

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA, ADERÊNCIA E PRODUÇÃO DE BIOFILMES
POR MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS EM LEITE BOVINO**

MARIA DE FÁTIMA BARROS LEAL NÖRNBERG

**PORTO ALEGRE-RS
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA, ADERÊNCIA E PRODUÇÃO DE BIOFILMES
POR MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS EM LEITE BOVINO**

Autor: MARIA DE FÁTIMA B. LEAL NÖRNBERG

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor em Ciências Veterinárias

Sub-área: Microbiologia

Especialidade: Bacteriologia

Orientador: Prof.. Dr. Adriano Brandelli
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos –
ICTA/UFRGS

**PORTO ALEGRE-RS
2009**

Maria de Fátima Barros Leal Nornberg

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA, ADERÊNCIA E PRODUÇÃO DE BIOFILMES
POR MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS EM LEITE BOVINO**

Aprovada em: 29 de abril de 2009.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Adriano Brandelli (UFRGS)
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Eduardo César Tondo (UFRGS)
Membro da Comissão

Prof. Dr. José Maria Wiest (UFRGS)
Membro da Comissão

Prof^ª. Dr^ª. Maristela Lovato Flores (UFSC)
Membro da Comissão

Dedico aos meus filhos
Letícia, Crístian, Natálie, Marcele e Rafele
com muito amor e carinho.

Agradecimentos

A JESUS pelo privilégio de tê-lo como meu amigo íntimo, por todas as graças que sempre me concedeu, por me capacitar, por saber que está sempre atento às minhas orações, que é poderoso para fazer muito mais do que tudo que pedimos ou que pensamos, enfim, ao meu único Deus e Senhor.

Em especial ao professor Adriano Brandelli pelo aceite como meu orientador, pela confiança depositada, por sua paciência, compreensão, admiro-o pela sua competência, entusiasmo e dinamismo, um exemplo a ser seguido como pessoa e pesquisador.

Ao professor Eduardo César Tondo que com sua sabedoria sempre esteve pronto para colaborar com meu trabalho.

A UFSM que me deu todo o suporte e apoio para minha capacitação.

A CAPES-PICDT pelo auxílio financeiro.

À colega Silvana, a Marilene e ao Jhonnattas pelo auxílio nas análises laboratoriais e pela amizade. Assim como a todos os colegas do laboratório de microbiologia e funcionários do ICTA pelo carinho recebido.

Ao curso de pós graduação em ciências veterinárias por oportunizar este acréscimo em minha formação.

A Rita e Denise do laboratório de Microbiologia UFSM pelo auxílio prestado.

Aos meus pais Maria e Achyles in memoriam, mas que jamais esquecerei tudo que fizeram, nunca mediram esforços para que eu concretizasse meus sonhos e ideais.

Ao meu esposo, meu grande e eterno amor José Laerte, que sempre me apoiou, incentivou e que com toda certeza, sem sua presença e participação, não teria chegado até aqui.

Aos meus filhos que souberam entender minhas ausências, com seu amor incondicional, com seus sorrisos me esperando, são a razão do meu esforço.

Enfim, a todos que de uma forma ou outra, foram muito importantes nesta conquista.

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA, ADERÊNCIA E PRODUÇÃO DE BIOFILMES POR MICRORGANISMOS PSICROTRÓFICOS EM LEITE BOVINO

Autor: Maria de Fátima Barros Leal Nörnberg
Orientador: Prof. Adriano Brandelli

RESUMO

Bactérias psicotróficas foram isoladas de leite cru refrigerado oriundo de duas indústrias de beneficiamento localizadas no sul do Brasil. Contagens de bactérias psicotróficas foram entre 4,9 e 7,8 logUFC/mL e de 5,3 a 7,2 logUFC/mL, em amostras coletadas no caminhão-tanque e no silo de armazenamento da indústria, respectivamente. Dentre as bactérias isoladas, 90% foram Gram-negativas. A maioria das cepas apresentaram baixa atividade proteolítica, mas cepas de *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella oxytoca* e *Aeromonas* sp. apresentaram valores superiores a 20 U/mL em azocaseína como substrato. Proteases das cepas selecionadas foram resistentes aos tratamentos térmicos convencionais e causaram coagulação de leite UAT depois de cinco dias de estocagem em temperatura ambiente. A atividade proteolítica de uma variedade psicotrófica de *Burkholderia cepacia* isolada de leite cru refrigerado foi caracterizada. A atividade proteolítica na azocaseína apresentou atividade máxima com pH 6-7 e decréscimo com pHs ácido e alcalino. A enzima apresentou relativa estabilidade térmica entre 40-55°C durante 25 min, mantendo pelo menos 80% de sua atividade inicial a 40°C. O ensaio de coagulação do leite demonstrou que a protease da *B. cepacia* causou coagulação do leite desnatado a partir do segundo dia, enquanto a coagulação do leite integral foi observada a partir do quinto dia. A aderência desta cepa ao aço inoxidável foi avaliada e os substratos apresentaram níveis de cerca de 10⁷ UFC/cm², independente dos diferentes tempos de imersão. A cepa denominada de 1A4 apresentou expressiva atividade proteolítica em pH 6-7 e 40°C, atividade de coagulação do leite e capacidade de aderir ao aço inoxidável. Estes resultados indicam que *B. cepacia* representa um potencial perigo a qualidade do leite e produtos lácteos.

Palavras-chave: aderência, atividade proteolítica, bactérias, biofilmes, *B. cepacia*

PROTEOLYTIC ACTIVITY, ADHERENCE AND BIOFILM PRODUCTION BY PSYCHROTROPHIC MICROORGANISMS IN CATTLE MILK

*Author: Maria de Fátima Barros Leal Nörnberg
Advisor: Prof. Adriano Brandelli*

ABSTRACT

*Psychrotrophic bacteria were isolated from refrigerated raw milk of two processing plants at Southern Brazil. Psychrotrophic counts were between 4.9 and 7.8 log CFU/mL, and 5.3 to 7.2 log CFU/mL, for samples collected at the truck and the milk storage silo, respectively. Among the bacterial isolates, 90% were Gram-negative. Most strains presented low proteolytic activity, but strains of *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella oxytoca* and *Aeromonas* sp. showed higher than 20 U/mL on azocasein as substrate. Crude proteases from selected strains were resistant to conventional heat treatments and caused coagulation of UHT milk after 5 days storage at room temperature. The proteolytic activity of a psychrotrophic strain of *Burkholderia cepacia* isolated from refrigerated raw milk was characterized. The proteolytic activity on azocasein showed maximum activity at pH 6-7 and decrease at acid and alkaline pHs. The enzyme showed relative thermal stability in the range 40-55°C during 25 min, maintaining at least 80% its initial activity at 40°C. Milk coagulation assay showed that the crude protease from *B. cepacia* caused coagulation from day 2 for skimmed milk, whereas coagulation was observed from day 5 for whole milk. The adherence of this strain to stainless steel was evaluated, and the substrata had around 10⁷ CFU/cm², regardless the different immersion time evaluated. The strain IA4 showed elevated proteolytic activity at pH 6-7 and 40°C, high milk coagulating-activity, and elevated capability to adhere to stainless steel. These results indicate that *B. cepacia* may represent a potential hazardous to milk and dairy products.*

Key words: adherence, bacteria, biofilms, Burkholderia cepacia, proteolytic activity

LISTA DE FIGURAS

Página

3.1 Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado

Figura 1 Correlação entre atividade proteolítica e contagens totais de psicrotróficos em amostras de leite cru refrigerado originado do laticínio L1 (A) e L2 (B)..... 43

3.2 Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk

Figure 1 Counts of psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated bovine milk from march (month no. 1) to december 2006 56

3.3 Proteolytic activity of a psychrotrophic *Burkholderia cepacia* strain isolated from refrigerated raw milk

Figure 1 Effect of pH on proteolytic activity of *Burkholderia cepacia* 1A4..... 72

Figure 2 Effect of temperature on proteolytic activity of *Burkholderia cepacia* 1A4 (A). Thermal stability of *B. cepacia* protease at 40°C (circles), 45°C (squares) and 50°C (triangles) (B)..... 73

Figure 3 Concentration of amino acids of whole (circles) and skimmed milk (squares) incubated with 4 U/mL protease (black symbols) or heat-inactivated protease (white symbols)..... 74

Figure 4 Crystal violet staining of biofilms formed by *B. cepacia* 1A4. Values were determined after 24 (black bars), 48 (gray bars), 72 (dashed bars) and 96 h (white bars) incubation at the indicated temperatures..... 75

LISTA DE TABELAS

	Página
3.1 Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado	
Tabela 1 Valores médios de contagens de bactérias psicotróficas e atividade proteolítica em leite cru refrigerado obtido de dois laticínios do Estado do Rio Grande do Sul.....	40
Tabela 2 Análise da correlação entre atividade proteolítica e contagens de psicotróficos em leite cru refrigerado obtido de dois laticínios do Estado do Rio Grande do Sul.....	41
Tabela 3 Contagens de microrganismos psicotróficos em amostras de leite bovino obtidas em diferentes regiões do Brasil.....	42
3.2 Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk	
Table 1 Psychrotrophic microorganisms isolated of raw milk in Southern Brazil.....	57
Table 2 Isolated bacteria that presented higher proteolytic activities.....	58
Table 3 Heat resistance of proteolytic enzymes of selected psychrotrophic bacteria isolated from raw milk.....	59
3.3 Proteolytic activity of a psychrotrophic <i>Burkholderia cepacia</i> strain isolated from refrigerated raw milk	
Table 1 Coagulation of skimmed and whole UHT milk samples by <i>Burkholderia cepacia</i> protease	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	TEMPERATURA DE TRANSPORTE E GRANELIZAÇÃO DO LEITE.....	14
2.2	MICROORGANISMOS NO LEITE.....	15
2.3	MICROORGANISMOS PSICOTRÓFICOS NO LEITE.....	18
2.4	ORIGEM DOS MICROORGANISMOS PSICOTRÓFICOS NO LEITE...	21
2.5	MICROORGANISMOS PSICOTRÓFICOS: CONSEQÜÊNCIAS NA QUALIDADE DO LEITE.....	22
2.6	ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES	24
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1	<i>ARTIGO 1</i>	
3.1	<i>Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado...</i>	29
3.1.1	<i>Resumo.....</i>	29
3.1.2	<i>Abstract.....</i>	30
3.1.3	<i>Introdução.....</i>	31
3.1.4	<i>Material e métodos.....</i>	32
3.1.5	<i>Resultados.....</i>	33
3.1.6	<i>Discussão.....</i>	34
3.1.7	<i>Conclusão.....</i>	36
3.1.8	<i>Referências.....</i>	36
3.2	<i>ARTIGO 2</i>	
3.2	<i>Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk.....</i>	44
3.2.1	<i>Abstract</i>	44
3.2.2	<i>Introduction</i>	45
3.2.3	<i>Materials and methods</i>	46
3.2.3.1	<i>Samples.....</i>	46
3.2.3.2	<i>Isolation of psychrotrophic bacteria</i>	46

3.2.3.3 Identification of bacteria	46
3.2.3.4 Production of proteolytic enzymes	46
3.2.3.5 Enzyme activity	47
3.2.3.6 Effect of thermal treatments on proteolytic activity	47
3.2.3.7 Milk coagulation assay	47
3.2.4 <i>Results and discussion</i>	48
3.2.4.1 Psychrotrophic bacterial counts	48
3.2.4.2 Identification of prevailing bacteria	49
3.2.4.3 Proteolytic activity	50
3.2.4.4 Milk coagulation	51
3.2.5 <i>Conclusion</i>	52
3.2.6 <i>Acknowledgments</i>	52
3.2.7 <i>References</i>	52
3.3 <i>ARTIGO 3</i>	
3.3 Proteolytic activity of a psychrotrophic <i>Burkholderia cepacia</i> strain isolated from refrigerated raw milk.....	60
3.3.1 <i>Abstract</i>	60
3.3.2 <i>Introduction</i>	61
3.3.3 <i>Materials and methods</i>	62
3.3.3.1 Microorganism	62
3.3.3.2 Production of protease	62
3.3.3.3 Proteolytic activity	62
3.3.3.4 Characterization of proteolytic activity	63
3.3.3.5 Milk coagulation	63
3.3.3.6 Adherence to stainless steel	63
3.3.3.7 Biofilm growth assay	64
3.3.4 <i>Results and discussion</i>	64
3.3.4.1 Proteolytic activity of <i>B. cepacia</i>	64
3.3.4.2 Milk coagulation	65
3.3.4.3 Adherence capacity and biofilm formation	66
3.3.5 <i>Conclusion</i>	67
3.3.6 <i>References</i>	68

4	DISCUSSÃO GERAL	76
5	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

A indústria de laticínios passa por grandes transformações, como o pagamento ao produtor em função da qualidade, aliado à preocupação constante dos consumidores com relação à segurança dos alimentos, obrigando ao produtor ser profissional, isto é, ter produto rentável melhorando seus índices de produtividade com muita ênfase ao aspecto qualidade.

Particularmente no que diz respeito à qualidade do leite, certamente a questão relativa ao pagamento diferenciado da matéria-prima em função de suas características físicas, químicas, bromatológicas e organolépticas tende a se ampliar e, dessa forma, o pagamento baseado na qualidade vai ser um elemento de diferenciação dos sistemas de produção e que, certamente, vai ditar a permanência ou não dos produtores na atividade. A qualidade do leite cru está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial que ocorre logo após a ordenha, com tempo e temperatura de estocagem. A determinação das características principalmente microbiológicas do leite no momento do seu recebimento na indústria e os efeitos da estocagem são relevantes no processo de seleção do destino dessa matéria-prima, assim como, das medidas profiláticas e preventivas a serem tomadas para a melhoria da qualidade. Entre essas relacionadas com a qualidade do leite, destaca-se a microbiológica, que pode ser um bom indicativo da saúde da glândula mamária, do rebanho, das condições gerais de manejo e higiene adotados na fazenda. Primeiramente, pode-se apontar que os principais microrganismos envolvidos com a contaminação do leite são as bactérias, e que vírus, fungos e leveduras têm uma participação reduzida, apesar de serem potencialmente importantes em algumas situações.

