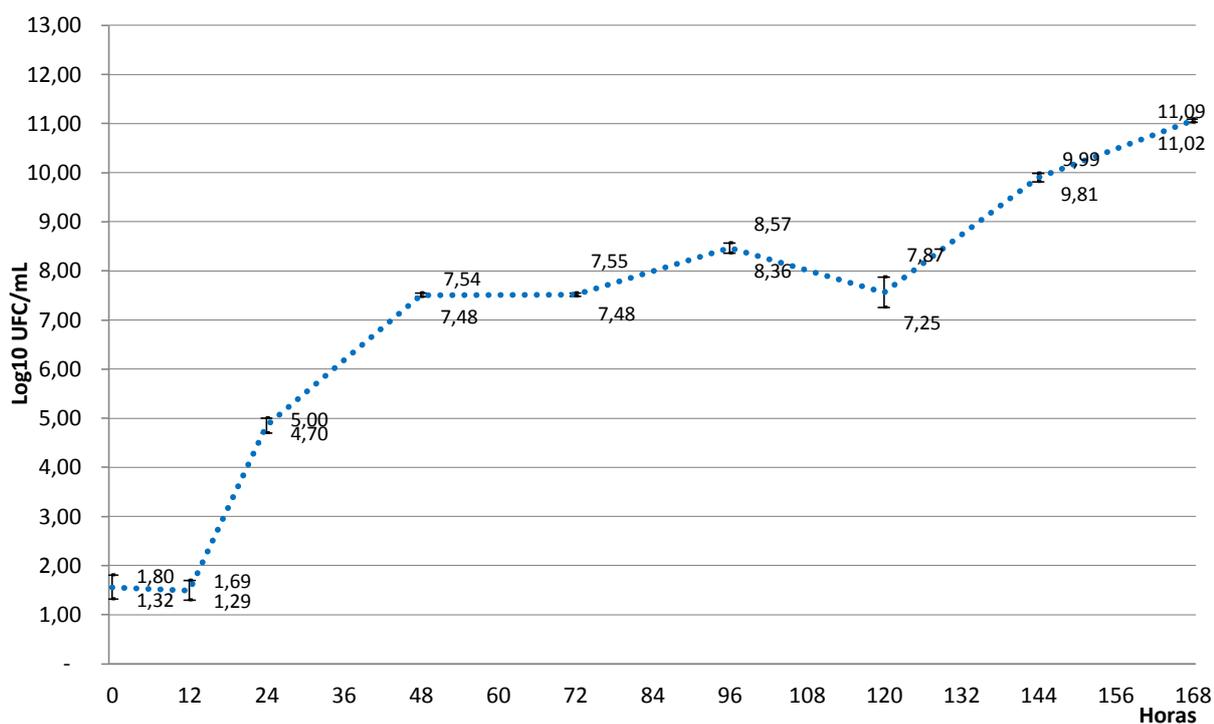
Gráfico 1: Curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado PA17125 em caldo BHIGráfico 2: Curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado PA17125 em leite desnatado reconstituído a 10%

Gráfico 3: Curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado PA26115A em caldo BHIGráfico 4: Curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado PA26115A em leite desnatado reconstituído a 10%

* Após 168 horas de incubação o leite desnatado esterilizado coagulou, impedindo a continuidade do teste devido a formação de coágulos. Os coágulos obstruíram as ponteiros com as quais as amostras eram quantificadas.

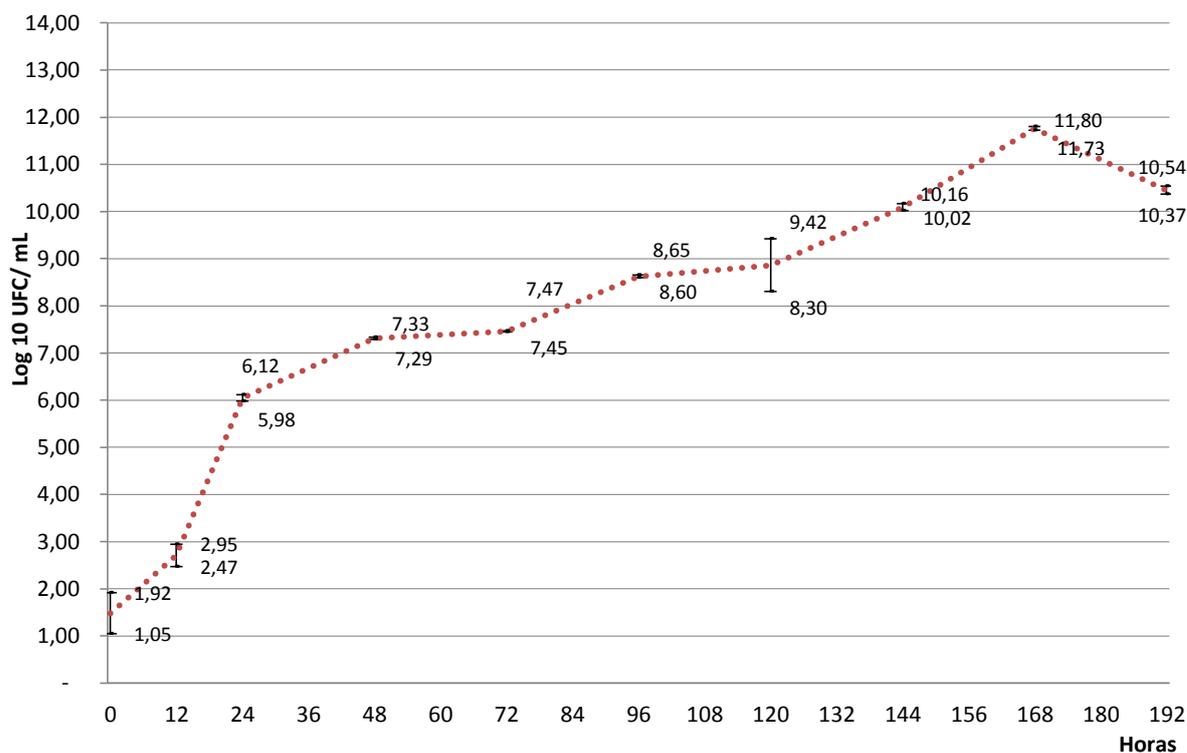
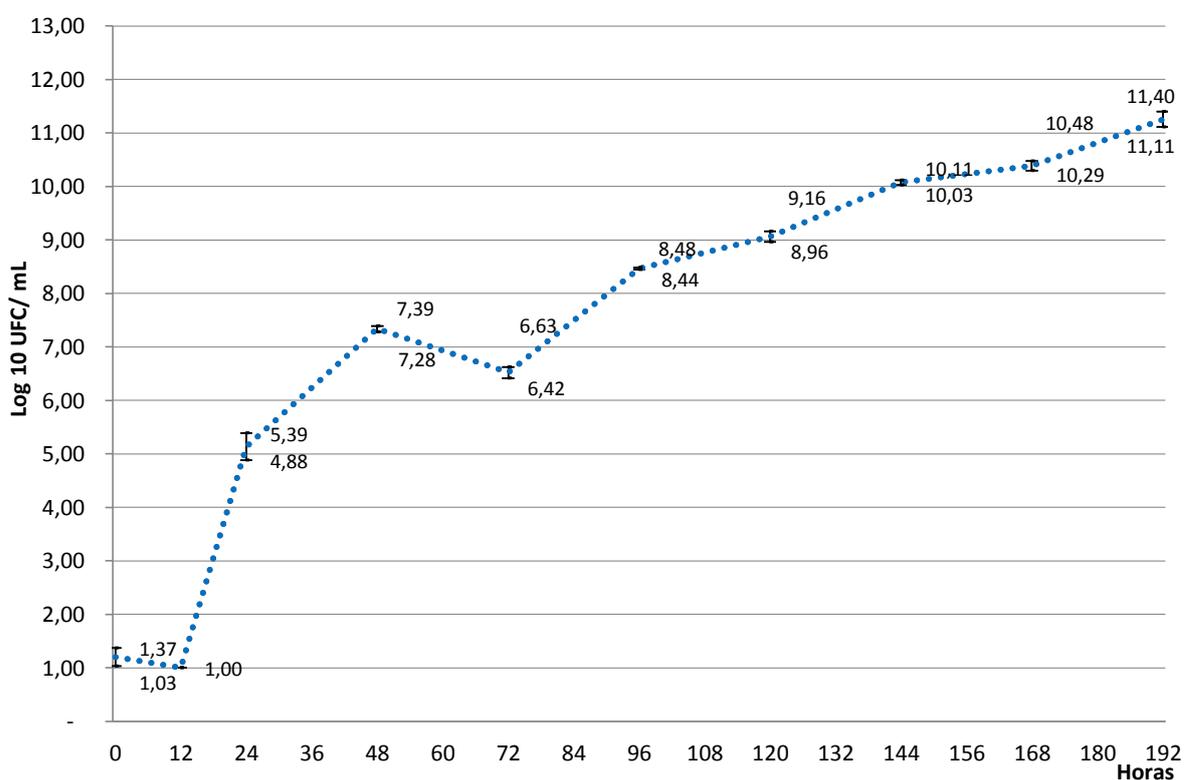
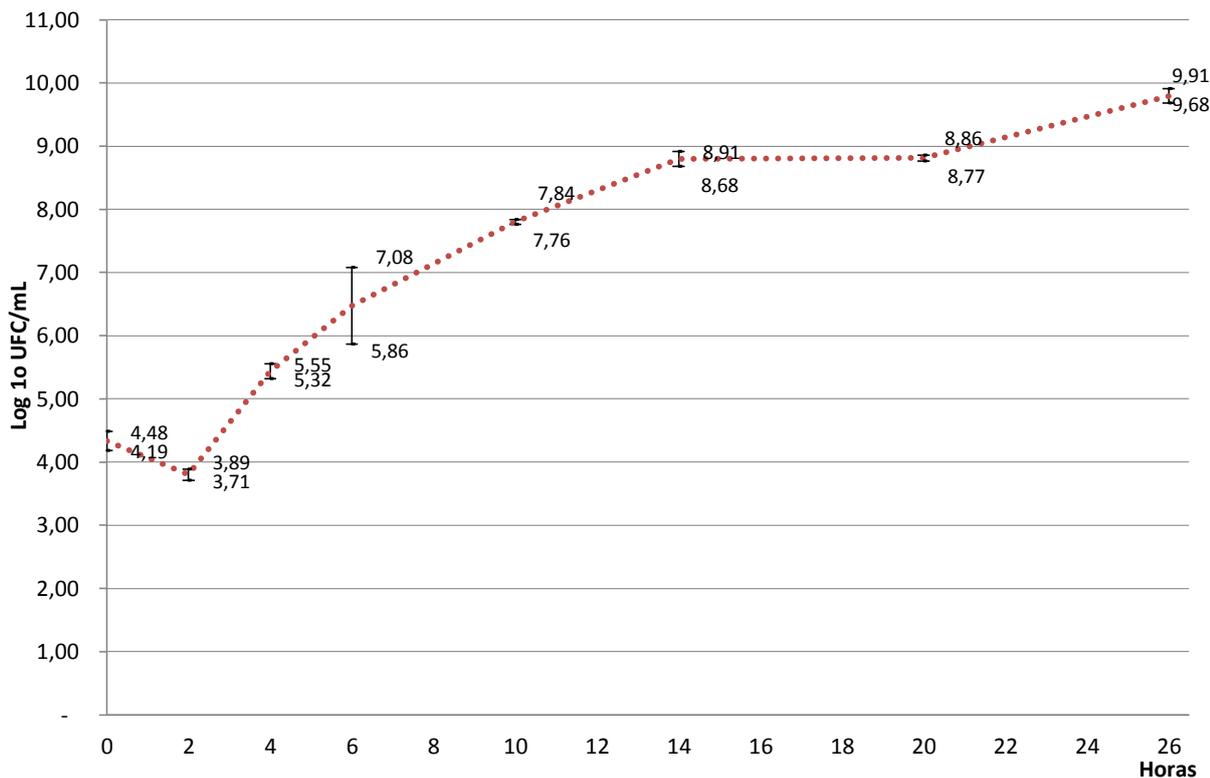
Gráfico 5: Curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado MB9122 em caldo BHIGráfico 6: Curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado MB9122 em leite desnatado reconstituído a 10%