A segurança e a qualidade do leite são fatores essenciais para a saúde pública, devendo ser um binômio de referência para todas as indústrias de laticínios. Associado às questões de saúde pública, tem-se perdas de alimentos e matérias-primas em decorrência de processos de deterioração de origem microbiológica, processamento industrial ineficaz, entre outros, com prejuízos financeiros consideráveis para as indústrias, distribuidores e consumidores. Assim, deve-se buscar o caminho mais efetivo para garantir a segurança dos alimentos.

O leite, alimento altamente nutritivo, também é um excelente meio de cultura, podendo ser facilmente contaminado por vários grupos de microrganismos que nele encontram condições ótimas de multiplicação. É ideal para o crescimento, não só de microrganismos patogênicos, como também deteriorantes. *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Brucella* spp, *Campylobacter* spp, e *Staphylococcus aureus* são alguns exemplos de microrganismos patogênicos associados a surtos de toxinfecções alimentares e inúmeras perdas onde o leite e produtos lácteos foram envolvidos.

A atual demanda da indústria de produtos lácteos com prolongada vida de prateleira, tem resultado em novos desafios para a manutenção da qualidade do leite e seus derivados. O tempo prolongado de armazenamento em temperaturas de refrigeração favorece o crescimento e o predomínio de bactérias psicrotróficas, as quais apresentam capacidade de produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas termoresistentes, sendo esta uma importante característica dos psicrotróficos, é a sua capacidade de síntese de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. É interessante enfatizar que entre as bactérias psicrotróficas o gênero *Pseudomonas* é predominante em leite refrigerado. Algumas espécies desse gênero apresentam grande potencial deteriorativo, sendo muito importante sua correta identificação.

Por tratar-se de um produto perecível, o leite merece atenção especial na sua produção, beneficiamento, comercialização e consumo, pois estará sempre sujeito a uma série de alterações.

Este trabalho visou detectar a presença dos principais microrganismos proteolíticos psicrotróficos, em leite cru refrigerado obtido de laticínios do Rio Grande do Sul, identificar e caracterizar suas capacidades proteolíticas, suas atividades enzimáticas, e da *Burkholderia cepacia* além desses, sua aderência e formação de biofilme.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Temperatura de transporte e granelização do leite

A qualidade do leite no Brasil tem melhorado substancialmente a partir de 2001. As condições favoráveis relacionadas às oportunidades de exportação permitiram a implementação do Programa de Melhoria da Qualidade do Leite (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002). Esta Instrução estabelece critérios para a produção, identidade e qualidade do leite, o que produziu a implementação de melhorias como a coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel (MARTINS, 2004).

Essas duas medidas de impacto direto sobre a estrutura de produção leiteira (resfriamento do leite na fazenda e a sua coleta a granel) alteraram as condições na grande maioria das regiões, resultando no desaparecimento da coleta em latão e do recebimento de leite não resfriado. Não há dúvida de que esta foi à medida que, isoladamente, trouxe maior e mais rápido impacto sobre a melhoria da qualidade do leite (SANTOS e FONSECA, 2003).

A racionalização da coleta e do transporte do leite até a indústria é uma tendência mundial, beneficiando toda a cadeia do leite. A refrigeração do leite, imediatamente após a ordenha, visa diminuir a multiplicação de bactérias mesófilas que causam a acidificação. Entretanto, isso levou ao favorecimento da multiplicação da microbiota psicotrófica presente na matéria-prima. Nesse processo de conservação do leite pelo frio, recomenda-se que, na segunda hora após a ordenha, a temperatura deva estar a 4°C, condição esta que favorece a proliferação de microrganismos psicotróficos (FAGUNDES *et al.*, 2006). Cerca de 80% dos 5,25 bilhões de litros de leite que passam pelas cooperativas são resfriados na fazenda e coletados a granel (ALVARES *et al.*, 2003).

Dependendo do produto a que se destina, o leite cru é submetido a vários tipos de tratamentos e processos tecnológicos que promovem uma alteração qualitativa e quantitativa em sua microbiota inicial. A predominância de determinadas espécies dependerá das modificações físicas e químicas empregadas, tais como temperatura, atividade de água, potencial redox e pH (MORENO *et al.*, 2002).

Geralmente, o resultado dessas modificações é uma diminuição da microbiota total e uma seleção de microrganismos específicos, como por exemplo, os psicrotóxicos em produtos refrigerados, bem como os esporulados em produtos tratados termicamente (MORENO *et al.*, 2002).

Apesar dos enormes e inegáveis benefícios oriundos do resfriamento do leite na fazenda e da granelização do transporte, uma série de fatores limitantes merecem ser mencionados e ponderados. Dentre os fatores limitantes, podemos apontar: eletrificação rural, estrutura viária, custo do resfriador, treinamento dos produtores e potencial de marginalização/exclusão de pequenos produtores (SANTOS e FONSECA, 2003).

2.2. Microrganismos no leite

Em 1837, Pasteur foi o primeiro cientista a compreender o papel dos microrganismos nos alimentos, demonstrando que a acidificação do leite era provocado por estes. Em 1860, o mesmo, empregou o calor para destruir microrganismos indesejáveis em alimentos. Este processo denomina-se pasteurização (HOFFMANN *et al.*, 1999). Em 1933, Charles Porcher definiu exatamente o objetivo da pasteurização, que é destruir parte da sua microbiota e praticamente todos patógenos, por emprego apropriado de calor, procurando alterar o menos possível a estrutura física, seu equilíbrio químico e suas vitaminas (ROQUE *et al.*, 2003). Gounot (1986) e Silva (1991) observaram que os microrganismos que normalmente contaminam o leite crescem numa ampla faixa de temperatura, podendo ser divididos em psicrófilos, mesófilos, termófilos. Os psicrófilos constituem o grupo de bactérias que encontram em temperaturas que podem variar de 0° a 20°C sua temperatura ótima de crescimento. Na área de microbiologia de alimentos, os organismos capazes de se desenvolver na faixa de temperatura considerada adequada para os psicrófilos, mesmo que essa temperatura não seja ótima para o seu crescimento, são denominados psicrotóxicos e são assim denominados por crescerem entre temperaturas de 0 a 40°C (COLLINS, 1981; SANTANA, 2001). Os mesófilos constituem o grupo que inclui a maioria dos microrganismos acidificantes do leite, e podem ser caracterizados por se desenvolverem entre temperaturas de 20° a 45°C, com a temperatura ótima de crescimento entre 30° e 40°C (JAY, 2002). As bactérias termófilas são definidas como aquelas cuja temperatura ótima de crescimento situa-se entre 45° a 65°C, e para algumas espécies consideradas como termófilas extremas as temperaturas de crescimento podem atingir 90°C e o

mínimo em torno de 35°C (ICMSF, 1994). O leite cru normalmente contém poucas bactérias termófilas, embora elas possam estar presentes em número suficiente para se desenvolverem no leite mantido a temperaturas elevadas, acarretando grande número desses microrganismos no produto. Essas bactérias constituem problema no leite pasteurizado quando algumas porções são mantidas, por algum tempo, entre 50°C a 70°C (ICMSF, 1994).

Tem-se observado que um grande número de espécies consideradas estritamente mesófilas já estão sendo incluídas também entre os psicotróficos (SILVEIRA *et al.*, 1998). Antunes *et al.* (2002) relataram a presença de microrganismos psicotróficos representando 23% da microbiota do leite *in natura*, os quais em condições de refrigeração multiplicam-se mais rapidamente do que a microbiota mesofílica, tornando-se predominantes. Santana (2001) citou que temperaturas em torno de 4°C controlam o crescimento de microrganismos mesófilos, que em geral provocam acidificação e causam perdas econômicas para produtores e indústrias.

O termo psicotrófico tem confundido os microbiologistas desde o começo do século. Outros termos sinônimos são usados, tais como: psicrófilos facultativos, tolerantes ao frio ou psicotolerantes (GOUNOT, 1986). Segundo Collins (1981), de acordo com as normas da Internacional Dairy Federation, os psicotróficos foram definidos como sendo os microrganismos que podem desenvolver-se a 7°C ou menos, independente da temperatura ótima de crescimento. Esse grupo é extremamente importante em produtos que são conservados ou armazenados em condições de refrigeração por períodos relativamente longos (1 a 4 semanas). O problema torna-se ainda mais sério quando se considera que o uso intensivo da refrigeração, desde a fazenda até a residência do consumidor, pode provocar uma gradativa seleção para esse grupo (SILVEIRA *et al.*, 1998). Quanto maior o tempo de armazenamento do leite resfriado, maiores as chances de multiplicação microbiana, em especial dos microrganismos psicotróficos. Geralmente, esta microbiota se torna predominante no leite resfriado após 2 a 3 dias. Uma importante característica dos psicotróficos comumente encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de síntese de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Ainda que durante a pasteurização do leite, a maioria dos psicotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas produzidas por estes microrganismos, sendo consideradas enzimas termorresistentes (MUIR, 1996; CUNHA e BRANDÃO, 2000; SANTOS e FONSECA, 2003).

No Brasil, o leite (matéria-prima) utilizado para a obtenção do produto tratado por UAT foi o tipo C, que até julho de 2005 não possuía um padrão microbiológico quantitativo, e geralmente era obtido, estocado e transportado em condições precárias, representando um dos principais problemas na garantia da qualidade do produto longa vida (COELHO *et al.*, 2001). Atualmente, com a substituição do leite cru tipo C pelo leite cru refrigerado, que tem um padrão quantitativo apenas para a população de microrganismos mesófilos de, no máximo, $7,5 \times 10^5$ UFC/mL, a preocupação passa a ser o grupo dos psicrotóxicos que encontram condições adequadas para multiplicação durante o período de armazenamento na propriedade rural.

Santos e Fonseca (2002) enfatizam que o processo de modernização no setor leiteiro em algumas regiões do Brasil, com significativas mudanças nos sistemas de armazenamento e transporte do leite, como a adoção do resfriamento do leite na fazenda, logo após a ordenha, e a posterior coleta e transporte do produto em caminhões tanque isotérmicos, tem ocasionado danos à qualidade do produto por atuar de forma seletiva na presença de psicrotóxicos. Além disso, algumas falhas higiênicas durante a produção podem ser mascaradas com essa prática, especialmente aquelas relacionadas à presença e desenvolvimento de microrganismos mesófilos (SOARES, 2004). Antes do tratamento por UAT, o leite cru deve passar por um tratamento térmico prévio, como forma de eliminar as bactérias psicrotóxicas e as enzimas termosensíveis por elas produzidas. O processo mais adotado nesta fase é a pasteurização rápida (HTST – 73° a 75° C/15 segundos) (BASTOS, 1999).

Rezende *et al.* (2000), ao analisarem amostras de quatro diferentes marcas de leite UAT, encontraram elevadas populações de microrganismos mesófilos em 30% das amostras, concluindo ser necessária uma legislação clara e uma fiscalização rigorosa e eficiente quanto às características microbiológicas do produto. Em trabalho semelhante Vidal-Martins *et al.* (2005) encontraram 22,7% das amostras com populações de microrganismos mesófilos superiores ao estabelecido pela legislação brasileira.

A partir de julho de 2005 (BRASIL, 2002) é permitido que o leite cru tipo C apresente no máximo 10^6 UFC de microrganismos mesófilos por mililitro. A realidade encontrada muito difere dessa exigência. Carvalho *et al.* (2004) consideram que uma carga microbiana de mesófilos no leite cru de até $1,0 \times 10^7$ UFC/mL é satisfatória, Coelho *et al.* (2001) afirmam que a qualidade da matéria-prima utilizada para produção do leite UAT e o tipo de processamento do produto devem ser levados em consideração na avaliação dos resultados, podendo-se associar a qualidade do leite UAT, com as

condições higiênico-sanitárias da ordenha, já que são fatores que contribuem decisivamente para o estado microbiológico do leite cru. O leite pasteurizado tipo C possui padrão microbiológico estabelecido e este regulamenta, no máximo, $3,0 \times 10^5$ UFC/mL na contagem padrão em placas de microrganismos mesófilos (BRASIL, 2002).

Tessari e Cardoso (2002) ao analisarem amostras de leite pasteurizado, verificaram que nenhuma encontrava-se em desacordo com os padrões microbiológicos oficiais e Timm *et al.* (2003) verificaram que apenas uma amostra apresentou valor acima do limite para microrganismos mesófilos. Porém, Cordeiro *et al.* (2002) verificaram que 18,6% das amostras apresentaram populações de mesófilos superiores àquela fixada pela legislação, classificando tais amostras como "produto em condição higiênica insatisfatória".

Martins e Albuquerque (1999) analisando 20 amostras de leite pasteurizado verificaram populações de microrganismos mesófilos entre 10^3 e 10^7 UFC/ mL, sendo 5 amostras acima do padrão para o grupo microbiano. Padilha e Fernandes (1999) analisando amostras do mesmo tipo de leite verificaram que 12,4% estavam acima do estabelecido para mesófilos. Convém ressaltar que as populações foram consideradas bastante elevadas, num intervalo de 10^4 a 10^6 UFC/mL.

Segundo Cromie (1992) quando o número de microrganismos psicrotóxicos atinge 10^7 UFC/mL começa a haver alterações no leite. A elevada população de microrganismos psicrotóxicos presentes no leite cru torna-se um fato preocupante, pois muito embora a grande maioria seja destruída pela pasteurização (com exceção das bactérias termoresistentes), tal grupo possui a capacidade de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas termoresistentes, que mantêm sua atividade após a pasteurização ou mesmo após o tratamento por UAT. Alguns problemas relacionados à qualidade dos produtos lácteos como: alteração de sabor e odor do leite, perda de consistência e gelatinização ao longo da vida comercial do leite UAT, podem estar associados à ação de proteases e lipases de origem bacteriana.

2.3. Microrganismos psicrotóxicos no leite

No leite "in natura", não refrigerado, há um predomínio de microrganismos mesófilos, dos quais, os mais importantes são: estreptococos e coliformes, responsáveis pelo processo indesejável de fermentação láctica. Com a adoção de refrigeração no leite, nas propriedades leiteiras, vem ocorrendo o predomínio de microrganismos

psicrotróficos, cuja concentração dependerá das condições de manejo higiênico-sanitário desenvolvidas no local (SANTOS e LARANJA, 2001).

Bactérias psicrotróficas são todas aquelas que conseguem crescer em temperaturas em torno de 7°C, independente de sua temperatura ótima de crescimento, a qual pode ser de 20°C a 30°C. Estes microrganismos podem ser bastonetes, cocos, víbrios, formadores ou não de esporos, Gram-negativos ou positivos, aeróbios ou anaeróbios (SORHAUG e STEPANIAK, 1997). Entre as bactérias Gram-negativas, destacam-se *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Chromobacterium* e *Microbacterium* (SORHAUG e STEPANIAK, 1997; ENEROTH et al., 1998). Este grupo de bactérias tem, portanto, enorme importância nos alimentos mantidos em condições de refrigeração tornando mais sério o problema devido à extensão de cadeia do frio, desde a produção até o consumidor.

A refrigeração do leite, logo após a ordenha, visa diminuir a multiplicação microbiana, entretanto, sua eficiência é maximizada se associada a outros fatores, especialmente de ordem higiênica. Na grande maioria das propriedades leiteiras, a temperatura de refrigeração oscila entre 5°C a 10°C, o que configura um “resfriamento marginal do leite” (SANTOS e LARANJA, 2001), contribuindo para multiplicação de microrganismos psicrotróficos, resultando na queda de qualidade do leite e derivados. Suhren (1989) afirma que, entre os organismos psicrotróficos, o gênero mais frequentemente isolado do leite refrigerado é *Pseudomonas*, sendo as espécies *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putida* e *P. putrefaciens* as que têm papel relevante na diminuição da qualidade do leite fluído e demais derivados lácteos. No leite “in natura” refrigerado a espécie *P. fluorescens*, é predominante sobre as demais espécies (DESMASURES e GUEGUEN, 1997; ENEROTH et al., 2000b).

O gênero *Pseudomonas*, considerado o mais importante dentre os psicrotróficos, pode ser encontrado em aproximadamente 10% da microbiota do leite recém-ordenhado (MUIR, 1996), sendo que sob condições de refrigeração este gênero rapidamente predomina na microbiota tanto do leite cru como do leite pasteurizado (SORHAUG e STEPANIAK, 1997). Este gênero é representado por espécies que apresentam os menores tempos de multiplicação em temperaturas entre 0 e 7°C (4-12 horas) e podem crescer em temperaturas tão baixas quanto 10°C (MUIR, 1996).

Pseudomonas spp. são bastonetes Gram-negativos, que apresentam motilidade, geralmente aeróbicos, não fermentadores, isto é, não utilizam carboidratos como fonte de energia ou os degradam por outras vias metabólicas que não a fermentação. Esse

gênero é constituído por espécies que tem menores tempos de multiplicação (4 a 12 horas), numa faixa de temperatura entre 0°C a 7°C (MUIR, 1996).

Uma importante característica dos psicrotróficos encontrados no leite e produtos derivados é a sua capacidade de síntese, durante a fase log, de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite. Ainda que durante a pasteurização do leite a grande maioria dos psicrotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas termorresistentes produzidas por estes microrganismos (MUIR, 1996; CUNHA e BRANDÃO, 2000; SANTOS e FONSECA, 2003).

Segundo Desamases e Gueguen (1997), em extenso trabalho relatando os resultados do monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado, apontaram o gênero *Pseudomonas* como o mais importante em termos de contaminação microbiológica. Wiedmann *et al.* (2000) e Pinto *et al.* (2004) também relatam que o principal gênero da microbiota psicrotrófica envolvida na produção de enzimas no leite cru é o gênero *Pseudomonas*. Esse gênero inclui espécies que se caracterizam por apresentar alta diversidade genética (MARTINS *et al.*, 2003) e mecanismos fisiológicos de adaptação e crescimento a baixas temperaturas (JAY, 2002).

A microflora inicial influencia grandemente nessa qualidade do leite cru e conseqüentemente dos produtos com ele fabricados. As técnicas usuais de manuseio de leite cru freqüentemente resultam em altas contagens de psicrotróficos antes da fabricação de produtos lácteos, que através de suas atividades proteolíticas e lipolíticas produzem substâncias indesejáveis aos produtos (FONSECA e SANTOS, 2000). Apesar da importância dos psicrotróficos, o Ministério da Agricultura não estipula um padrão de qualidade e identidade do leite, baseado na contagem de unidades formadoras de colônia destes microrganismos. No Brasil não existe uma regulamentação sobre a qualidade microbiológica do leite *in natura* destinado à fabricação de produtos lácteos específicos. Apesar disso, com base nos dados da literatura parece imprudente a fabricação de produtos a partir do leite em que a contagem de psicrotróficos tenha excedido a 10^6 UFC/mL, pois neste caso é grande a possibilidade da presença de enzimas degradativas extracelulares. Mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas pela legislação brasileira para a conservação do leite na fonte de produção e no estabelecimento industrial pode ocorrer perda de qualidade da matéria-prima se um controle efetivo de contaminação inicial não for realizado (MARTINS *et al.*, 2004).

Na atual conjuntura de desenvolvimento da cadeia agroindustrial do leite, é pertinente que se faça uma análise dos pontos críticos que podem levar a um alto risco de contaminação do leite com microrganismos psicrotróficos (SANTOS e FONSECA, 2003). Há uma grande necessidade de associar-se à refrigeração as boas práticas de fabricação para que se evite ou monitore a contaminação do leite por microrganismo psicrotróficos (FONSECA e SANTOS, 2000).

2.4. Origem dos microrganismos psicrotróficos no leite

Os microrganismos psicrotróficos quando presentes no leite refrigerado, em particular no “in natura” sugerem alterações na qualidade do produto final. A ocorrência desse grupo bacteriano no leite depende diretamente da adequação ou não do manejo da propriedade. Leite produzido sob condições adequadas de higiene, poderá conter menos que 10% de psicrotróficos em relação a microbiota total, mas naquele produzido em condições higiênicas inadequadas, esse grupo microbiano poderá contribuir com mais de 75%. A contaminação dos produtos lácteos por bactérias psicrotróficas pode originar-se do suprimento de água de qualidade inadequada, deficiências de procedimentos de higiene e mastite (ENEROTH, 2000a e 2000b; JAY, 2002; MURPHY e BOOR, 2000). Portanto, procedimentos de higienização empregados na cadeia produtiva do leite constituem pontos importantes para a obtenção de uma matéria-prima de alta qualidade.

Fontes ambientais de contaminação do leite incluem a água utilizada na limpeza do equipamento e em outras tarefas. É de fundamental importância que a água para estes fins seja potável, com baixa contaminação por coliformes e outros gêneros bacterianos como *Pseudomonas* e *Bacillus* (COUSIN, 1982). O leite pode ser contaminado quando entra em contato com a superfície do equipamento e/ou utensílios de ordenha, assim como no próprio tanque de refrigeração do leite mal ou nunca higienizados. A contagem bacteriana total do leite pode aumentar significativamente quando em contato com equipamentos nos quais a limpeza e sanitização são deficientes, pois os microrganismos proliferam nos resíduos de leite presentes em recipientes, borrachas, junções e qualquer outro local onde ocorra acúmulo de resíduos de leite.

Durante o intervalo entre as ordenhas, enquanto as vacas estão deitadas, ocorre intensa contaminação da pele dos tetos e do úbere, principalmente se o ambiente estiver altamente contaminado. A cama ou local de permanência dos animais pode abrigar

elevadas cargas microbianas, podendo atingir uma contagem bacteriana de 10^8 a 10^{10} UFC/mL (BRAMLEY, 1982; HOGAN et al., 1989).

2.5. Microrganismos psicrotróficos: conseqüências na qualidade do leite

O controle deste grupo de bactérias tem fundamental importância no prolongamento da vida útil do leite e seus derivados. Embora a pasteurização elimine a maioria dos microrganismos presentes no leite, salienta-se que quando o leite é armazenado sob frio, os microrganismos psicrotróficos, desenvolvem atividades metabólicas, como fermentação de carboidratos, hidrólise de proteínas e gorduras (SANTANA, 2001). A degradação desses componentes do leite contribui para a redução de sua qualidade, especialmente nos caracteres organolépticos normais (sabor e odor). Além disso, esses microrganismos podem produzir enzimas termoestáveis, as quais são responsáveis pelas alterações bioquímicas pós-pasteurização (MUIR, 1996). Gomes (1988) enfatiza que a flora psicrotrófica do leite é responsável pela grande produção de enzimas, quer proteolíticas e/ou lipolíticas. Cousin (1982) relata que as enzimas proteolíticas decorrentes de *Pseudomonas* spp. são sintetizadas a 4°C, mas a concentração é aumentada em temperaturas entre 20° C a 30°C.

As enzimas proteolíticas, produzidas por organismos psicrotróficos, mantêm atividade enzimática mesmo após o tratamento do leite pelo UAT (COUSIN, 1982). Gomes (1996), afirma que as proteases produzidas por essas bactérias, mesmo em concentrações ínfimas, podem hidrolisar as proteínas do leite, ocasionando sabor amargo e gelificação no leite UAT. Uma ampla gama de problemas de qualidade de produtos lácteos pode estar associada à ação de proteases e lipases de origem microbiana como: alteração de sabor e odor do leite, perda de consistência na formação do coágulo para fabricação de queijo e gelificação do leite longa vida (COUSIN, 1982; KOHLMANN *et al.*, 1991; MUIR, 1996).

Datta e Deeth (2001) também citam gelificação do leite UHT durante o período de estocagem como um grande problema causado por enzimas de psicrotróficos. Essas enzimas estão relacionadas também com defeitos sensoriais (CELESTINO *et al.*, 1996; WIKING *et al.*, 2002), e, instabilidade térmica do leite (ADAMS *et al.*, 1976). Estas enzimas de origem microbiana podem estar localizadas dentro das bactérias (intracelulares), associadas à parede celular (periplasmáticas) ou serem excretadas para o meio (extracelulares) (SANTOS e FONSECA, 2003). As enzimas intracelulares e

aquelas associadas com a parede celular podem ser liberadas no leite quando ocorre a lise celular das bactérias, após o tratamento térmico e, desta forma, em conjunto com as enzimas extracelulares, apresentar ação sobre os componentes do leite (KOHLMANN *et al.*, 1991). Portanto, essas enzimas apresentam grande importância na qualidade e na vida de prateleira de produtos lácteos como queijos, leite longa vida e creme de leite (SWAISGOOD e BOSOGLU, 1984).

Já as proteases produzidas por bactérias psicrotróficas agem sobre a caseína e de forma semelhante à quimosina, liberando o caseinomacropéptido – CMP, porém apresentam menor especificidade (DATTA e DEETH, 2001). Na indústria de queijos, os produtores têm sérios problemas com relação ao rendimento dos mesmos, devido à atuação de bactérias, principalmente psicrotróficas, sobre a proteína do leite. Também os microrganismos utilizam em seu metabolismo outros componentes do leite, podendo produzir produtos metabólicos de sabores e odores estranhos, assim como enzimas termoestáveis que vão trazer ao alimento alterações indesejáveis. Ranis e Lewis (1995) afirmam que mesmo em produtos finais que tenham uma contagem bacteriana dentro dos padrões legais, este tipo de transformação pode ocorrer. Sorhaug e Stepaniak (1997) também citam que a estocagem do leite a frio suprime o desenvolvimento de bactérias produtoras de ácido, mas selecionam microrganismos psicrotróficos produtores de proteases. Estas afetam, predominantemente, a κ -caseína, enquanto a β -caseína e a α -caseína são menos susceptíveis. A pasteurização e outros tratamentos subsequentes destroem ou removem estes microrganismos, mas proteinases e lipases exocelulares termorresistentes produzidas por eles representam um importante fator de deterioração do leite durante a estocagem.

A κ -caseína, por estar situada na camada externa da micela de caseína, é a mais susceptível ao ataque das proteases dos microrganismos, em especial por enzimas produzidas por *Pseudomonas* (COUSIN, 1982). Essa proteína, ao ser hidrolizada, provoca desestabilização da micela, levando à coagulação do leite, e esta alteração bioquímica está associada com a gelatinização do leite longa-vida (LAW *et al.*, 1977; MUIR, 1996). Fairbairn e Law (1986), também afirmaram que a hidrólise de proteínas do leite pelas proteinases provenientes de psicrotróficos, determina a coagulação do leite, alteração de sabor e redução do rendimento no processamento de derivados. O produto da hidrólise de frações de caseínas resulta no surgimento de peptídeos responsáveis pelo sabor amargo (FAIRBAIRN e LAW, 1986).

Adams et al. (1975) relatam que, quanto maior o tempo de estocagem do leite cru, maior será a ação de enzimas proteolíticas sobre o leite UAT. Mckellar (1981) afirma que o leite pasteurizado é mais resistente à proteólise microbiana do que o leite UAT. Mottar (1981), avaliando leite UAT durante seu período de estocagem, observou a influência de enzimas proteolíticas originadas por psicotróficos, concluindo que, das amostras analisadas, 97% continham proteases termoresistentes e que, portanto, a qualidade microbiológica do leite cru, em particular os índices de contaminação de psicotróficos, determina a natureza e a quantidade dessas enzimas termorresistentes.