Gráfico 7: Curva de crescimento a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ do isolado MB9122 em caldo

* A curva de crescimento a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ em leite desnatado reconstituído a 10% não pode ser realizada pois após seis horas de incubação a 37°C o leite desnatado coagulava, impedindo a continuidade do teste devido a formação de coágulos. Os coágulos obstruíram as ponteiras com as quais as amostras eram quantificadas.

Estudo realizado por Stoeckel et al. (2016) avaliou as fases do crescimento a 6°C de cepas de espécies do gênero *Pseudomonas* sp., observando que elas atingiam a fase estacionária dentro de 3-4 dias, porém suas fases de adaptação eram variadas. Dos Santos et al. (2010) obtiveram como resultados taxas de crescimento semelhantes para a *Pseudomonas fluorescens*, porém com inóculos iniciais maiores.

Os microrganismos psicrótróficos quando submetidos a temperaturas próximas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ apresentam fases de adaptação mais longas quando comparadas a dos mesófilos em temperaturas superiores a $30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Tal fato foi determinante na definição dos tempos de refrigeração máximos permitidos pela legislação, onde são permitidas 48h de armazenamento do leite cru na propriedade rural em temperaturas de 4°C em tanques de expansão e 7°C em tanques de imersão. Após 48h, o leite deve ser processado (BRASIL, 2011).

Espécies do gênero *Pseudomonas* sp. apresentam-se mais ativas enzimaticamente em temperaturas semelhantes as do armazenamento do leite cru.

Entretanto, como o início da produção de enzimas provavelmente se dá ao final da fase exponencial e início da fase estacionária (cerca de 3-4 dias de tempo de armazenamento), as 48 horas de armazenamento não seriam suficientes para iniciar a produção de enzimas e, conseqüentemente, iniciar os efeitos espoliativos por elas acarretados (STOECKEL et al., 2016). No entanto, contagens superiores a 10^6 UFC/mL seriam suficientes para iniciar a produção de enzimas pelos microrganismos psicrotróficos, ou seja, contaminações iniciais elevadas podem antecipar o início da produção de enzimas e, conseqüentemente, a espoliação do leite cru refrigerado e dos derivados com ele produzidos (PINTO, MARTINS e VANETTI; 2006; NORBERG, TONDO e BRANDELLI, 2009; BRASIL, 2011; TEH et al., 2014; BAUR et al., 2015; RECHE et al., 2015).

Após 168 horas de crescimento do PA26115A em meio leite desnatado reconstituído a 10%, este coagulou impedindo a continuidade do teste. Por isso, foi aferida a acidez titulável com intuito de verificar as causas de tal coagulação. Os resultados são apresentados na figura 6.

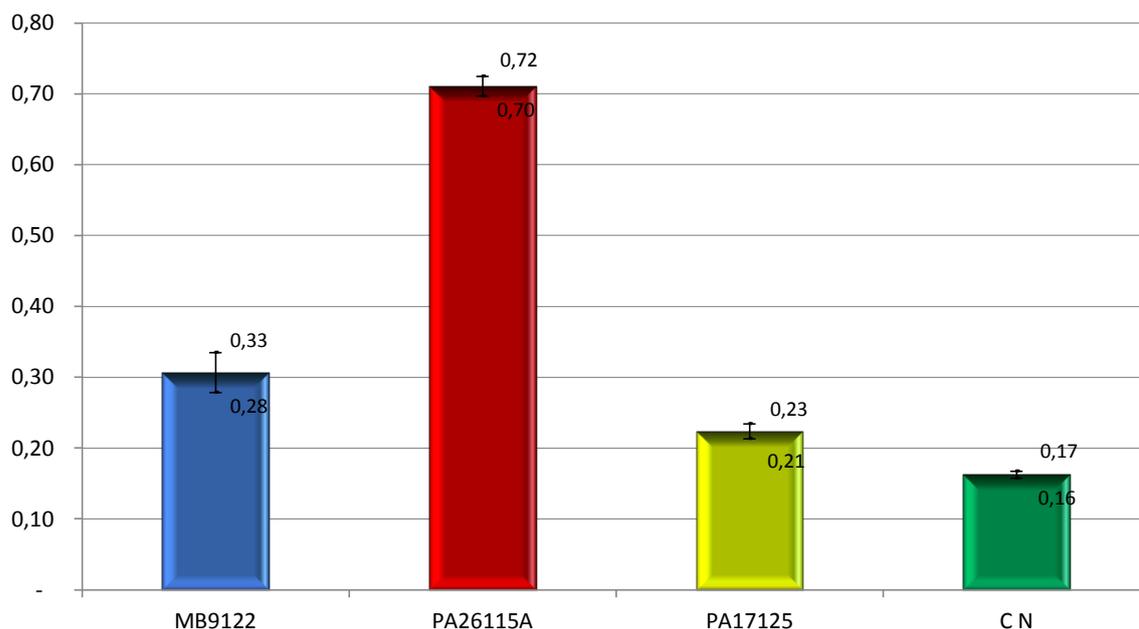


Figura 5: Média da acidez titulável aferida no leite desnatado reconstituído a 10% contaminado com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122 no final da curva de crescimento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$

A acidez titulável do leite desnatado reconstituído a 10% contaminado com o isolado PA26115A apresentou, após 168 horas incubação a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, média de 0,703 g de ácido láctico/100mL, enquanto o que não foi contaminado com os

microrganismos proteolíticos (controle negativo), apresentou apenas 0,161 g de ácido láctico/100mL. Nos leites desnatados reconstituído a 10% contendo o isolado PA17125 e MB9122 os valores de acidez foram 0,221 e 0,303 g de ácido láctico/100mL, respectivamente.