Outra ação bioquímica em relação à qualidade do leite é a lipólise originada por microrganismos psicotróficos, sendo essa alteração é decorrente da atividade de lípases microbianas, provocando hidrólise dos triglicerídeos e liberando ácidos graxos de cadeia curta, responsáveis pelo surgimento de odores desagradáveis no leite. Estas enzimas são termorresistentes e se mantêm ativas, mesmo em temperaturas muito baixas (GOMES, 1996). Essas alterações não têm a mesma severidade daquelas produzidas pelas enzimas proteolíticas, sendo que os gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Serratia* produzem enzimas lipolíticas termorresistentes, das quais *P. fragi* e *P. fluorescens* são as principais produtoras (SHAH, 1994).

Outra enzima que apresenta relevância na qualidade do leite, e que é produzida por microrganismos psicotróficos, é a fosfolipase, onde a fosfolipase C ou lecitinase, tem papel fundamental na indústria laticinista (COUSIN, 1982), pois causa o rompimento do glóbulo de gordura, facilitando à ação das lipases. De acordo com Muir (1996), *Pseudomonas* spp. e *Bacillus cereus* são as espécies microbianas que sintetizam esta enzima, cuja ação é a hidrólise na membrana fosfolipídica que envolve os triglicerídeos, favorecendo de imediato a atuação da lipase sobre os ácidos graxos livres.

Segundo Silva (2004), a inexistência de especificações de composição e requisitos físico-químicos e microbiológicos para o leite cru destinado ao processo “UAT” tem gerado discussões sobre a qualidade da matéria-prima utilizada pelas indústrias brasileiras.

2.6 Adesão e formação de biofilmes

Biofilmes são complexos ecossistemas microbiológicos embebidos em uma matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície (COSTA, 1999; CARPENTIER e CERF, 1993). Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos,

fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, que formam uma espécie de crosta, debaixo da qual, os microrganismos continuam crescer, formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos. No biofilme os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos, como aqueles usados no procedimento de higienização (PARIZI, 1998; MOSTELER e BISHOP, 1993). A matriz de polímeros extracelulares (EPS) de natureza polissacarídea ou proteica, também conhecida como glicocálix, expõe-se exteriormente à membrana externa das células Gram-negativas e ao peptídeoglicano das Gram-positivas (COSTERTON et al., 1985), é sintetizada por polimerases, constituindo-se em uma estrutura complexa bem hidratada (MOSTELER e BISHOP, 1993).

Segundo Forsythe (2002), *Pseudomonas* são capazes de produzir grande quantidade de exopolissacarídeos que contribuem para a adesão e formação de biofilmes em superfícies utilizadas no processamento de leite e derivados.

O alimento pode ser contaminado por bactérias deteriorantes e patogênicas indesejáveis provenientes de biofilmes. Portanto, a formação de biofilmes conduz a sérios problemas de higiene e perdas econômicas devido a deterioração do alimento e persistência de patógenos, reduzindo o prazo de validade dos produtos desde o processamento até a comercialização. A formação de biofilmes em superfícies metálicas também conduz a mudanças no grau do processo de corrosão, reduzindo a vida útil de equipamentos industriais (VALCARCE et al., 2002).

As falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação. Sob determinadas condições, os microrganismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam crescimento celular. Essa multiplicação dá origem a colônias e quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, está formado o que se denomina biofilme (COSTERTON et al., 1985).

Vários fatores contribuem para a adesão de uma bactéria à determinada superfície e dependem não só da fisiologia do microrganismo, mas também da natureza do substrato (COSTA, 1999), as células bacterianas, possuem carga negativa e de potencial de hidrogênio (pH) em torno de 3; nas Gram positivas a carga negativa é originária dos ácidos teicóicos e teicurônicos da parede e dos polipeptídeos do glicocálix: nas Gram negativas dos lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa em conjunto aos polímeros do glicocálix.

Dentre os microrganismos que podem participar de processos de adesão e podem gerar problemas de saúde pública ou de ordem econômica, ressaltamos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* spp. e *Enterococcus faecium* (CRIADO et al., 1994; ANDRADE et al., 1998; LERICHE e CARPENTIER, 1995). Como exemplos de patogênicos podemos citar: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (LERICHE e CARPENTIER, 1995; SMITH e FRATÂMICO, 1995).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigos aceitos ou enviados para publicação em revistas científicas. Cada subtítulo deste capítulo corresponde a um destes artigos.

3.1 Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. Artigo aceito para publicação no periódico *Acta Scientiae Veterinariae*.

3.2 Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. Artigo enviado para publicação no periódico *International Journal of Dairy Technology*.

3.3 Proteolytic activity of a psychrotrophic *Burkholderia cepacia* strain isolated from refrigerated raw milk. Artigo enviado para publicação no periódico *Milchwissenschaft - Milk Science International*.

Os artigos apresentados neste trabalho fazem parte do processo de isolamento, identificação e caracterização de bactérias psicotróficas presentes no leite bovino cru refrigerado.

Este trabalho teve início com a coleta de amostras de leite cru refrigerado de caminhões tanque e de silos de armazenamento de duas indústrias de laticínios do Rio Grande do Sul. Foram determinadas as contagens totais de bactérias psicotróficas e atividade proteolítica, não existindo uma correlação direta entre os dois parâmetros no conjunto de amostras analisadas. A contagem de psicotróficos apresentou um padrão semelhante para amostras coletadas no tanque isotérmico ou no silo de armazenamento, com mínimos no mês de julho, coincidindo com o inverno na região sul do Brasil.

Foi realizada a triagem de 249 colônias isoladas do leite cru resfriado. Destas, 142 foram identificadas como bactérias proteolíticas, das quais, 90% foram Gram-negativas e 10% Gram-positivas. Estes isolados foram pesquisados para verificar sua capacidade proteolítica, selecionando-se culturas que apresentaram halos superiores a 10mm, com base em testes morfológicos e bioquímicos.

Um isolado foi selecionado, identificado e a enzima por ele produzida foi pesquisada e caracterizada. A determinação da atividade e sua caracterização foram feitas de modo a verificar sua estabilidade em diferentes condições. Também foi

observado sua capacidade de coagular leite UAT, aderência e formação de biofilme. Esta bactéria foi identificada como *Burkholderia cepacea*.

3.1. ARTIGO 1

3.1. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado.

Psychrotrophic bacteria and proteolytic activity in refrigerated raw milk

3.1.1 Resumo

O resfriamento prolongado do leite na propriedade, e a posterior coleta e transporte do produto em caminhões tanque isotérmicos pode possibilitar o desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos. Estes microrganismos, conhecidos pela sua habilidade em se desenvolver a temperaturas menores que 7°C, geralmente são eliminados pelos tratamentos térmicos aplicados ao leite, ao contrário de algumas de suas enzimas proteolíticas e lipolíticas, as quais resistem até mesmo ao tratamento UAT. Neste trabalho, foram determinadas contagens de bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica de amostras de leite cru refrigerado obtidas de dois laticínios. As contagens médias foram entre 6,0 e 6,5 log UFC/mL, não existindo diferenças significativas entre as duas plantas industriais. Houve grande variabilidade na atividade proteolítica das amostras, existindo diferença significativa entre valores médios das duas plantas. Não houve correlação entre atividade proteolítica e contagens de psicrotróficos, sugerindo que a proteólise está associada com linhagens específicas de bactérias. Recentemente a Instrução Normativa 51 estabeleceu que o leite deve ser refrigerado e armazenado na propriedade rural, aumentando a importância prática e industrial desse grupo de bactérias. Com a substituição do leite cru tipo C pelo leite cru refrigerado, o qual deve ser resfriado na propriedade e pode ter até $7,5 \times 10^5$ log UFC/mL de mesófilos totais no momento de seu recebimento na usina, a preocupação sobre o grupo dos psicrotróficos aumenta ainda mais no mercado laticinista brasileiro.

Descritores: leite, refrigeração, protease, bactérias

3.1.2 Abstract

The prolonged milk refrigeration in the dairy farm and its transport in insulated containers on trucks, has given products with lower quality standards since prolonged refrigeration allow the development of psychrotrophic micro-organisms. These micro-organisms, known by their ability to develop at temperatures lower than 7°C, are normally eliminated through heating treatments applied to milk, on contrast to their proteolytic and lipolytic enzymes, which often withstand even UHT treatments. In this work, psychrotrophic counts and proteolytic activity of raw milk samples from two dairy plants were determined. The average counts were between 6.0 and 6.5 log cfu/mL, without significant differences between the dairy plants. Proteolytic activity varies greatly among samples, and a significant difference was observed between the mean values of both dairy plants. A correlation between proteolytic activity and psychrotrophic counts was not observed, suggesting that proteolysis is associated with specific bacterial strains. Recently, Normative Instruction 51 has established that milk should be refrigerated and stored on the dairy farm thus increasing the practical and industrial importance of this group of bacteria. Raw milk type C has been substituted by refrigerated raw milk, which should be refrigerated on the dairy farm and could present up to $7,5 \times 10^5$ logcfu/mL of total mesophiles at the moment it is received at the dairy plant. Thus, the presence of psychrotrophics becomes an issue of greater concern within the Brazilian dairy market.

Key words: milk, refrigeration, protease, bacteria

3.1.3 Introdução

O armazenamento do leite cru sob refrigeração possibilita a redução de custos operacionais de produção e evita perdas dessa matéria-prima pela atividade acidificante de bactérias mesofílicas. Entretanto, o armazenamento por períodos prolongados pode resultar em queda de qualidade dos produtos lácteos devido ao crescimento e à atividade enzimática de bactérias psicotróficas [7,19].

Embora representando menos 10% da microbiota inicial em condições sanitárias adequadas, a população de microrganismos psicotróficos no leite cru pode alcançar elevadas concentrações em condições mais precárias de higiene [7,30]. Este é um fato preocupante, pois embora a maioria seja destruída pela pasteurização, os psicotróficos são capazes de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes, que mantêm sua atividade após a pasteurização ou mesmo após o tratamento por UAT (Temperatura Ultra Alta). Alguns problemas relacionados à qualidade dos produtos lácteos, como alteração de sabor e odor do leite, perda de consistência e gelatinização ao longo da vida comercial do leite UAT, podem estar associados à ação de proteases e lipases de origem bacteriana [4,31,33]. A gelatinização constitui-se num dos principais problemas que afetam a qualidade do leite UAT. Alguns pesquisadores acreditam que esta é induzida, inicialmente, pela ação de proteases termorresistentes presentes naturalmente no leite e/ou provenientes de bactérias, principalmente do grupo dos psicotróficos [16,18]. Estas enzimas apresentam a capacidade de degradar as caseínas e promover a agregação das micelas do leite [8,30]. Parece imprudente a fabricação de produtos a partir do leite em que a contagem de psicotróficos tenha excedido a $6 \log \text{UFC/mL}$, pois neste caso é grande a possibilidade da presença de enzimas hidrolíticas extracelulares [19,23].

A implementação do armazenamento do leite cru refrigerado na fonte de produção iniciou-se no Brasil, na década de 90, sendo regulamentada pela publicação da Instrução Normativa 51, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, de 18 de setembro de 2002 que entrou em vigor em 1º de julho de 2005 nas regiões sul, sudeste e centro-oeste [2]. Nesse processo de conservação do leite pelo frio, recomenda-se que, na segunda hora após a ordenha, a temperatura deva estar a 4°C, condição esta que pode favorecer a proliferação de microrganismos psicotróficos [23]. Na maioria das propriedades leiteiras, a temperatura de refrigeração oscila entre 5 a 10°C, o que configura, um resfriamento marginal do leite, contribuindo para multiplicação de

microrganismos psicotróficos [27]. Mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas pela legislação brasileira para a conservação do leite no estabelecimento industrial, pode ocorrer perda de qualidade da matéria-prima se um controle efetivo de contaminação inicial não for realizado [18].

Neste artigo investigou-se a presença de bactérias psicotróficas em amostras de leite cru refrigerado de dois laticínios do Rio Grande do Sul e sua correlação com a atividade proteolítica detectada nestas amostras. São discutidos os aspectos relacionados com a presença de bactérias psicotróficas e proteolíticas no leite cru refrigerado e suas conseqüências para a qualidade do leite e produtos lácteos.

3.1.4 Materiais e Métodos

Amostras de leite cru refrigerado foram coletadas de dois laticínios do Estado do Rio Grande do Sul. Foram coletadas 50 amostras do silo de armazenamento do primeiro laticínio (L1) durante o ano de 2005, e 20 amostras do tanque isotérmico de caminhões e 20 amostras do silo de armazenamento do segundo estabelecimento (L2) durante 2006. Amostras de 100mL foram coletadas em frascos estéreis e transportados a 7°C imediatamente ao laboratório.

As amostras foram submetidas a diluições seriadas até 10^{-8} em água peptonada (0,1%) estéril. As sucessivas diluições foram inoculadas em placas de PCA (Mast Diagnostics, Merseyside, UK) para determinação da contagem total de psicotróficos. As placas foram incubadas por 10 dias a 7°C e as contagens realizadas em placas contendo entre 30 e 300 colônias [21].

A atividade proteolítica foi analisada pelo método de hidrólise de gelatina solúvel [15]. Alíquotas de 100µL foram diluídas em 100µL de tampão acetato de amônio pH 5,5. Adicionou-se 10µL de cisteína 0,1 M e após 5 min a reação foi iniciada pela adição de 300µL de solução 10mg/mL de gelatina (Sigma, St. Louis, USA). A mistura foi incubada por 60 min a 37°C, adicionou-se 660µL de isopropanol 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 uma pipeta Pasteur. A absorbância a 280nm foi determinada em espectrofotômetro Hitachi U1100. Uma unidade de atividade enzimática representa a quantidade de enzima necessária para modificar A_{280} em 0,01/h a 37°C.

A associação entre contagem de bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica das populações em amostras de leite cru refrigerado foi testada pela correlação de Pearson. Diferenças entre dois tipos de populações foram analisadas através do teste t para amostras simples. A análise de variância foi utilizada para determinar diferenças entre populações de bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica em diferentes amostras. A análise estatística foi realizada com o algoritmo Origin 5.0 (Microcal Software, Northampton, USA).

3.1.5 Resultados

Os valores médios de bactérias psicrotróficas cultiváveis em PCA foi entre 6,0 e 6,5 logUFC/mL para amostras obtidas nos diferentes laticínios (Tabela 1). As amostras não apresentaram diferenças significativas nos níveis de contagens de populações de bactérias psicrotróficas (análise de variância de medidas repetidas; $F = 0,668$; $P = 0,515$). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de bactérias psicrotróficas entre os dois laticínios (teste t : $t = -1,184$; $P = 0,243$).

Os valores médios de atividade proteolítica variaram entre 3 e 12U/mL (Tabela 1). Observou-se grande variabilidade na atividade proteolítica, algumas amostras apresentaram elevada atividade, enquanto que outras mostraram atividade muito baixa. As amostras apresentaram diferenças significativas nos valores médios de atividade proteolítica (análise de variância de medidas repetidas; $F = 13,132$; $P = 1,04 \times 10^{-5}$). A comparação entre a atividade proteolítica detectada em amostras de leite cru indicou que existem diferenças significativas entre os diferentes laticínios (teste t : $t = -8,508$; $P = 2,01 \times 10^{-10}$), com atividade proteolítica superior nas amostras provenientes do laticínio L1.

A distribuição da atividade proteolítica detectada nas amostras de leite cru refrigerado em relação às contagens de bactérias psicrotróficas das respectivas amostras pode ser visualizada na Figura 1. Não foi observada uma correlação significativa entre a população de psicrotróficos e atividade proteolítica nas amostras estudadas (Tabela 2). Embora a correlação seja negativa, pode ser observado que a maioria das amostras apresentaram contagens entre 6 e 7 logUFC/mL. Agrupando estas amostras em função da atividade proteolítica podem ser formados *clusters*, incluindo 40% das amostras do laticínio L1 e 50% das amostras do laticínio L2 (Figura 1).

3.1.6 Discussão

A contaminação dos produtos lácteos por bactérias psicrotróficas pode originar-se do suprimento de água de qualidade inadequada, deficiências de procedimentos de higiene e mastite [20]. Estes microrganismos mantêm sua capacidade de multiplicação em condições de refrigeração e tendem a se tornar predominantes na microbiota do leite cru [9,14]. Isto sugere que a refrigeração do leite cru até a chegada na unidade de processamento, prevista na legislação de no máximo 7°C [2], não é suficiente para a manutenção da qualidade microbiológica da matéria-prima dependendo de quanto tempo que este leite fique submetido a esta condição. Uma contaminação inicial elevada do leite pode promover o aumento da população para 8-9 logUFC/mL conferindo prejuízos econômicos à indústria de laticínios, o que torna a situação do leite, que chega até ao laticínio com contagens elevadas, bastante preocupante.

As contagens médias observadas neste trabalho foram similares às descritas por Pinto et al. [22], que encontraram contagem média de bactérias psicrotróficas de 6 log UFC/mL no leite cru refrigerado. Contagens elevadas de bactérias psicrotróficas no leite bovino têm sido relatadas em diferentes regiões do Brasil (Tabela 3). Estes resultados são preocupantes, pois quando o número de psicrotróficos atinge contagens superiores a 6logUFC/mL sugere-se a produção significativa de enzimas termorresistentes responsáveis por alterações como a gelatinização do leite UAT, além do desenvolvimento de sabor residual no leite pasteurizado [6,23].

Bactérias psicrotróficas por si não representam um problema muito sério para indústria, pois são eliminadas pelo tratamento térmico, entretanto as enzimas produzidas e secretadas por estes microrganismos apresentam efeitos deteriorantes. Tais enzimas são freqüentemente muito estáveis ao calor e resistentes ao processo térmico convencional utilizado no leite [16,18]. Uma ampla gama de problemas de qualidade de produtos lácteos pode estar associada à ação de proteases e lipases de origem microbiana, como alteração de sabor e odor do leite, perda de consistência na formação do coágulo para fabricação de queijo e gelatinização do leite UAT [8,33].

A atividade proteolítica das amostras de leite cru refrigerado apresentou uma ampla variação, mesmo assim foram observadas diferenças entre as médias dos diferentes laticínios. Muitos relatos da atividade proteolítica de bactérias psicrotróficas do leite baseiam-se na formação de halos de proteólise em placas de agar, embora alguns autores descrevam a quantificação desta atividade proteolítica [3,17]. Entretanto,

as metodologias para determinação de proteólise no leite geralmente são distintas e não permitem uma comparação direta dos resultados obtidos. A quantificação da atividade proteolítica de 52 amostras de leite cru obtidas na Índia revelou que a proteólise aumentou durante o armazenamento a 4°C e 7°C, mas não a 2°C [17]. No entanto, não se estabeleceu uma relação entre atividade proteolítica e contagens de bactérias psicrotróficas.

Embora o potencial deteriorante das proteases de bactérias psicrotróficas seja reconhecido, não existe uma correlação direta entre contagens de psicrotróficos e atividade proteolítica. Isto sugere que a composição da microflora de bactérias psicrotróficas do leite cru tenha um papel importante no desenvolvimento da proteólise. Algumas espécies de microrganismos psicrotróficos seriam os principais responsáveis pela produção de enzimas termorresistentes. Neste sentido, espécies de *Pseudomonas* que produzem metaloproteases extracelulares termorresistentes têm sido associadas à degradação de proteínas do leite [8,9,14,19]. A ação das proteases de psicrotróficos é distinta entre as frações protéicas do leite. A κ -caseína é a caseína mais susceptível à ação destas enzimas, sendo que as proteínas do soro do leite são resistentes ao ataque das proteases [13]. A hidrólise da κ -caseína desestabiliza as micelas, que coagulam, e esta alteração bioquímica é associada a gelatinização do leite UAT.

A gelatinização constitui-se em um dos principais problemas que afetam a qualidade do leite UAT. O processo UAT promove o aumento da viscosidade do leite, mas não a sua coagulação, já que o tempo de aquecimento é curto. Durante o período de armazenamento, a viscosidade do leite aumenta, até a formação do gel (gelatinização), indicando que o produto não está mais apto para o consumo [32]. Alguns pesquisadores acreditam que o fenômeno de gelatinização é induzido, inicialmente, pela ação de enzimas (proteases) termorresistentes presentes, naturalmente, no leite e/ou provenientes de bactérias, principalmente do grupo dos psicrotróficos. Estas enzimas apresentam a capacidade de degradar as caseínas e promover a agregação das micelas do leite [10,12].

As proteases microbianas são ainda responsáveis pelo desenvolvimento de sabor residual no leite pasteurizado, amargor no leite UAT, e pela deficiência de determinados processos na produção de queijos, como a perda de rendimento e aparecimento de defeitos [6,30].

3.1.7 Conclusão

As amostras de leite obtidas de dois laticínios do RS apresentaram contagens de bactérias psicrotóxicas similares ao observado por outros autores em diferentes regiões do Brasil. A presença de contagens elevadas de psicrotóxicos no leite evidencia a existência de falhas em procedimentos de manipulação e higienização, podendo comprometer a qualidade e diminuir a vida de prateleira do produto final. A falta de correlação entre as contagens de psicrotóxicos e a atividade proteolítica indica que o fenômeno da proteólise está principalmente associado a linhagens específicas de bactérias psicrotóxicas com elevada capacidade de proteólise. A produção de enzimas hidrolíticas termorresistentes por bactérias psicrotóxicas pode ocasionar alterações indesejáveis no leite UAT, como a gelatinização e o desenvolvimento de sabor amargo.

Agradecimentos. Os autores agradecem a CAPES-PICDT e ao CNPq pelas bolsas concedidas.

3.1.8 Referências

- 1 **Antunes V.C., Siqueira Junior W.M., Valente P.P., Barros A.P., Conde C.B.C, Rosa R., Bertoldi M.C., Saraiva C. & Ferreira C.L.L.F. 2002.** Contagem total de microrganismos mesófilos e de psicrotóxicos no leite cru e pasteurizado, transportado via latão ou granelizado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. 57: 198-201.
- 2 **Brasil. 2002.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51 de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília. 172, 8-13, 20 de set.. Seção I.
- 3 **Burdová O., Baranová M., Lauková A., Rözanska H. & Rola J.G. 2002.** Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. *Bulletin of the Veterinary Institute Pulawy*. 46: 325-329.
- 4 **Chen L., Daniel R.M. & Coolbear T. 2003.** Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*. 13: 255-275.

- 5 **Cordeiro C.A.M., Carlos L.A. & Martins M.L.L. 2002.** Qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo C, proveniente de micro-usinas de Campos dos Goytacazes, RJ. *Higiene Alimentar*. 16: 41-44.
- 6 **Costa L.M., Gómez M.F., Molina L.H. & Romero, A. 2002.** Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 52: 1-13.
- 7 **Cousin M.A. 1982.** Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection*. 45: 172-207.
- 8 **Datta N. & Deeth H.C. 2001.** Age gelation of UHT milk - a review. *Food and Bioproducts Processing*. 79: 197-210.
- 9 **Eneroth A., Ahrné S. & Molin, G. 2000.** Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *International Dairy Journal*. 10: 325-331.
- 10 **Famelart M.H., Tomazewski J., Piot M. & Pezennec, S. 2004.** Comprehensive study of acid gelation of heated milk with model protein systems. *International Dairy Journal*. 14: 313-321.
- 11 **Feijó L.D., Pinheiro C.A., Silva A.C.O., Cerqueira M.M.O.P., Souza M.R. & Pena C.F.A.M. 2002.** Caminhões de Coleta a Granel: Monitoramento da qualidade do leite, da higienização do mangote e da superfície do caminhão tanque. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. 57, 285.
- 12 **Fox P.F. & Kelly A.L. 2006.** Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects. *International Dairy Journal*. 16: 500-516.
- 13 **Gaucher I., Mollé D., Gagnaire V. & Gaucheron F. 2008.** Effects of storage temperature on physico-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. *Food Hydrocolloids*. 22: 130-143.
- 14 **Hantsis-Zacharov E. & Halpern M. 2007.** Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*. 73: 7162-7168.
- 15 **Jones B.L., Fontanini D., Jarvinen M. & Pekkarinen A. 1998.** Simplified endoproteinase assays using gelatin or azogelatin. *Analytical Biochemistry*. 263: 214-220.
- 16 **Koka R. & Weimer B.C. 2000.** Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 280-288.

- 17 **Kumerasan G., Annalvilli R. & Sivakumar K. 2007.** Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. *Journal of Applied Science Research*. 3: 1383-1387.
- 18 **Martins M.L., Araújo E.F., Moraes C.A., Mantovani H.C. & Vanetti M.C.D. 2003.** Diversidade genética de bactérias psicotróficas proteolíticas isoladas de leite cru granelizado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. 58: 54-60.
- 19 **Martins M.L, Araújo E.F., Mantovani H.C. & Moraes C.A. 2005.** Detection of the *apr* gene in proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*. 102: 203-211.
- 20 **Murphy S.C. & Boor K.J. 2000.** Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. *Dairy Food and Environmental Sanitation*. 20: 606-611.
- 21 **Oliveira J.S. & Parmelee C.E. 1976.** Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. *Journal of Milk Food Technology*. 39: 269-272.
- 22 **Pinto C.L.O., Cardoso R.R. & Vanetti M.C.D. 2004.** Bactérias psicotróficas proteolíticas e potencial determinador a temperaturas de refrigeração. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. 59: 110-117.
- 23 **Pinto C.L.O., Martins M.L. & Vanetti M.C.D. 2006.** Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26: 645-651.
- 24 **Roque R.A., Schumacher S.S.P. & Paiva P.C. 2003.** Quantificação de microrganismos psicotróficos em leites pasteurizados tipos B e C, comercializados na cidade de São Paulo - SP. *Higiene Alimentar*. 17: 59-68.
- 25 **Santos D. & Bergmann G.P. 2003.** Influência da temperatura durante o transporte sobre a qualidade microbiológica do leite cru. III-psicotróficos. *Higiene Alimentar*. 17: 86-91.
- 26 **Santos E.M.P., Cerqueira M.M.O.P., Silva A.C.O., Souza M.R. & Pena C.F.A.M. 2002.** Enumeração da microbiota psicotróficos em leite. *Higiene Alimentar*. 16: 25-34.
- 27 **Santos M.V. & Laranja F.L.F. 2001.** Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. *Higiene Alimentar*. 15: 13-19.

- 28 **Schimitt A., Durr J.W. & Soares, J. 2002.** Contagens de mesófilos e de psicrotróficos em leite cru e de diferentes regiões do Rio Grande do Sul. *Higiene Alimentar*. 17: 181-186.
- 29 **Silva P.H.F. 2003.** *Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e geleificação*. Lavras, MG, UFLA. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras.
- 30 **Sørhaug T. & Stephaniak L. 1997.** Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*. 8: 35-41.
- 31 **Tondo E.C., Lakus F.R., Oliveira F.A. & Brandelli A. 2004.** Identification of heat stable protease of *Klebsiella oxytoca* isolated from raw milk. *Letters in Applied Microbiology*. 38: 146-150.
- 32 **Vasbinder A.J., Rollema H.S., Bot A. & Kruif C.G. 2003.** Gelation mechanism of milk as influenced by pH and temperature, studied by the use of transglutaminase cross-linked casein micelles. *Journal of Dairy Science*. 86: 1556-1563.
- 33 **Wiking L., First M.B., Larsen L.B. & Nielsen J.H. 2002.** Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. *Milchwissenschaft*. 57: 190-194.