A identificação do MALDI TOF MS classificou o isolado PA26115A como pertencente ao gênero *Pseudomonas* sp. Porém, a formação de ácidos pela fermentação da lactose durante a incubação a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ não é típica deste gênero. Este fato aliado aos resultados dos testes bioquímicos classificam este isolado como pertencente à família Vibrionaceae, provavelmente pertencente ao gênero *Aeromonas* sp., sendo que estes microrganismos fazem parte da microbiota do leite cru refrigerado (LAFARGE et al., 2004; MOORE et al., 2006; DALIÈ et al., 2010; MACHADO et al., 2011; CIZEIKIENE et al., 2013; GEREZ et al., 2013; STELATTO et al., 2016; VITHANAGE et al., 2016)

5.2.2 Atividade enzimática do leite desnatado reconstituído a 10% contaminado com o isolado PA17125, PA26115A, MB9122 e controle (não inoculado) durante a pasteurização lenta

Os resultados das médias das quantificações das atividades enzimáticas dos leites desnatados reconstituídos a 10% contaminados com o isolado PA17125, PA26115A, MB9122 e controle (não inoculado) durante a pasteurização lenta são apresentados no grafico 8, 9,10 e 11.

Grafico 8: Atividade enzimática (U/mL) do leite contaminado com o isolado PA17125 durante a pasteurização lenta

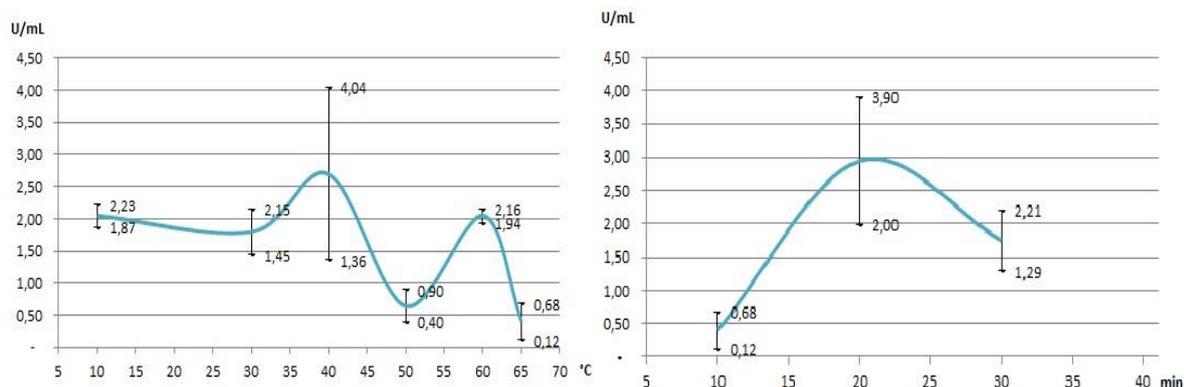


Grafico 9: Atividade enzimática (U/mL) do leite contaminado com o isolado PA26115A durante a pasteurização lenta

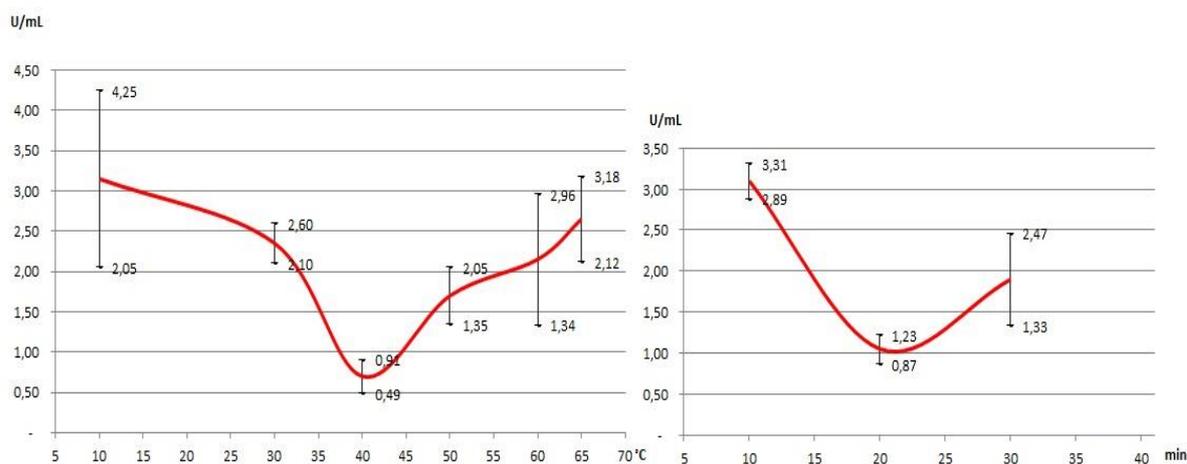


Grafico 10: Atividade enzimática (U/mL) do leite contaminado com o isolado MB9122 durante a pasteurização lenta

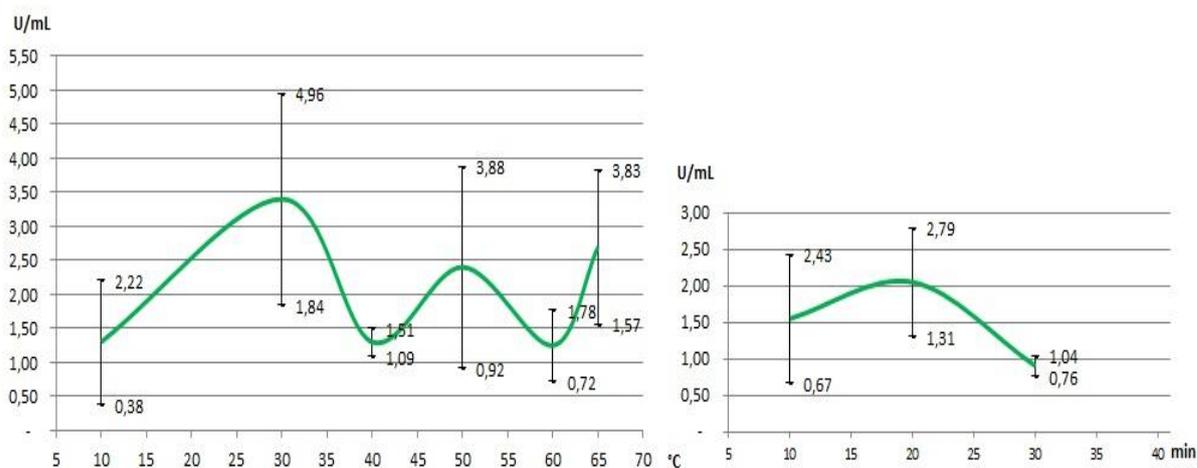
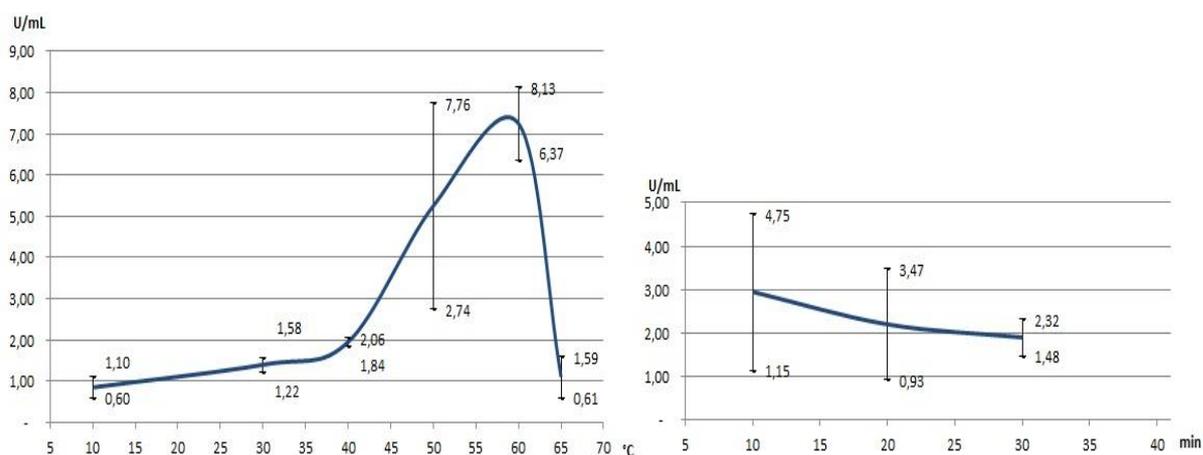


Grafico 11: Atividade enzimática (U/mL) do leite não inoculado (controle negativo) durante a pasteurização lenta



Antes de iniciar o aquecimento (temperatura de 10°C) as atividades enzimáticas dos leites contaminados com isolado PA17125, PA26115A, MB9122 e controle eram de 2,3; 1,6; 2,6 e 1,2 U/mL, respectivamente. Ao longo do aquecimento, as atividades enzimáticas variaram. O leite contaminado com o PA17125 apresentou o máximo de atividade enzimática aos 40°C (4,6 U/mL). Ao final do aquecimento a atividade enzimática deste leite era de 1,1 U/mL. Já o leite contaminado com o PA26115A atingiu o máximo de atividade enzimática a 65°C (3,4 U/mL) decaindo a 1,1 U/mL ao final do aquecimento. O leite contaminado com MB9122 teve máximos de atividades enzimáticas a 30°C e 65°C, onde atingiu 5,6 e 4,3 U/mL, respectivamente. Porém, ao final do aquecimento a atividade enzimática baixou para 1,1 U/mL. O controle (leite não inoculado) apresentou um pico de atividade enzimática entre 50-60°C, o que não se repetiu nos leites contaminados. Além disso, a atividade enzimática ao final do aquecimento do leite não inoculado era superior à encontrada nos leites contaminados (2,5 U/mL).