Tabela 1. Valores médios de contagens de bactérias psicotróficas e atividade proteolítica em leite cru refrigerado obtido em dois laticínios do Estado do Rio Grande do Sul

Laticínio ^a	n	Psicotróficos totais (log UFC/mL) ^b	Atividade proteolítica (U/mL) ^c
L1	50	6,43 ± 0,35	12,3 ± 9,1
L2 A	20	6,36 ± 0,78	4,3 ± 7,3
L2 B	20	6,24 ± 0,63	3,3 ± 5,2

^a Foram coletadas 50 amostras do silo de armazenamento do laticínio L1, 20 amostras do tanque isotérmico de caminhões (A) e 20 amostras do silo de armazenamento (B) do estabelecimento L2.

^b Contagens de psicotróficos determinadas em placas de PCA incubadas por 10 dias a 7°C.

^c Atividade proteolítica determinada pela hidrólise de gelatina solúvel [15].

Tabela 2. Análise da correlação entre atividade proteolítica e contagens de psicrotróficos em leite cru refrigerado obtido em dois laticínios do Estado do Rio Grande do Sul

Laticínio	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
L1	50	$5,46 \times 10^{-5}$	0,999
L2 A	20	0,213	0,368
L2 B	20	0,246	0,296

Os valores de atividade proteolítica e contagem de bactérias psicrotróficas das 50 amostras do silo de armazenamento do laticínio L1, 20 amostras do tanque isotérmico de caminhões (A) e 20 amostras do silo de armazenamento (B) do estabelecimento L2, foram submetidos ao teste de correlação de Pearson. Os parâmetros *r* e *P* foram calculados através do algoritmo Origin 5.0.

Tabela 3. Contagens de microrganismos psicrotróficos em amostras de leite bovino obtidas em diferentes regiões do Brasil

Tipo de leite	Local	Amostras	Psicrotróficos (log UFC/mL)	Referência
Cru refrigerado	RS	90	5,0 a 7,62	Este estudo
Cru	RS	120	5,52 (várias > 8,0)	[28]
Cru refrigerado em tarros	MG	5	> 6,0	[1]
Cru refrigerado à granel	MG	5	> 5,0	[1]
Cru, pasteurizado desnatado e UAT	RS, GO, SP	18	6,15 a 7,94	[29]
Cru refrigerado	ES	20	4,04 a 7,59	[11]
Cru transportado em temperatura ambiente	SC	125	3,4 a 8,23	[25]
Cru transportado refrigerado	SC	125	2,3 a 10,0	[25]
Cru	MG	50	4,5 a 7,45	[26]
Pasteurizado tipo C	MG	50	2,48	[26]
Pasteurizado tipo C	RJ	43	2,18 a 5,15	[5]
Pasteurizado tipo C	SP	31	2,83	[24]
Pasteurizado tipo B	SP	31	2,31	[24]

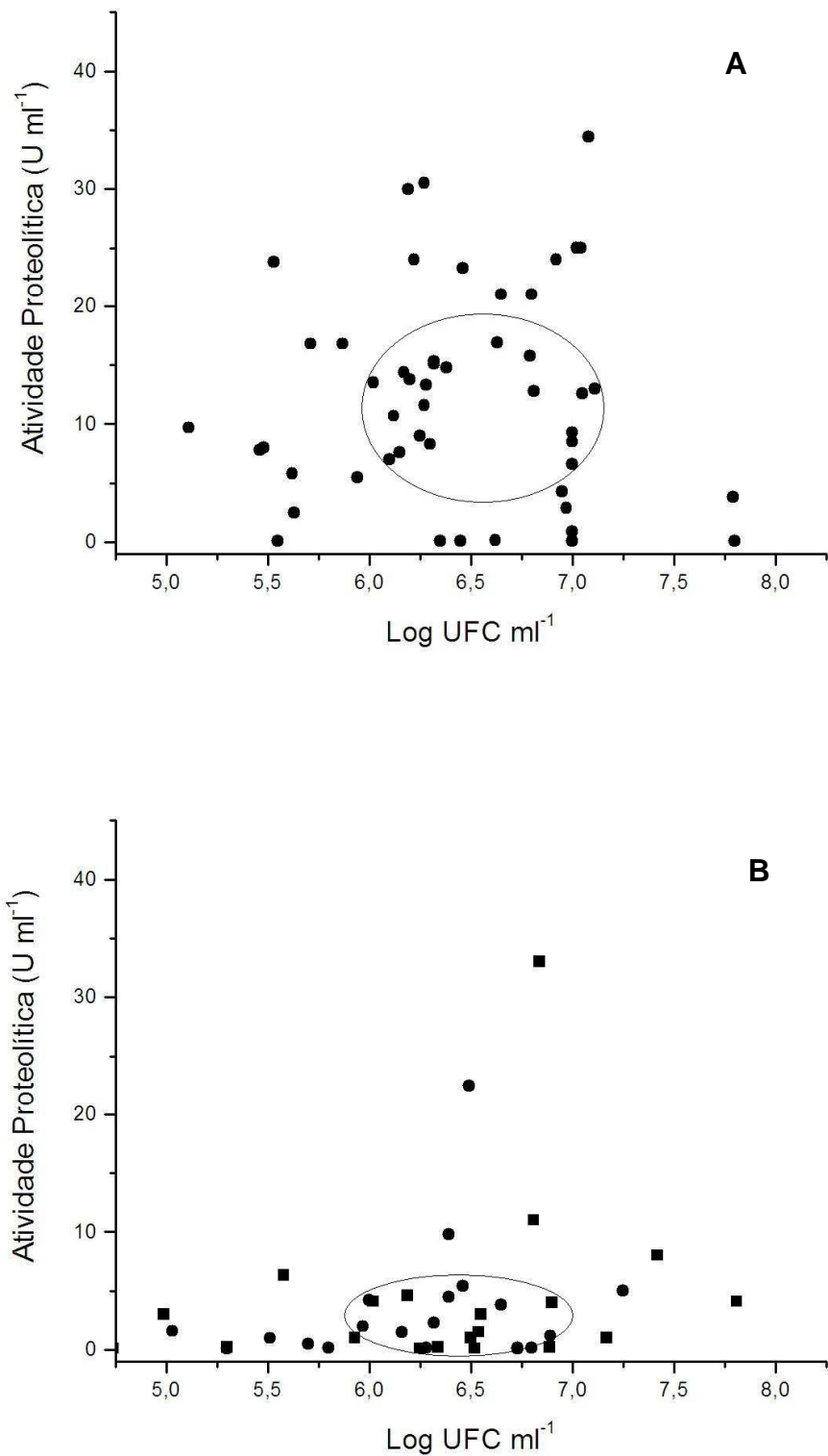


Figura 1. Correlação entre atividade proteolítica e contagens totais de psicrotróficos em amostras de leite cru refrigerado originado do laticínio L1 (A) e L2 (B). (●) Amostras de silos de armazenamento, (■) amostras do tanque isotérmico de caminhões.

3.2. ARTIGO 2

3.2 Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk

3.2.1 Abstract

Psychrotrophic bacteria were isolated from refrigerated raw milk of a processing plant at Southern Brazil. Psychrotrophic counts were between 4.9 and 7.8 log CFU/mL, and 5.3 to 7.2 log CFU/mL, for samples collected at the truck and the milk storage silo, respectively. Among the bacterial isolates, 90% were Gram-negative. Most strains presented low proteolytic activity, but strains of *Burkholderia cepacia*, *Klebsiella oxytoca* and *Aeromonas* sp. showed higher than 20 U/mL on azocasein as substrate. Crude proteases from selected strains were resistant to conventional heat treatments and caused coagulation of UHT milk after 5 days storage at room temperature.

Key words: protease, proteolysis, raw milk, spoilage bacteria

3.2.2 Introduction

The quality of a food product is directly linked to the quality of the raw material employed in its production. Storage of refrigerated raw milk at the dairy farm is a practice that aims to reduce milk spoilage due to acidifying activity of mesophilic bacteria (Cempírková 2002; Nicodème *et al.* 2005). The refrigerated storage of milk may enable the growth of psychrotrophic bacteria, which are destroyed through the conventional milk heating processes used at dairy plants. However, many psychrotrophic microorganisms produce and secrete hydrolytic enzymes with spoiling effects. Several of these enzymes are heat resistant and related to reduced shelf-life of milk and dairy products (Cousin 1982; Koka and Weimer 2000; Chen *et al.* 2003). Furthermore, their presence is not only linked to undesirable alteration in appearance and flavor, but residual activity of bacteria proteases can be related to gelation of milk and coagulation of milk proteins as well (Harwalkar *et al.* 1993; Tondo *et al.* 2004). Development of astringency in some raw milk and in pasteurized or ultra-high-temperature (UHT)-sterilized milk samples during storage has been related to the production of polypeptides by proteases that survive UHT treatment (Sørhaug and Stepaniak 1997). Residual activity of bacterial proteases has been associated with losses in cheese yield, formation of off-flavors, gelation of milk, and coagulation of UHT milk proteins during storage (Datta and Deeth 2003).

Although the effects of proteolytic psychrotrophic bacteria have been already described concerning dairy products, the information is mostly centered on the genus *Pseudomonas* (Eneroth *et al.* 1998; Nicodème *et al.* 2005; Martins *et al.* 2006). Relatively few information regarding other specific microorganisms and their proteolytic enzymes are available (Tondo *et al.* 2004). The objective of the present study was to characterize the microflora of psychrotrophic bacteria in raw milk, which was collected from the thermal insulated container of the milk truck and from the storage silo of a dairy plant. The enzymatic activities of the isolated bacteria that presented higher proteolytic capacity were partially characterized.

3.2.3 Materials and methods

3.2.3.1 Samples

Raw milk samples of 100 ml refrigerated at 4-7°C were collected monthly, from March to December 2006, from the truck container at the moment it arrived at a dairy plant (n=20), and from the industrial dairy storage silo (n=20). Samples were appropriately homogenized and placed into sterile glass tubes to be transported to the laboratory at refrigerated conditions.

3.2.3.2 Isolation of psychrotrophic bacteria

Samples of 1 ml were serially diluted in 9 ml of 0.1 % sterile peptone water and 0.1 ml of each dilution was plated onto Plate Count Agar (Mast Diagnostics, Merseyside, UK), being incubated at 7°C for up to 10 days (Oliveira and Parmalee 1976). Microorganisms that grew at such conditions were considered psychrotrophic and were isolated for evaluation of proteolytic activity on milk agar plates (50 g/l peptone, 30 g/l yeast extract, 12 g/l agar, 10% (v/v) skim UHT milk). The isolates were inoculated by stick and incubated for 24 h at 37°C. The presence of clearing zones indicating proteolysis was evaluated. Bacterial cultures were kept in milk agar plates at 4°C for further analysis.

3.2.3.3 Identification of bacteria

The identification of selected psychrotrophic microorganisms was based on morphological and biochemical tests according MacFaddin (2000), comparing data with standard species, and using API kits with the analysis of results through APILAB Plus (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Morphological, cultural and physiological characteristics were compared to data described in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.* 2000).

3.2.3.4 Production of proteolytic enzymes

Psychrotrophic bacteria that produced halos higher than 10 mm in milk agar plates were inoculated in mineral medium (0.5g/l NaCl, 0.4g/l K₂HPO₄, 0.3g/l K₂HPO₄)

containing 10 g/l casein with pH adjusted to 7.0. Enzyme production was obtained by incubation of psychrotrophic isolates for up to 72 h at 30°C in an orbital shaker at 120 rpm. After that, a sample of the culture was centrifuged at 10,000 g for 5 min in 1.5 ml tubes to separate cell biomass and supernatant. The supernatant was used as crude enzyme for the analysis of proteolytic activity under several conditions.

3.2.3.5 Enzyme activity

Proteolytic activity was determined as described elsewhere (Thys *et al.* 2004), using azocasein (Sigma, St. Louis, MO, USA) as substrate. Enzyme solution (100 µl) was mixed with 100 µl of 0.1 M phosphate pH 7.0, and then 100 µl of 10 mg/ml azocasein was added. The mixture was incubated at 37°C for 60 min and the reaction was interrupted by adding 500 µl of 30% (w/v) trichloroacetic acid. After centrifugation at 10,000 x g, 800 µl of the supernatant was mixed with 200 µl of 1.8 M NaOH. The absorbance at 420 nm was measured in a Hitachi U-1100 spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan). One enzymatic unit was defined as the enzyme quantity needed to increase absorbance at 420 nm in 0.01 in the assay conditions.

The effect of protease inhibitors was determined after pre-incubation of the enzyme preparations with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 5 mM EDTA or 2 mM *p*-chloromercury benzoate (*p*CMB) for 10 min at 25°C.

3.2.3.6 Effect of thermal treatments on proteolytic activity

Crude enzymes were incubated in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 at either 60°C for 30 min, 75 or 100°C for 20 s, or 142°C for 10s, and then residual activity was measured as described above.

3.2.3.7 Milk coagulation assay

Crude enzymes were filtered through 0.22 µm membranes (Millipore, Bedford, TX, USA) and mixed with UHT milk in sterile tubes to reach a final activity of 5 U/ml. Tubes were incubated at 25°C for up to 5 days. Milk coagulation was observed by

visual inspection at different times. As a control, the enzymes were inactivated by heating at 100°C for 15 min.

3.2.4 Results and discussion

3.2.4.1 Psychrotrophic bacterial counts

The counts of psychrotrophic bacteria showed values between 4.9 and 7.8 log cfu/ml, and 5.3 to 7.2 log cfu/ml, for refrigerated raw milk samples collected from the thermal container of the milk truck and milk storage silo, respectively. The counts of psychrotrophic bacteria presented a similar pattern to samples collected at the insulated thermal container or at the storage silo with lower values in the fifth month, i.e. July, coinciding with winter in Southern Brazil (Figure 1).

Hantsis-Zacharov and Halpern (2007) observed psychrotrophic counts between 3 and 4 log cfu/ml in milk samples collected through 10 months in 4 farms in Israel. They found that psychrotrophic counts varied during seasons and showed similar dynamics of populations of mesophilic bacteria. The counts observed in the present study were similar to those described by Burdová *et al.* (2002) for milk samples from Western Europe, but higher to those found by Silva (1998) in milk samples at industrial silos milk plant, which varied between 3.4 and 5.9 log cfu/ml, and by Pinto *et al.* (2006), which varied between 1.7 and 6.1 log cfu/ml, 2.1 and 5.4 log cfu/ml, and 4.9 and 5.8 log cfu/ml, for samples collected at dairy farmers' individual and collective milk containers and at a milk plant silo, respectively. The microflora made up of psychrotrophic bacteria, generally producing thermo-resistant enzymes, is the main cause of spoilage of refrigerated raw milk samples (Sorhaug and Stepaniak 1997). Raw milk from dairy farms, vendors and dairy processors in India showed psychrotrophic counts of 3.66, 4.96 and 5.03 log cfu/ml, respectively (Kumerasan *et al.* 2007). Stability studies indicate that reducing storage temperature from 7°C to 2°C significantly reduces the psychrotrophic growth and proteolytic and lipolytic activities.

Although total counts alone is a sufficient indicator of hygienic quality of raw milk, determination of psychrotrophic counts as a complementary indicator can contribute to the explanation of seasonal problems in milk processing (Cempírková 2002).

3.2.4.2 Identification of prevailing bacteria

A total of 249 colonies were obtained from plates incubated at 7°C. Psychrotrophic isolates showing proteolytic activity on milk agar plates were selected and identified. The 142 psychrotrophic bacterial isolates identified in this study are listed in Table 1. From these, 90% were Gram-negative and 10% were Gram-positive. The predominance of Gram-negative bacteria, isolated in refrigerated raw milk samples, is in accordance to results obtained by other researchers (Cousin 1982; Muir 1996; Eneroth *et al.* 2000; Pinto *et al.* 2006).

Among the identified psychrotrophic Gram-negative bacteria, 82% were glucose-fermenting, from which the predominant species were *Enterobacter* spp. (30%), *Escherichia coli* (16.4%), and *Klebsiella* spp. (12.5%). The presence of psychrotrophic *Enterobacteriaceae* in milk has been already described (Suárez and Ferreirós 1991). Most of the *Enterobacteriaceae* strains (73 out of 75) isolated from milk and dairy products in a previous study were psychrotrophic, with the exception of *Enterobacter cloacae* strains (Wessels *et al.* 1989). *Enterobacteriaceae* were predominant psychrotrophs in Spanish fresh ewe's cheese made from raw milk, and more than 73% produced proteolytic and lipolytic enzymes at 7°C (Santos *et al.* 1996).

The *Enterobacteriaceae* family is mainly represented by the genus *Klebsiella*, *Escherichia*, *Citrobacter* and *Enterobacter*, being strains of *Enterobacter* and *Klebsiella* do not considered from fecal origin. *E. coli* is the leading coliform, being an indicator of fecal contamination in processed food. The presence of elevated coliform counts in raw milk may increase the possibility to find it in derived milk products, which represents a hazard to food. In this regard, a study on microbiological quality of pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil, indicated that among 208 strains of *E. coli* isolated, 46 (22.1%) were serologically classified as enteropathogenic (Silva *et al.* 2001).

Among the non-fermentative Gram-negative bacteria (18%), the genus *Pseudomonas* was prevalent, even though corresponding to around 8% of the total identified Gram-negative bacteria. The predominance of the genus *Pseudomonas* as contaminant in refrigerated raw milk has been described (Martins *et al.* 2006). Eneroth *et al.* (2000) observed a higher frequency of isolation of the genera *Pseudomonas* (72 to 77%) in raw milk samples, in pasteurized milk samples, and in dairy plants room temperature samples.

A study on diversity among 264 psychrotrophic isolates from dairy farms in Israel showed that the dominant classes were γ -Proteobacteria (genera *Pseudomonas* and *Acinetobacter*), Bacilli (genera *Leuconostoc* and *Lactococcus*) and Actinobacteria (genus *Microbacterium*). Most isolates have demonstrated either lipolytic or both lipolytic and proteolytic activities, but few only proteolytic activity (Hantsis-Zacharov and Halpern 2007). Milk samples from farms, silos, and trucks of Finland yielded 180 colonies obtained at 7°C (Munsch-Alatossava and Alatossava 2006). Among the psychrotrophic isolates showing spoilage features, a large amount was identified as *P. fluorescens*, and pseudomonads seemed to constitute the dominant group of spoiling psychrotrophs. Those authors also found some strains of *Acinetobacter*, *Burkholderia* and *Stenotrophomonas* genera.

It has been suggested that species of *Acinetobacter*, *Burkholderia*, as emergent hazardous bacteria to human health (Moore *et al.* 2001). The excessive response of genetically predisposed people to pathogenic psychrotrophic bacteria has been hypothesized as causative for Crohn's disease (Hugot *et al.* 2003). Members of the *Burkholderia* genus are among the most abundant bacteria in the environment, presenting a high versatility to survive and grow at highly diverse conditions. Thus, these microorganisms may contaminate raw milk either through soil contamination of the udder or by dust contamination of bulk tanks on the farm. Some strains can be opportunistic or obligate pathogens causing human, animal or plant diseases (Compant *et al.* 2008; Mahenthiralingam *et al.* 2008).

3.2.4.3 Proteolytic activity

Among the isolated psychrotrophic bacteria, 25 showed halos above 10 mm in milk agar plates, being selected for quantification of proteolytic activity with azocasein. These strains also showed proteolytic activity in milk agar plates incubated at 7°C. The proteolytic activities of the strains were observed in casein broth medium. Most of the strains showed azocaseinolytic activity inferior to 10 U/ml. The strains that presented activity superior to 20 U/ml are described in Table 2. One *Burkholderia cepacia* strain showed the higher activity among the isolated strains. Two *Klebsiella oxytoca* strains were observed among the more proteolytic bacteria. A highly proteolytic *K. oxytoca* strain was previously selected among diverse psychrotrophic bacteria isolated from another dairy plant in this same State (Tondo *et al.* 2004). The enzyme produced by

such microorganism showed high resistance to conventional heat treatment employed in pasteurization and UHT. Psychrotrophic *Enterobacteriaceae* strains isolated from raw milk in the present study were largely non-proteolytic on milk agar medium. This is in agreement to that observed by Wessels *et al.* (1989), which showed that most psychrotrophic *Enterobacteriaceae* strains isolated from milk and dairy products were non-proteolytic on milk agar, although limited numbers of *E. cloacae* and *K. oxytoca* strains were positive at both 25°C and 7°C.

The enzymes produced by these psychrotrophic isolates were mainly inhibited by EDTA, but weakly by PMSF or pCMB (Table 2). The inhibition by EDTA indicates that the enzymes belong to the metalloprotease type of proteinases. This result agrees with the fact that most of *Pseudomonas* spp. and other milk psychrotrophs produce a single type of monomeric neutral metalloprotease, with pH optima of 6.5-8.0 (Rajmohan *et al.* 2002; Nielsen 2002; Chen *et al.* 2003; Stepaniak 2004).

The heat stability of the enzymes was tested after incubation for 30 min at 60°C. The results are showed in Table 3. Protease activity of *K. oxytoca* strain 8B3 was very stable after heat treatments, maintaining at least 60% its initial activity. None of the crude enzymes tested showed total loss of activity, but a significant decrease was observed for *Aeromonas* sp. The elevated heat resistance to conventional treatments used in milk processing resembles the proteolytic activities of *P. fluorescens* P-26 (Uplacksh *et al.* 1994) and *K. oxytoca* (Tondo *et al.* 2004).

3.2.4.4 Milk coagulation

The addition of crude proteases to sterile milk resulted in extensive coagulation after 5 days at room temperature. This effect was observed for all strains listed in Table 2, indicating that these psychrotrophic bacteria can effectively cause spoilage in milk and dairy products.

Microbial proteases from psychrotrophic bacteria have been related to coagulation or gelation of milk proteins, but relatively few studies have demonstrated such defects by direct addition of proteases to milk samples (Datta and Deeth 2003; Tondo *et al.* 2004). UHT milk produced with low quality milk (psychrotrophic counts 4.7 log cfu/ml, proteolytic activity 0.71 U/ml) showed an increase of 74.7% in soluble N values after 180 days versus 33.8% observed for high quality milk (3.2 log cfu/ml,

0.42 U/ml). In addition, the number and concentration of peptides determined by RP-HPLC were lower in the high quality milk (Topçu *et al.* 2006).

3.2.5 Conclusion

Gram-negative bacteria were isolated with higher frequency among the proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk of Southern Brazil. The refrigeration of raw milk, for prolonged periods of time, at the dairy farm or at the dairy plant, can enhance its quality loss considering the possibility of selection of proteolytic psychrotrophic bacteria. The potential risk of these psychrotrophic bacteria to quality milk reinforce the relevance to monitor these microorganisms in milk and dairy products.

3.2.6 Acknowledgments

This work was supported by CNPq and CAPES (Brazil).

3.2.7 References

- Burdová O, Baranová M, Lauková A, Rözanska H, Rola JG (2002) Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. *Bulletin of the Veterinary Institute Pulawy* **46** 325-329.
- Cempírková R (2002) Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. *Veterinary Medicine Czech* **47** 227-233.
- Chen L, Daniel RM, Coolbear T (2003) Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal* **13** 255-275.
- Compant S, Nowak J, Coenye T, Clément C, Barka EA (2008) Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiology Reviews* **32** 607-626.
- Cousin MA (1982) Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection* **45** 172-207.
- Datta N, Deeth HC (2003) Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *LWT-Food Science and Technology* **36** 173-182.

- Eneroth A, Ahrné S, Molin G (2000) Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. *International Journal of Food Microbiology* **57** 99-106.
- Eneroth A, Christiansson A, Brendehaug J, Molin G (1998) Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *International Dairy Journal* **8** 829-834.
- Hantsis-Zacharov E, Halpern M (2007) Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic activities. *Applied and Environmental Microbiology* **73** 7162-7168.
- Harwalkar VR, Cholette H, McKellar RC, Emmons DB (1993) Relation between proteolysis and astringent off-flavor milk. *Journal of Dairy Science* **76** 2521-2527.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (2000) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, pp 787. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bigen E, Cézard JP (2003) Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* **362** 2012-2015.
- Koka R, Weimer BC (2000) Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. *Journal of Applied Microbiology* **89** 280-288.
- Kumerasan G, Annalvilli R, Sivakumar K (2007) Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. *Journal of Applied Science Research* **3** 1383-1387.
- MacFaddin JF (2000) *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, pp 912. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Mahenthalingam E, Baldwin A, Dowson CG (2008) *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. *Journal of Applied Microbiology* **104** 1539-1551.
- Martins ML, Pinto CLO, Rocha RB, Araujo EF, Vanetti MCD (2006) Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology* **111** 144-148.
- Moore JE, McIlhatton B, Shaw A, Murphy PG, Elborn JS (2001) Occurrence of *Burkholderia cepacia* in foods: clinical implications for patients with cystic fibrosis. *Journal of Food Protection* **64** 1076-1078.
- Muir DD (1996) The fresh-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. *Journal of the Society of Dairy Technology* **49** 24-32.

- Munsch-Alatossava P, Alatossava T (2006) Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research* **161** 334-346.
- Nicodème M, Grill JP, Humbert G, Gaillard JL (2005) Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. *Journal of Applied Microbiology* **99** 641-648.
- Nielsen SS (2002) Plasmin system and microbial proteases in milk: characteristics, roles, and relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** 6628-6634.
- Oliveira JS, Parmelee CE (1976) Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. *Journal of Milk Food Technology* **39** 269-272.
- Pinto CLO, Martins ML, Vanetti MCD (2006) Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **26** 645-651.
- Rajmohan S, Dodd CE, Waites WM (2002) Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of Applied Microbiology* **93** 205-213.
- Santos JA, López-Díaz TM, García-Fernández MC, García-López ML, Otero A (1996) Characterization and extracellular activity of psychrotrophic bacteria isolated from Villalón cheese (fresh variety of Spanish sheep's milk cheese). *International Journal of Food Microbiology* **33** 301-306.
- Silva, PHF da; Almeida, MCF. Estabilidade térmica do leite. Revista do Instituto Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 53, n. 304, p. 157-163, jul/ago. 1998.
- Silva ZN, Cunha AS, Lins MC, Carneiro LAM, Almeida AC, Queiroz ML (2001) Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. *Journal of Public Health* **35** 375-379
- Sørhaug T, Stepaniak L (1997) Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology* **8** 35-37.
- Stepaniak L (2004) Dairy enzymology. *International Journal of Dairy Technology* **57** 153-171.
- Suárez B, Ferreirós CM (1991) Psychrotrophic flora of raw milk: resistance to several common disinfectants. *Journal of Dairy Research* **58** 127-136.
- Thys RCS, Lucas FS, Riffel A, Heeb P, Brandelli A (2004) Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. *Letters in Applied Microbiology* **39** 181-186.

- Tondo EC, Lakus FR, Oliveira FA, Brandelli A (2004) Identification of heat stable protease of *Klebsiella oxytoca* isolated from raw milk. *Letters in Applied Microbiology* **38** 146-150.
- Topçu A, Numanoglu E, Saldamli I (2006) Proteolysis and storage stability of UHT milk produced in Turkey. *International Dairy Journal* **16** 633-638.
- Uplacksh VK, Mathur DK, Malik RK (1994) Thermal resistance of partially purified proteinase of *Pseudomonas fluorescens* P-26. *Journal of Applied Bacteriology* **76** 356-360.
- Wessels D, Jooste PJ, Mostert (1989) Psychrotrophic, proteolytic and lipolytic properties of Enterobacteriaceae isolated from milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **9** 79-83.