Ao final do tratamento térmico, todas as amostras de leite (contaminados com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122 ou não inoculado) apresentaram atividades enzimáticas residuais, ou seja, as enzimas proteolíticas não foram completamente inativadas pelo aquecimento.

Estudos anteriores também identificaram atividades de enzimas proteolíticas residuais após os tratamentos térmicos. De Oliveira Pinto et al. (2015) observaram altas atividades proteolíticas residuais em meios contaminados com bactérias Gram-negativas dos gêneros *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Pseudomonas* e *Serratia*. Algumas estirpes produziram proteases termorresistentes com atividade residual superior a 100%. Marchand et al. (2009) afirmaram que muitas enzimas bacterianas são estáveis ao calor, permanecendo ativas após o tratamento térmico. O tratamento térmico, como a pasteurização e o tratamento com ultra-alta temperatura (UHT) não são suficientes para inativar algumas enzimas bacterianas. Estudo realizado por Stoeckel et al. (2016), com cepas de espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp. que sabidamente produziam enzimas termorresistentes, determinou que algumas delas resistiam a temperaturas superiores a 100°C.

A medida da atividade enzimática pelo método de gelatina solúvel (utilizado neste estudo) indica atividade de enzimas proteolíticas, que estão presentes no leite e a origem não é necessariamente microbiana, já que o leite

contém uma grande variedade de enzimas proteolíticas que podem ter origem na própria glândula mamária ou nas células sanguíneas. Enzimas próprias do leite, como a plasmina, podem ter sua atividade aumentada durante o tratamento térmico. A pasteurização pode aumentar os níveis de plasmina pela inativação térmica dos inibidores da conversão de plasminogênio (zimogênio) em plasmina, aumentando os níveis de atividade desta enzima no leite. Porém, a presença de proteases de origem microbiana pode modificar a molécula de caseína e demais proteínas do leite reduzindo assim, a ação da plasmina pela desconfiguração do seu sítio ativo (ISMAEL e NIELSEN, 2010; RICHOUX et al., 2014; STOECKEL, 2016, BHATT et al., 2017; ERSÖZ et al., 2017).

5.3 Análise microbiológica e físico-química dos derivados lácteos (queijos frescos sem sal e iogurtes naturais) produzidos com leite contaminado com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122

5.3.1 Contagens de microrganismos psicrotróficos e atividade enzimática do leite contaminado com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122 utilizado para a produção de queijos frescos sem sal e iogurtes naturais

As médias das contagens de microrganismos psicrotróficos e das atividades enzimáticas dos leites utilizados como matérias-primas para a produção dos queijos frescos sem sal e iogurtes naturais são apresentadas nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

As contagens de microrganismos psicrotróficos dos leites contaminados com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122 e o controle (leites utilizados como matéria-prima para a produção de queijos frescos sem sal e iogurtes naturais) foram avaliados por correlação de *Pearson* com as suas respectivas atividades enzimáticas não apresentando correlação significativa entre si.

Estudo realizado por Nornberg, Tondo e Brandelli (2009) também não obteve correlações significativas entre as contagens de microrganismos psicrotróficos e suas respectivas atividades enzimáticas nos leites crus refrigerados.

Tabela 8: Médias dos resultados das contagens de microrganismos psicrotróficos e das atividades enzimáticas dos leites utilizados como matéria-prima do queijo fresco sem sal

Microrganismo Inoculado	T.A (¹)	Psicrotróficos		Atividade enzimática (U/mL)		Diferença At. enzimática
		Antes do armazenamento	Após o armazenamento	Antes do armazenamento	Após o armazenamento	
PA17125	48	7,02±0,18 ^{Ba}	6,17±0,38 ^{Ba}	2,19±0,81 ^{Aa}	0,68±0,18 ^{Aa}	1,51±0,98 ^{Aa}
	72	7,86±0,41 ^{Ba}	7,02±0,35 ^{Ba}	1,90±0,39 ^{Aa}	0,93±0,84 ^{Aa}	0,97±0,83 ^{Aa}
PA26115A	48	8,10±1,09 ^{Aa}	8,45±1,71 ^{Aa}	1,52±1,21 ^{Aa}	1,20±0,43 ^{Aa}	0,33±1,42 ^{Aa}
	72	8,33±0,15 ^{Aa}	9,32±1,96 ^{Aa}	1,79±1,15 ^{Aa}	0,79±1,07 ^{Aa}	0,99±2,18 ^{Aa}
MB9122	48	7,95±0,64 ^{Aa}	8,59±0,40 ^{Aa}	1,63±0,87 ^{Aa}	0,76±0,78 ^{Aa}	0,87±1,65 ^{Aa}
	72	8,54±0,82 ^{Aa}	9,42±1,93 ^{Aa}	2,06±0,83 ^{Aa}	0,92±0,99 ^{Aa}	1,14±0,33 ^{Aa}
Controle (não inoculado)	48	6,10±0,49 ^{Ba}	6,20±0,78 ^{Ba}	1,61±0,44 ^{Aa}	0,59±0,85 ^{Aa}	1,02±1,29 ^{Aa}
	72	6,84±0,51 ^{Ba}	6,52±0,66 ^{Ba}	1,82±0,10 ^{Aa}	0,72±0,95 ^{Aa}	1,10±0,95 ^{Aa}

Microrganismo inoculado em leite pasteurizado tipo B; (1) T. A= Tempo em horas de armazenamento do leite a 7°C; as contagens e as atividades enzimáticas foram aferidas antes do armazenamento de 48h ou 72h a 7±1°C e após o período de armazenamento seguido da pasteurização lenta.

A, B,...: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de *Tukey* (P<0,05) em relação aos microrganismos inoculados. a, b,...: Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de *Tukey* em relação ao tempo de incubação (P<0,05).

As contagens de microrganismos psicrotróficos dos leites utilizados na produção de queijos frescos sem sal foram significativamente maiores quando eles foram inoculados com os isolados PA26115A e MB9122 tanto antes, quanto após o armazenamento por 48 e 72 horas seguido da pasteurização. O tempo de armazenamento não influenciou nas contagens de microrganismos.

As contagens de microrganismos psicrotróficos dos leites utilizados para a produção de iogurtes naturais foram significativamente menores no leite não inoculado (controle) nos dois diferentes tempos de armazenamento. As contagens foram significativamente maiores nos leites contaminados com o isolado PA17125 independentemente do tempo de armazenamento.

Após o tempo de armazenamento de 48 e 72 horas a 7°C, os isolados PA17125, PA26115A e MB9122 inoculados nos leites utilizados na produção de queijos frescos sem sal se multiplicaram, assim como os demais microrganismos psicrotróficos já presentes no leite pasteurizado. Apesar de também se multiplicarem nos leites utilizados para a produção de iogurtes naturais, o tratamento térmico a 85°C e manutenção desta temperatura por 15 min foi eficiente na eliminação dos microrganismos psicrotróficos.

Tabela 9: Médias dos resultados das contagens de microrganismos psicotróficos e das atividades enzimáticas dos leites utilizados como matéria-prima do iogurte natural

Microorganismo inoculado	T.A (¹)	Psicotróficos		Atividade enzimática (U/mL)		Diferença At. Enzimática
		Antes do armazenamento	Após o armazenamento	Antes do armazenamento	Após o armazenamento	
PA17125	48	7,90±0,48 ^{Aa}	>1	0,56±0,04 ^{Aa}	0,25±0,14 ^{Aa}	0,31±0,11 ^{Aa}
	72	7,78±0,20 ^{Aa}	>1	0,74±0,36 ^{Aa}	0,13±0,15 ^{Aa}	0,61±0,24 ^{Aa}
PA26115A	48	7,17±0,17 ^{Ba}	>1	0,38±0,25 ^{Aa}	0,82±1,05 ^{Aa}	-0,44±0,57 ^{Ba}
	72	6,76±0,21 ^{Ba}	>1	0,30±0,25 ^{Aa}	0,32±0,27 ^{Aa}	-0,02±0,35 ^{Aba}
MB9122	48	7,00±0,43 ^{Ba}	>1	0,58±0,57 ^{Aa}	0,095±0,13 ^{Aa}	0,48±0,43 ^{Aa}
	72	6,52±0,22 ^{Ba}	>1	0,62±0,47 ^{Aa}	0,64±0,32 ^{Aa}	-0,02±0,37 ^{Aba}
Controle (não inoculado)	48	4,36±0,05 ^{Ca}	>1	0,085±0,01 ^{Bb}	0,035±0,01 ^{Aa}	0,05±0,01 ^{Aba}
	72	4,60±0,00 ^{Ca}	>1	0,295±0,02 ^{Aa}	0,035±0,01 ^{Bb}	0,26±0,01 ^{Aa}

Microorganismo inoculado em leite pasteurizado tipo B; (1) T. A= Tempo em horas de armazenamento do leite a 7°C; as contagens e as atividades enzimáticas foram aferidas antes do armazenamento de 48h ou 72h a 7±1°C e após o período de armazenamento seguido do tratamento térmico a 85°C por 15 min.

A, B,...: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05) em relação aos microrganismos inoculados. a, b,...: Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey em relação ao tempo de incubação (P<0,05).

Os leites pasteurizados utilizados como meios para a inoculação dos microrganismos isolados não eram estéreis, já possuindo microrganismos psicotróficos em sua microbiota (conforme pode ser observado na tabela 8 e 9, no subitem controle não inoculado). A pasteurização lenta deve eliminar 95% dos microrganismos presentes, sendo sabidamente mais eficiente na eliminação deste tipo de microrganismo. Porém, existe uma população de microrganismos psicotróficos que provavelmente resistiu ao tratamento térmico realizado e se multiplicou ao longo dos dias na cadeia do frio (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006; BELOTI et al., 2015; JUNIOR et al., 2017).

Em relação às atividades enzimáticas do leite utilizado para a produção de queijo fresco sem sal, elas não apresentaram diferenças significativas ao se comparar os diferentes microrganismos inoculados e tempos de armazenamento. A diferença entre as atividades enzimáticas (D.A.E) também não apresentou diferenças significativas entre os diferentes microrganismos inoculados e tempos de armazenamento, o que ser indicativo que a pasteurização lenta teve efeitos semelhantes nas enzimas proteolíticas dos diferentes leites contaminados.

Já as atividades enzimáticas dos leites utilizados para a produção dos iogurtes naturais foram significativamente menores nos leites controles nos tempos

de armazenamento de 48 horas, antes do tratamento térmico. Após o tratamento térmico foi significativamente menor nos controle (não inoculados) nos tempos de armazenamento de 72 horas. A D.A.E do leite utilizado para a produção dos iogurtes naturais foram significativamente maiores nos leites contaminados com o isolado PA17125, independente do tempo de armazenamento e MB9122 em leites armazenados por 48 horas. Além disso, a D.A.E foram significativamente menores nos leites contaminados com PA26115A com tempos de armazenamento de 48 horas.

Nos leites utilizados tanto para a produção de queijos frescos sem sal quanto de iogurtes naturais foram detectadas atividades enzimáticas residuais ao final do tratamento térmico, ou seja, após o aquecimento algumas enzimas proteolíticas ainda permaneceram ativas. Isso pode ter um efeito prejudicial nos produtos lácteos durante o armazenamento prolongado. A atividade destas enzimas pode afetar as características do produto acabado, causando defeitos na funcionalidade e propriedades sensoriais (STOECKEL et al. 2016).

5.3.2 Características físico-químicas dos queijos frescos sem sal produzidos com leites intencionalmente contaminados com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122

Os resultados das análises físico-químicas e de rendimentos dos queijos frescos sem sal produzidos são apresentados na tabela 10.

Ao serem comparadas as médias dos valores obtidos para características físico-químicas e o rendimento dos queijos produzidos com leites contaminados com os isolados PA17125, PA26115A, MB9122 e controles (não inoculados), não foram observadas diferenças estatísticas entre eles. Em relação ao período de armazenamento as médias do rendimento e percentual de umidade apresentaram diferenças significativas, sendo o rendimento maior nos queijos produzidos com leites armazenados por 48 horas. As médias dos percentuais de umidade apresentaram-se superiores nos queijos produzidos com leite armazenado por 72 horas. Os teores de proteína, os teores de gordura e a acidez titulável não apresentaram diferenças estatísticas ao se avaliar os diferentes tempos de armazenamento.

Tabela 10: Médias dos resultados das análises físico-químicas dos queijos frescos sem sal produzidos

Microrganismo inoculado	T.A ⁽¹⁾	%Gordura	%Proteína	%Umidade	Acidez (g ac.lat/100g)	Rendimento
PA17125	48	13,31±0,92 ^{Aa}	14,64±0,63 ^{Aa}	62,87±3,44 ^{Aa}	0,077±0,008 ^{Aa}	3,46±0,11 ^{Aa}
	72	11,14±1,66 ^{Aa}	13,85±1,40 ^{Aa}	64,70±4,60 ^{Ab}	0,073±0,006 ^{Aa}	4,00±0,05 ^{Ab}
PA26115A	48	13,92±0,76 ^{Aa}	14,92±1,97 ^{Aa}	63,94±2,47 ^{Aa}	0,097±0,043 ^{Aa}	3,96±0,68 ^{Aa}
	72	14,16±0,40 ^{Aa}	15,34±1,55 ^{Aa}	67,05±0,16 ^{Ab}	0,04±0,008 ^{Aa}	4,62±0,22 ^{Ab}
MB9122	48	13,83±0,81 ^{Aa}	14,4±3,25 ^{Aa}	63,65±1,38 ^{Aa}	0,086±0,025 ^{Aa}	4,01±1,16 ^{Aa}
	72	13,59±0,00 ^{Aa}	14,99±3,26 ^{Aa}	70,25±4,28 ^{Ab}	0,075±0,035 ^{Aa}	4,44±0,35 ^{Ab}
Controle (não inoculado)	48	12,70±0,61 ^{Aa}	13,97±0,89 ^{Aa}	64,07±3,66 ^{Aa}	0,11±0,097 ^{Aa}	3,76±0,80 ^{Aa}
	72	14,07±1,50 ^{Aa}	14,45±0,36 ^{Aa}	65,78±1,12 ^{Ab}	0,08±0,024 ^{Aa}	4,03±0,22 ^{Ab}

Microrganismo inoculado em leite pasteurizado tipo B; (1) T. A= Tempo em horas de armazenamento do leite a 7°±1°C.

A, B,...: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05) em relação aos microrganismos inoculados. a, b,...: Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey em relação ao tempo de incubação (P<0,05).

O rendimento foi significativamente menor nos queijos produzidos com leite armazenado por 72 horas a 7°±1°C. Estudo realizado por Cardoso (2006) relacionou menores rendimentos na produção de queijo Minas Frescal a maiores contagens de microrganismos psicrotróficos.

Os maiores teores de umidade e menores rendimentos nas 72 horas de armazenamento do leite indicam que maiores períodos de refrigeração na unidade produtora de leite podem gerar prejuízos aos laticínios. Isso acontece porque são necessários maiores volumes de leite para produzir um quilo de queijo (rendimento) e mais água é retida na trama de caseína (coágulo), podendo reduzir os sólidos e por consequência, o valor nutricional. Maiores períodos de armazenamento em baixas temperaturas permitem que os microrganismos psicrotróficos aumentem suas populações e atinjam o final das fases de crescimento exponencial ou estacionária o que iniciaria a produção de enzimas (FOX et al., 2000; WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006).

Os menores rendimentos observados nos queijos produzidos com leites armazenados por 72 horas a 7°±1°C podem estar relacionados a perdas no corte e enforme do coágulo pela formação de coágulos mais fracos. Menores firmezas relacionadas à formação de coágulos frágeis podem ser atribuídas a proteólise da

caseína por enzimas de origem microbiana, o que faz com que a repulsão eletrostática das micelas não seja suficientemente diminuída, não formando coágulos firmes (CARDOSO, 2006; WALSTRA, WOUTERS e GEURTS; 2006).

A atividade residual das enzimas proteolíticas, mesmo após a pasteurização não pode ser confirmada, pois os teores de proteína não apresentaram diferença significativa. Este fato pode ser explicado pelo método de obtenção dos percentuais de proteína na amostra de queijo fresco sem sal, que se baseia na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida titulada. Os resultados podem ser expressos em percentual de proteínas, multiplicando-se a porcentagem do nitrogênio total por fator específico. A fragmentação em peptídeos menores não pode ser detectada por este método, já que este método detecta o resíduo da degradação das proteínas, o nitrogênio. Este método foi utilizado por ser considerado método “ouro” na determinação dos teores de proteína (BRASIL, 2006).

5.3.3 Características físico-químicas dos iogurtes naturais produzidos com leites intencionalmente contaminados com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122

Os resultados das análises físico-químicas dos iogurtes naturais são apresentados na tabela 11.

As médias dos resultados das análises dos percentuais de gordura no dia 0 foram significativamente maiores nos iogurtes produzidos com leites não contaminados, tanto quando armazenados $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 quanto por 72 horas. Já os percentuais de gordura no dia 30 não foram significativamente diferentes. A diferença entre os teores de gordura do dia 0 em relação ao dia 30 foi significativa somente nos iogurtes controles, onde houve uma redução nos percentuais de gordura no dia 30, independente do tempo de armazenamento do leite utilizado como matéria-prima.

Tabela 11: Média dos resultados das análises físico-químicas realizadas nos dias 0 e 30 após a produção dos iogurtes naturais

Microrg. inoculado	T.A	% Gordura			% Proteína			Acidez titulável (g ac. láctico/L)		
		(dia0)	(dia30)	G0 –G30	(dia 0)	(dia30)	P0 –P30	(dia 0)	(dia 30)	A0 –A30
PA17125	48	3,02±0,11 ^{Aa}	3,02±0,11 ^{Aa}	0,00±0,00 ^{Aa}	2,79±0,34 ^{Aa}	2,68±0,34 ^{Aa}	0,12±0,15 ^{Aa}	6,66±0,81 ^{Aa}	6,65±0,33 ^{Aa}	0,01±0,80 ^{Aa}
	72	3,40±0,19 ^{Aa}	3,52±0,11 ^{Aa}	-0,12±0,13 ^{Aa}	2,93±0,21 ^{Aa}	2,82±0,17 ^{Aa}	0,12±0,09 ^{Aa}	8,01±0,05 ^{Ab}	6,75±0,08 ^{Aa}	1,26±0,08 ^{Ab}
PA26115A	48	3,15±0,31 ^{Aa}	3,18±0,42 ^{Aa}	-0,03±0,20 ^{Aa}	2,77±0,32 ^{Aa}	2,71±0,29 ^{Aa}	0,06±0,03 ^{Aa}	6,42±1,22 ^{Aa}	6,69±0,08 ^{Aa}	-0,27±0,86 ^{Aa}
	72	3,48±0,04 ^{Aa}	3,35±0,19 ^{Aa}	0,13±0,17 ^{Aa}	2,85±0,13 ^{Aa}	2,77±0,22 ^{Aa}	0,08±0,21 ^{Aa}	7,35±0,95 ^{Ab}	6,99±0,46 ^{Aa}	0,36±0,49 ^{Ab}
MB9122	48	3,05±0,07 ^{Aa}	3,18±0,20 ^{Aa}	-0,13±0,19 ^{Aa}	2,83±0,27 ^{Aa}	2,81±0,12 ^{Aa}	0,03±0,16 ^{Aa}	6,72±0,60 ^{Aa}	6,92±0,14 ^{Aa}	-0,20±0,48 ^{Aa}
	72	3,53±0,45 ^{Aa}	3,50±0,14 ^{Aa}	0,03±0,42 ^{Aa}	2,80±0,08 ^{Aa}	2,80±0,37 ^{Aa}	0,003±0,24 ^{Aa}	7,68±0,12 ^{Ab}	7,16±0,23 ^{Aa}	0,52±0,16 ^{Ab}
Controle (não inoculado)	48	3,30±0,42 ^{Ba}	3,15±0,07 ^{Aa}	0,15±0,01 ^{Ba}	3,06±0,00 ^{Ba}	2,99±0,00 ^{Ba}	0,07±0,00 ^{Aa}	6,52±0,00 ^{Aa}	7,12±0,00 ^{Aa}	-0,60±0,00 ^{Aa}
	72	3,85±0,07 ^{Ba}	3,55±0,07 ^{Aa}	0,30±0,01 ^{Ba}	2,93±0,00 ^{Aa}	2,35±0,00 ^{Bb}	0,58±0,00 ^{Ba}	7,02±0,28 ^{Ab}	7,12±0,00 ^{Aa}	-0,10±0,00 ^{Ab}

Microrganismo inoculado em leite pasteurizado tipo B; TA= Tempo de armazenamento em horas; Diferença G0-G30= Percentual de gordura no dia seguinte a produção menos percentual de gordura 30 dias após a produção; Diferença P0-P30= Percentual de proteína no dia seguinte a produção menos percentual de proteína 30 dias após a produção; Diferença A0-A30= Acidez titulável (g de ácido láctico/1L) no dia seguinte a produção menos acidez titulável 30 dias após a produção.

A, B,...: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05) em relação aos microrganismos inoculados. A, b,...: Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey em relação ao tempo de incubação (P<0,05).

Quanto às médias dos resultados das análises dos percentuais de proteína, no dia 0 foram significativamente maiores nos iogurtes produzidos com leites não contaminados, tanto quando armazenados $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 quanto por 72 horas. Já os percentuais de proteína no dia 30 foram significativamente maiores quando produzidos com leite armazenados por 48 horas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e significativamente menores nos produzidos com leites armazenados por 72 horas. A diferença entre os teores de proteína foram significativamente maiores somente em iogurtes produzidos com leites armazenados por 72 horas, apesar da tendência de redução nos teores de proteína também ocorrer nos iogurtes produzidos com leites armazenados por 48 horas.

Os resultados médios da acidez titulável dos iogurtes naturais diferiram significativamente, sendo maiores em iogurtes produzidos com leites armazenados por 72 horas quando avaliados no dia 0. Este fato não se repetiu no dia 30, apesar da acidez titulável ser maior nos iogurtes produzidos com leites armazenados por 72 horas, as diferenças não foram significativas. A diferença entre a acidez titulável do dia 0 em relação ao dia 30 apresentou-se significativamente maior em iogurtes produzidos com leites armazenados por 72 horas.

Maior acidez nos iogurtes produzidos com leites armazenados por 72 horas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ pode estar relacionada ao aumento da fermentação da lactose por bactérias ácido-láticas psicrotólicas, que permanecem por mais tempo atuando antes da pasteurização do leite. Mesmo após 30 dias, com a redução do número de microrganismos relacionada ao tratamento térmico, ainda ocorre aumento da concentração de ácido láctico que pode estar associada à sobrevivência das bactérias ácido-láticas à pasteurização (LEE e LUCEY, 2010; JUNIOR et al., 2017).

As características físico-químicas dos queijos frescos sem sal produzidos com leite contaminado com os isolados PA17125, PA26115A, MB9122 e armazenado por 48 horas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, não se apresentaram diferentes dos queijos produzidos com leite não contaminado. Isso indica que, apesar de se encontrarem em grandes concentrações nos leites contaminados, estes microrganismos podem não ter sido capazes de produzir enzimas proteolíticas ou suas enzimas por eles produzidas foram destruídas pelos tratamentos térmicos. Além disso, as enzimas podem não ter função na degradação da caseína, não afetando a formação do coágulo.

Os queijos frescos sem sal produzidos com leites refrigerados a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$

por 72 horas apresentam menor rendimento que os queijos produzidos com leites refrigerados a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Além disso, a maior umidade presente nos queijos produzidos com leite refrigerado a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas também é indicativo de queda na sua qualidade. Apesar de não se confirmar as diminuições nos teores de proteínas, perdas de partículas dos coágulos relacionados à sua má formação podem ser atribuídas ao aumento dos microrganismos psicotróficos, o que reduz o rendimento dos queijos.

Os iogurtes apresentaram características diferentes quando produzidos com leites não inoculados, o que pode indicar que a contaminação por microrganismos psicotróficos afeta a composição deste derivado. Estudos avançados neste campo são necessários para avaliar os prejuízos na indústria.

5.4 Perspectivas futuras

Para a publicação do artigo científico serão repetidos os testes bioquímicos dos isolados, assim como a identificação do MALDI TOF MS. Além disso, os microrganismos isolados serão identificados por biologia molecular.

6 CONCLUSÃO

Foram isolados nove microrganismos psicrotróficos, sendo três deles produtores de enzimas proteolíticas das amostras de leite cru refrigerado. Os microrganismos psicrotróficos proteolíticos não obtiveram identificação definitiva pelos testes bioquímicos e pelo sistema MALDI TOF MS.

As características físico-químicas e o rendimento dos queijos frescos sem sal produzidos com leites contaminados com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122 não foram diferentes entre si, nem diferentes dos queijos produzidos com leite não inoculado (controle). Porém, o maior tempo de armazenamento (72 horas) contribuiu para a redução do rendimento e aumento dos teores de umidade dos queijos produzidos.

Entretanto, as características físico-químicas dos iogurtes naturais produzidos com leites contaminados com os isolados PA17125, PA26115A e MB9122 foram diferentes das obtidas dos iogurtes produzidos com leites não contaminados. Os teores de gordura e proteína foram maiores nos iogurtes produzidos com leite não contaminados. A acidez titulável foi maior em iogurtes produzidos com leites armazenados por 72 horas, quando avaliado no dia seguinte à sua produção.

7 REFERÊNCIAS

- Addis, M. F.; Tanca, A.; Uzzau, S.; Oikonomou, G.; Bicalho, R. C. e Moroni, P. (2016). The bovine milk microbiota: insights and perspectives from-omics studies. *Molecular BioSystems*, 12(8), p. 2359-2372.
- Alfenas, R. D. C. G. (2009). Efeito da temperatura no crescimento e na atividade metabólica de psicrotrófico acidificante isolado de leite. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 11(1), p. 7-21.
- Almuzara, M.; Barberis, C.; Traglia, G.; Famiglietti, A.; Ramirez, M.S. e Vay, C. (2015). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry for species identification of nonfermenting gram-negative bacilli. *Journal of microbiological methods*, 112, p. 24-27.
- Ângelo, F.; Ribeiro, C.; Oliveira, L.; Araujo, T. e Cardarelli, H. (2015). Bactérias psicrotróficas em leite cru refrigerado. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 22(1), p. 1-14.
- Arcuri, E.; Lima da Silva, P. D.; Vasconcelos, M. A.; Brito, J.; Lange, C. C. e Magalhães, M. M. D. (2008). Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, 38(8), p. 2250-2255.
- Baur, C.; Krewinkel, M.; Kranz, B.; von Neubeck, M.; Wenning, M.; Scherer, S. e Fischer, L. (2015). Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 49, p. 23-29.
- Bekker, A.; Jooste, P.; Steyn, L.; Bothma, C.; Hugo, A. e Hugo, C. (2016). Lipid breakdown and sensory analysis of milk inoculated with *Chryseobacterium joostei* or *Pseudomonas fluorescens*. *International Dairy Journal*, 52, p. 101-106.
- Beloti, V., Júnior, J. C. R., Tamanini, R., de Araújo, J. P. A., Yamada, A. K., & da Silva Antônio, N. (2015). Enumeração de microrganismos psicrotróficos e termofílicos psicrotróficos de leite: comparação de metodologias. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 70(1), p. 17-23.
- Borges, K.; Reichert, S.; Zanela, M. e Fischer, V. (2009). Avaliação da qualidade do leite de propriedades da região do Vale do Taquari no estado do Rio Grande do Sul. *Acta Scientiae Veterinariae*, 37(1), p. 39-44.
- Brasil, L. H. A.; Bonassi, I. A.; Baccari Júnior, F. e Wechesler, F. S. (1999). Efeito da temperatura ambiental na densidade e ponto de congelamento do leite de cabra. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19(3), p. 333-337.
- BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº. 101 de 11 de agosto de 1993. Métodos analíticos oficiais para análise de produtos de origem animal e seus ingredientes II: métodos físicos e químicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1997.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Estabelece Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos - Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 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, Brasília, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal- RIISPOA. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC ° 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2001.
- Cantoni, C. e Ibbá, S. Alterazione della carne, bioprotezione e raffreddamento. *filiera zootecnica, valore alimentare*, 80, p. 80-146.
- CARDOSO, R. (2006). Influência da microbiota psicotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração. 57 p.(Doctoral dissertation, Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa–MG).
- Carvalho, J. D. G.; Viotto, W. H. e Kuaye, A. Y. (2007). The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control*, 18(3), p. 262-267.
- Cizeikiene, D.; Juodeikiene, G.; Paskevicius, A. e Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31(2), p. 539-545.
- Chai, M.; Ye, Y. e Chen, V. (2017). Separation and concentration of milk proteins with a submerged membrane vibrational system. *Journal of Membrane Science*, 524, p. 305-314.
- Chen, L. D. R. M.; Daniel, R. M. e Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International dairy journal*, 13(4), p. 255-275.
- Cregenzán-Alberti, O.; Halpin, R. M.; Whyte, P.; Lyng, J. e Noci, F. (2014). Suitability of ccRSM as a tool to predict inactivation and its kinetics for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas fluorescens* in homogenized milk treated by manothermosonication (MTS). *Food control*, 39, p.41-48.

- Cregenzán-Alberti, O.; Halpin, R. M.; Whyte, P.; Lyng, J. G. e Noci, F. (2015). Study of the suitability of the central composite design to predict the inactivation kinetics by pulsed electric fields (PEF) in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas fluorescens* in milk. *Food and Bioprocess Technology*, 95, p. 313-322.
- De Almeida, K. M.; Bruzarosk, S. R.; Zanol, D.; de Mello, M.; dos Santos, J. S.; Alegro, L. C. A. e de Santana, E. H. W. (2014). Avaliação da população de *Pseudomonas* sp. e *P. fluorescens* em leite cru refrigerado. *Blucher Food Science Proceedings*, 1(1), p. 259-260.
- De Baere, T.; Wauters, G.; Kämpfer, P.; Labit, C.; Claeys, G.; Verschraegen, G. e Vaneechoutte, M. (2002). Isolation of *Buttiauxella gaviniae* from a spinal cord patient with urinary bladder pathology. *Journal of clinical microbiology*, 40(10), p. 3867-3870.
- De Jonghe, V.; Coorevits, A.; Van Hoorde, K.; Messens, W.; Van Landschoot, A.; De Vos, P. e Heyndrickx, M. (2011). Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Applied and environmental microbiology*, 77(2), p. 460-470.
- De Oliveira Pinto, C. L.; Machado, S. G.; Martins, M. L. e Vanetti, M. C. D. (2015). Identificação de bactérias psicrotólicas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 70(2), p. 105-116.
- De Souza, C. P.; de Freitas Pereira, L. E. H. e Pereira, K. S. (2014). Microbiological quality and safety of Minas Frescal cheese commercialized under federal inspection in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil. *Blucher Food Science Proceedings*, 1(1), p. 401-402.
- Dias, B. F.; Ferreira, S. M.; Carvalho, V. S. e Soares, D. S. B. (2016). Qualidade microbiológica e físico-química de queijo Minas Frescal artesanal e industrial. *Revista de Agricultura Neotropical*, 3(3), p. 57-64.
- Dos Santos, P. A.; da Silva, M. A. P.; Moreira, G. D. N.; Barros, J. C.; de Oliveira, A. N. e Nicolau, E. S. (2010). Evolução da proteólise do leite inoculado in vitro com *Pseudomonas fluorescens*. *Boletim do centro de pesquisa de processamento de alimentos*, 28(2), p. 314-320.
- Dworkin, M. (2006). *The prokaryotes: vol. 6: Proteobacteria, Gamma subclass*. Springer Science & Business Media.
- Egli, A.; Tschudin-Sutter, S.; Oberle, M.; Goldenberger, D.; Frei, R. e Widmer, A. F. (2015). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Typing of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *E. coli*: A Novel Tool for Real-Time Outbreak Investigation. *PLoS one*, 10(4), p. 1-6.
- Ercolini, D. (2013). High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and environmental microbiology*, 79(10), p. 3148-3155.
- Fonseca, C. R.; de Gouvêa Portes, R.; Fregonesi, R. P.; Queiroz, S. R. A.; Godoy, S. H. S.; Munin, F. S. e Fernandes, A. M. (2014). Ocorrência de *Escherichia Coli* potencialmente causadoras de toxi-Infecções alimentares em linhas de processamento de queijo Minas Frescal. *Blucher Food Science Proceedings*, 1(1), p. 175-176.
- Fontanelli, R. S. (2001). *Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras*.
- Fox, P. F.; Guinee, T. P.; Cogan, T. M. e McSweeney, P. L. (2000). *Fundamentals of*

cheese science.

- Fricker, M.; Skånseng, B.; Rudi, K.; Stessl, B. e Ehling-Schulz, M. (2011). Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *International journal of food microbiology*, 145, p. S24-S30.
- Gerez, C. L.; Torres, M. J.; de Valdez, G. F. e Rollán, G. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, 64(3), p. 231-237.
- Glück, C.; Rentschler, E.; Krewinkel, M.; Merz, M.; von Neubeck, M.; Wenning, M. Fischer, L. (2016). Thermostability of peptidases secreted by microorganisms associated with raw milk. *International Dairy Journal*, 56, p. 186-197.
- Hantsis-Zacharov, E. e Halpern, M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and environmental microbiology*, 73(22), p. 7162-7168.
- Haraguchi, F. K.; Abreu, W. C. e de Paula, H. D. (2006). Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev Nutr*, 19(4), p. 479-488.
- Josten, M.; Dischinger, J.; Szekat, C.; Reif, M.; Al-Sabti, N.; Sahl, H. G. e Bierbaum, G. (2014). Identification of agr-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), p. 1018-1023.
- Junior, J. C. R.; Beloti, V.; Massi, F. P. e Fungaro, M. H. P. (2017). Thermoduric psychrotrophic proteolytic microbiota from refrigerated raw milk. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(1), p. 267-272.
- Kuehn, J. S.; Gorden, P. J.; Munro, D.; Rong, R.; Dong, Q.; Plummer, P. J. e Phillips, G. J. (2013). Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. *PloS one*, 8(4), p. 1-10.
- Lafarge, V.; Ogier, J. C.; Girard, V.; Maladen, V.; Leveau, J. Y.; Gruss, A. e Delacroix-Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), p. 5644-5650.
- Lee, W. J. e Lucey, J. A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(9), p. 1127-1136.
- Liu, Y. J.; Xie, J.; Zhao, L. J.; Qian, Y. F.; Zhao, Y. e Liu, X. (2015). Biofilm formation characteristics of *Pseudomonas lundensis* isolated from meat. *Journal of food science*, 80(12).
- Loguercio, A.P. e Aleixo, J. A. G. (2001). Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, 31(6), p. 1063-1067.
- Machado, S. G.; Baglinière, F.; Marchand, S.; Van Coillie, E.; Vanetti, M. C.; De Block, J. e Heyndrickx, M. (2017). The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, 8, p. 1-22.
- Magenis, R. B.; Prudêncio, E. S.; Fritzen-Freire, C. B.; Stephan, M. P.; do Egito, A. S. e Daguer, H. (2014). Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. *Food Control*, 45, 22-28.
- Marchand, S.; Duquenne, B.; Heyndrickx, M.; Coudijzer, K. e De Block, J. (2017). Destabilization and off-flavors generated by *Pseudomonas* proteases during or after UHT-processing of milk. *International Journal of Food Contamination*, 4(1), p. 1-7.
- Marchand, S.; Vandriesche, G.; Coorevits, A.; Coudijzer, K.; De Jonghe, V.;

- Dewettinck, K. e De Block, J. (2009). Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species. *International journal of food microbiology*, 133(1), p. 68-77.
- Martins, M. L.; Pinto, U. M.; Riedel, K. e Vanetti, M. C. (2015). Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), p. 207-217.
- Montel, M. C.; Buchin, S.; Mallet, A.; Delbes-Paus, C.; Vuitton, D. A.; Desmasure, N. e Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *International journal of food microbiology*, 177.
- Moore, E. R.; Tindall, B. J.; dos Santos, V. A. M.; Pieper, D. H.; Ramos, J. L., e Palleroni, N. J. (2006). Nonmedical: *Pseudomonas*. In *The prokaryotes*. Springer New York.
- Moraes, C.; Meneghello Fuentefria, A.; Bergman Zaffari, C.; Conte, M.; Abatti Vianna Rocha, J. P.; Spanemberg, A. e da Costa, M. (2005). Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33(3), p. 259-264.
- Morales, P. A.; Aguirre, J. S.; Troncoso, M. R. e Figueroa, G. O. (2016). Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas* spp. present in spoiled poultry fillets sold in retail settings. *LWT-Food Science and Technology*, 73, p. 609-614.
- Moreira, N. V. e Montanhini, M. T. M. (2014). Contaminação do leite na ordenha por micro-organismos proteolíticos e lipolíticos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 8(2), p. 29-38.
- Moyer, C. L., e Morita, R. Y. (2007). Psychrophiles and psychrotrophs. eLS.
- Nascimento, M. R.; de Barros, J. C.; Alexandre, N. A.; Bertipaglia, L. M. A.; Melo, G. M. P.; Dias, F. G. G. e de Freitas Pereira, L. (2016). Caracterização físico-química do leite em propriedades do Município de Santa Rita do Passa Quatro-SP. *Investigação*, 15(1), p. 49-54.
- Nero, L. A.; Mattos, M. R. D.; Beloti, V.; Barros, M. D. A.; Pinto, J. P. D. A. N.; Andrade, N. J. D. e Franco, B. D. (2005). Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Food Science and Technology (Campinas)*, 25 (1), p.191-195.
- Nörnberg, M. D. F. B. L.; Tondo, E. C. e Brandelli, A. (2009). Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. *Acta Scientiae Veterinariae*, 37(2), p. 157-163.
- Oliveira, G. B. D.; Favarin, L.; Luchese, R. H. e McIntosh, D. (2015). Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), p. 313-321.
- Oikonomou, G.; Bicalho, M. L.; Meira, E.; Rossi, R. E.; Foditsch, C.; Machado, V. S. e Bicalho, R. C. (2014). Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *PloS one*, 9(1), p. 1-11.
- Ordoñez, J. A.; Cambero, M. A.; Fernandez, L.; Garcia, M. L.; Garcia, G. e Hoz, L. (2005). Componentes dos Alimentos e Processos-Tecnologia de Alimento. Porto Alegre: Editora Artmed.
- Pereira, F. D. A. B. (2016). Capacidade lipolítica de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* isoladas do leite cru refrigerado.
- Pinho, C. R. G.; Júnior, B. R. D. C. L.; de Oliveira, M. M.; Tribst, A. A. L. e Cristianini, M. (2014). Atividade proteolítica de protease produzida por *Pseudomonas fluorescens* IB 2312 em leite desnatado submetido ao processo de

- homogeneização à alta pressão. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 69(4), p. 289-296.
- Pinto, C.; Martins, M. L. e Vanetti, M. C. D. (2006). Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrófilas proteolíticas. Ciência e Tecnologia Alimentos, 26(3), 645-651.
- Pukančíková, L.; Lipničanová, S.; Kačániová, M.; Chmelová, D. e Ondrejovič, M. (2016). Natural Microflora of Raw Cow Milk and their Enzymatic Spoilage Potential. Nova Biotechnologica et Chimica, 15(2), p. 142-155.
- Quigley, L.; McCarthy, R.; O'Sullivan, O.; Beresford, T. P.; Fitzgerald, G. F.; Ross, R. P. e Cotter, P. D. (2013). The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. Journal of dairy science, 96(8), p. 4928-4937.
- Reche, N. L. M.; Neto, A. T.; Dovideo, L.; Felipus, N. C.; Pereira, L. C.; Cardozo, L. L. e Picinin, L. C. A. (2015). Microbial multiplication in raw milk stored in direct expansion bulk tanks. Ciência Rural, 45(5), p. 828-834.
- Santana, E. D.; Beloti, V.; Barros, M. D. A. F.; Moraes, L. B.; Gusmão, V. V. e Pereira, M. S. (2001). Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrófilos. Semina: Ciências Agrárias, 22(2), p. 145-154.
- Santos, J.; Pires, C. V.; Costa Sobrinho, P. S. e Santos, A. (2013). Crescimento de microrganismos em leite cru refrigerado. Alimentos e Nutrição Araraquara, 24(3), p. 297-300.
- Seel, W.; Derichs, J. e Lipski, A. (2016). Increased biomass production by mesophilic food-associated bacteria through lowering the growth temperature from 30° C to 10° C. Applied and environmental microbiology, 82(13), p. 3754-3764.
- Silanikove, N.; Merin, U. e Leitner, G. (2006). Physiological role of indigenous milk enzymes: an overview of an evolving picture. International Dairy Journal, 16(6), p. 533-545.
- Silva, N. D.; Junqueira, V. C. e Silveira, N. F. (2001). Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. In Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. Varela.
- Silva, L. C.; Beloti, V.; Tamanini, R.; d'Ovidio, L.; Rodrigues de Mattos, M.; Camelo Travassos de Arruda, A. M. e Freitas Pires, E. M. (2011). Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. Semina: Ciências Agrárias, 32(1), p. 267-274.
- Silveira, M. L. R. e Bertagnolli, S. M. M. (2014). Avaliação da qualidade do leite cru comercializado informalmente em feiras livres no município de Santa Maria-RS. Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia, 2(2), p. 75-80.
- Sørhaug, T. e Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. Trends in Food Science & Technology, 8(2), p. 35-41.
- Stoeckel, M.; Lidolt, M.; Achberger, V.; Glück, C.; Krewinkel, M.; Stressler, T. e Hinrichs, J. (2016). Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. International Dairy Journal 59, p. 20-28.
- Stoeckel, M.; Lidolt, M.; Stressler, T.; Fischer, L.; Wenning, M. e Hinrichs, J. (2016). Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: A

- challenge in the production of ultra-high temperature milk products. *International Dairy Journal*, 61, p. 250-261.
- Taffarel, L. E.; Costa, P. B.; Tsutsumi, C. Y.; Klosowski, E. S.; Portugal, E. F. e Lins, A. C. (2015). Variação da composição e qualidade do leite em função do volume de produção, período do ano e sistemas de ordenha e de resfriamento. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(1), p. 2287-2299.
- Tagg, K. A.; Ginn, A. N.; Partridge, S. R. e Iredell, J. R. (2015). MALDI-TOF Mass Spectrometry for Multilocus Sequence Typing of *Escherichia coli* Reveals Diversity among Isolates Carrying bla CMY-2-Like Genes. *PLoS one*, 10(11), p. 1-8.
- Tamang, J. P.; Watanabe, K., e Holzapfel, W. H. (2016). Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in microbiology*, 7, p. 1-28.
- Teh, K. H.; Flint, S.; Palmer, J.; Andrewes, P.; Bremer, P. e Lindsay, D. (2014). Biofilm—An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products. *International dairy journal*, 34(1), p. 32-40.
- Teixeira, J. S.; Maier, M. B.; Miller, P.; Gänzle, M. G. e McMullen, L. M. (2016). The effect of growth temperature, process temperature, and sodium chloride on the high-pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* on ham. *European Food Research and Technology*, 242(12), p. 2021-2029.
- Vargas, D. P.; Nörnberg, J. L.; de Oliveira Mello, R.; Sheibler, R. B.; Milani, M. P. e Mello, F. C. B. (2014). Correlações entre contagem bacteriana total e parâmetros de qualidade do leite. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 20(4), p. 1-7.
- Vithanage, N. R.; Dissanayake, M.; Bolge, G.; Palombo, E. A.; Yeager, T. R. e Datta, N. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal*, 57, p. 80-90.
- von Neubeck, M.; Baur, C.; Krewinkel, M.; Stoeckel, M.; Kranz, B.; Stressler, T. e Wenning, M. (2015). Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International journal of food microbiology*, 211, p. 57-65.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M. e Geurts, T.J., (2006). *Dairy science and technology*. 2 ed. Taylor & Francis.
- Walter, L.; Knight, G.; Ng, S. Y. e Buckow, R. (2016). Kinetic models for pulsed electric field and thermal inactivation of *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* in whole milk. *International Dairy Journal*, 57, p. 7-14.
- Wolters, M.; Rohde, H.; Maier, T.; Belmar-Campos, C.; Franke, G.; Scherpe, S. e Christner, M. (2011). MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(1), p. 64-68.
- Yoon, Y.; Lee, S. e Choi, K. H. 2016. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control*, 63, p. 201-215.
- Zhong, Z.; Hou, Q.; Kwok, L.; Yu, Z.; Zheng, Y.; Sun, Z. e Zhang, H. (2016). Bacterial microbiota compositions of naturally fermented milk are shaped by both geographic origin and sample type. *Journal of dairy science*, 99(10), p. 7832-7841.