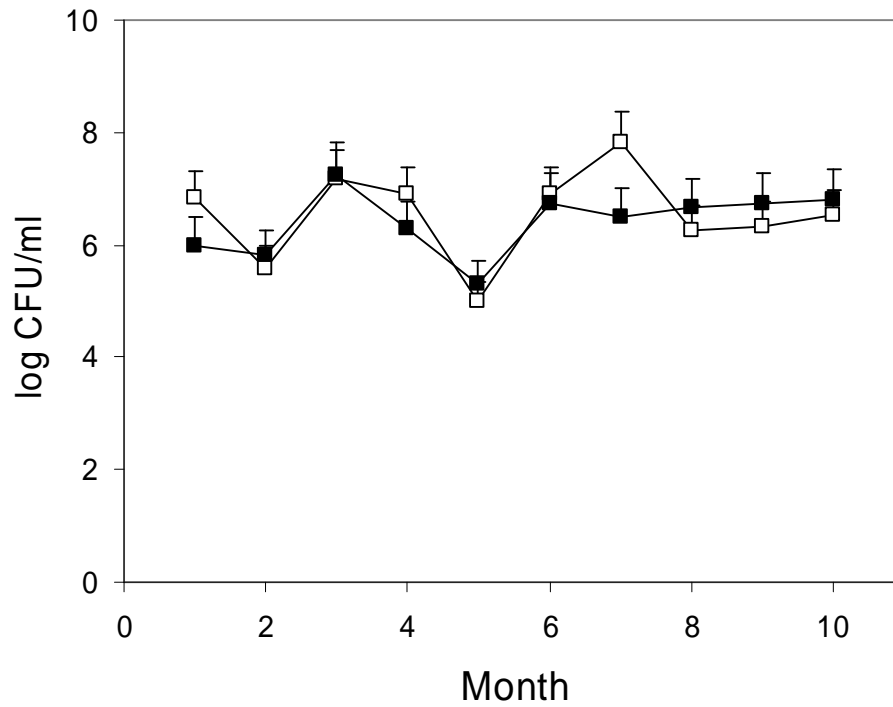


Figure 1. Counts of psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated bovine milk from March (month no. 1) to December 2006. () Samples collected at the insulated thermal container of the milk delivery truck; (■) Samples collected at the industrial milk plant storage silo.

Table 1. Psychrotrophic microorganisms isolated of raw milk in Southern Brazil

Microorganisms	Truck	Silo	Total
Gram-negative (total)	67	61	128
<i>Escherichia coli</i>	10	11	21
<i>Aeromonas</i> sp.	2	1	3
<i>Citrobacter freundii</i>	2	3	5
<i>Citrobacter</i> sp.	2	0	2
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	3	0	3
<i>Klebsiella</i> sp.	0	1	1
<i>Klebsiella ozanae</i>	1	1	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	1	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	7	13
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	3	7
<i>Enterobacter asburiae</i>	5	1	6
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2	4	6
<i>Enterobacter gergoviae</i>	5	4	9
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	3	6
<i>Enterobacter sakazaki</i>	2	2	4
<i>Serratia marcescens</i>	1	1	2
<i>Serratia plymuthica</i>	2	0	2
<i>Proteus mirabilis</i>	1	3	4
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	4	9
<i>Burkholderia cepacia</i>	2	2	4
<i>Burkholderia gladioli</i>	1	0	1
<i>Brevundimonas diminuta</i>	1	0	1
<i>Cedecia lapagei</i>	1	0	1
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	0	1
<i>Arizona hinshawii</i>	1	0	1
<i>Bordetella trematum</i>	1	4	5
<i>Butiauxiella agrestis</i>	1	0	1
<i>Erwinia chrysantemi</i>	0	2	2
<i>Kluivera ascorbata</i>	0	1	1
<i>Morganella morganii</i>	0	1	1
<i>Moraxella</i> sp.	1	1	2
Gram-positive (total)	7	7	14
<i>Enterococcus</i> sp.	2	3	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	0	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	3	3
<i>Micrococcus</i> sp.	1	1	2
<i>Bacillus</i> sp.	2	0	2
TOTAL	74	68	142

Table 2 Isolated bacteria that presented higher proteolytic activities.

Strain	Activity (U/ml)	Inhibition (%)		
		EDTA	PMSF	<i>p</i> CMB
<i>Burkholderia cepacia</i> 1A4	80 ± 11	85	12	8
<i>Klebsiella oxytoca</i> 8B3	55 ± 20	90	25	3
<i>Burkholderia cepacia</i> 2A7	63 ± 2	92	0	6
<i>Aeromonas</i> sp.10B7	35 ± 12	92	28	12
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1A5	53 ± 2	96	14	6

Table 3. Heat resistance of proteolytic enzymes of selected psychrotrophic bacteria isolated from raw milk

Strain	Residual Activity (%)			
	60°C/30 min	75°C/20s	100°C/20s	142°C/10s
<i>Burkholderia cepacia</i> 1A4	45	82	47	36
<i>Klebsiella oxytoca</i> 8B3	88	100	91	60
<i>Burkholderia cepacia</i> 2A7	48	55	42	15
<i>Aeromonas</i> sp.10B7	22	38	25	10
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1A5	92	98	75	47

3.3 ARTIGO 3

3.3 Proteolytic activity of a psychrotrophic *Burkholderia cepacia* strain isolated from refrigerated raw milk

3.3.1 Abstract

The proteolytic activity of a psychrotrophic strain of *Burkholderia cepacia* isolated from refrigerated raw milk was characterized. The proteolytic activity on azocasein showed maximum activity at pH 6-7 and decrease at acid and alkaline pHs. The enzyme showed relative thermal stability in the range 40-55°C during 25 min, maintaining at least 80% its initial activity at 40°C. Milk coagulation assay showed that the crude protease from *B. cepacia* caused coagulation in day 2 for skimmed milk, whereas coagulation was observed from day 5 for whole milk. The adherence of this strain to stainless steel was evaluated, and the substrata had around 10^7 cfu/cm², regardless the different immersion time evaluated. The strain 1A4 showed elevated proteolytic activity at pH 6-7 and 40°C, high milk coagulating-activity, and elevated capability to adhere to stainless steel. These results indicate that *B. cepacia* may represent a potential hazardous to milk and dairy products.

Key words: adherence, *Burkholderia cepacia*, milk spoilage, proteolysis

3.3.2 Introduction

Milk refrigeration at the farm and during transport had an important impact on the microbiological quality of milk, by decreasing the presence of mesophilic bacteria, the main responsible for acidification. However, the refrigeration temperature at the milk farms in Brazil often ranges between 5 and 10°C, which configure a sub-refrigeration, contributing to growth of psychrotrophic microorganisms (Cousin 1982; Enerhot et al., 1998). Although most psychrotrophics are destroyed by the conventional thermal treatments employed at food industry, such treatments have minor effects on their enzymes (Tondo et al., 2004). The intracellular enzymes and those associated with the cell wall can be released to the milk when the bacterial lysis takes place, after the thermal treatment and, in this way, together with the extracellular enzymes, hydrolyze milk components (Chen et al., 2003). In this context, a major factor that influence the quality of dairy products produced with raw milk stored at 7°C or less for prolonged periods is the multiplication of psychrotrophic microbiota producing thermostable enzymes (Sorhaug and Stepaniak, 1997). Among the harmful effects caused by psychrotrophic bacteria are the milk gelation and deterioration of sensory characteristics (Datta and Deeth, 2003; Hill, 1988; Shah, 1994).

In addition, the elevated growth of psychrotrophic microorganisms may generate an adequate substratum for adherence of bacteria resulting in biofilms (Costerton et al., 1999; Kusumaningrum et al., 2003). Gram-negative bacteria like *Pseudomonas* are largely recognized by their capability to produce large amounts of exopolysaccharides, which contribute to adhesion and biofilm growth (Drenkard and Ausubel, 2002). The cell physical interaction with a surface through extracellular materials like polysaccharides or proteins, produced by the bacterium, withstands biofilm formation (Carpentier, 1997). Thus, microorganisms continue to grow, generating a highly appropriate substratum for the adherence of other bacteria, including the pathogenic ones (Costerton et al. 1999). This explains why surfaces of equipment and tools used in food production are focuses of bacterial contamination (Hola and Thorpe, 1999); besides, organisms are more resistant to the action of chemical and physical agents (Sinde and Carballo, 2000). Bacterial adherence to surfaces depends on several factors, such as nature and free energy, hydrophobicity, asperity, chemical composition, and the presence of proteins on the surface (Carballo et al., 1992; Hood and Zotolla, 1997). It is

known that the surface chemical composition influences on adhesion and bacterial proliferation (Katsikogianni and Missirlis, 2004).

The aim of this work was to evaluate the proteolytic activity of a *B. cepacia* strain isolated from refrigerated raw milk, and its milk-coagulating capability and adhesion to stainless steel surfaces.

3.3.3 Materials and methods

3.3.3.1 Microorganism

A psychrotrophic and proteolytic *Burkholderia cepacia* strain 1A4 isolated from refrigerated raw milk was used. The strain was maintained in BHI broth containing 20% (v/v) glycerol at -20°C. The bacterium was cultivated twice in TSB at 37°C and then plated in milk agar plates before experiments.

3.3.3.2 Production of protease

A colony from milk agar plate was inoculated in mineral medium (0,5 g/L NaCl, 0,4 g/L K₂HPO₄, 0,3 g/L KH₂PO₄), containing 10 g/L casein, pH adjusted to 7.0. The production of protease was in 250 ml flasks containing 50 ml of the medium by incubation for 72h at 37°C in orbital shaker. The culture was centrifuged at 10,000 x g for 10 min and the supernatant was used as crude enzyme.

3.3.3.3 Proteolytic activity

Proteolytic activity was assayed using azocasein (Sigma, St. Louis, MO, USA) as substrate (Thys et al. 2004). The enzyme solution (100 µl) was mixed with 100 µl of 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7. Then, 100 µl of 10 mg/ml azocasein was added. The mixture was incubated for 60 min at 37°C and the reaction was stopped by adding 500µl trichloroacetic acid (TCA) 30% (w/v). After centrifugation at 10.000 g for 5 min, 800µl of supernatant were mixed with 200µl of 1.8 M NaOH. The absorbance at 420 nm was measured in a Shimadzu UV1240 spectrophotometer (Shimadzu, Tokyo,

Japan). One enzyme unit was defined as the amount that caused an increase of 0.01 in the absorbance at 420 nm in the assay conditions (Thys et al. 2004).

3.3.3.4 Characterization of proteolytic activity

The effects of temperature and pH on the proteolytic activity were determined. Thermal stability was evaluated by pre-incubation of the enzyme for up to 25 min at 40°C, 45°C and 50°C. The assay for optimum pH was developed using 0.1 mol/L of either sodium citrate buffer (pH 4 and 5), sodium phosphate buffer (pH 6, 7, and 8), or sodium carbonate buffer (pH 9 and 10).

3.3.3.5 Milk coagulation

B. cepacia 1A4 was grown in TSB for 24h at 37 °C. The culture was centrifuged at 10,000 x g for 5 min and the supernatant was filtered through a 0.22 µm membrane. Different amounts of this crude enzyme preparation (80 U/ml protease) were added to either whole or skim UHT milk. These samples were incubated at room temperature for up to 7 days. Milk coagulation was visually inspected at regular intervals of 24 h. Aliquots of thermally inactivated enzyme (100°C/10 min) served as controls.

Aliquots of the samples were adjusted to pH 4.6 with 2 mol/L HCl, followed by centrifugation at 11,600 x g for 20 min to precipitate caseins and denatured soluble whey proteins. The concentration of amino acids in the resulting supernatants was measured by the ninhydrin method (Moore and Stein 1954).

3.3.3.6 Adherence to stainless steel

Stainless steel AISI 316 (Metalbras, Porto Alegre, Brazil) coupons of 2 x 2 cm and 0.1 cm thick were used. Before the adhesion tests, coupons were degreased with a neutral detergent (3%, v/v) for one hour, rinsed with 70% (v/v) ethanol, and then washed with distilled water. After that, the coupons were dried at 60°C for two hours and autoclaved at 121°C, for 15 min in sealed tubes (Rossoni and Gaylarde 2000).

The coupons were immersed in 10 ml of TSB containing 8 log cfu ml⁻¹ of *B. cepacia* 1A4. Three coupons of stainless steel were immersed in the cultures for 15, 30 and 60 min, without shaking, at room temperature (Kusumaningrum et al., 2003). After

that, the coupons were washed with PBS (phosphate buffer saline; pH 7.2) to remove the poorly adhered cells. The stainless steel coupons were immersed in 10 ml of PBS before sonication process using a bath sonicator (UNIQUE USC 700) with ultrasonic frequency of 40 kHz. Each coupon was sonicated for 2 periods of 10 min, aiming the release of adhered cells from coupons surfaces.

Decimal dilutions of PBS containing each sonicated coupons were made, and 20 μ l of each dilution were plated in TSA. The plates were incubated for 24 hours at 37°C and the cfu cm^{-2} were determined (Hood and Zotolla, 1997). All the counts were made in triplicate and each experiment was repeated twice.

3.3.3.7 Biofilm growth assay

The capability of *B. cepacia* 1A4 to form biofilms was determined using the microplate assay involving crystal violet staining (Burton et al., 2007). A 20 μ l inoculum of *B. cepacia* (105 cfu/ml) was added to 280 μ l TSB in 96-well polystyrene microplates (Nunc, Rockville, USA). Microplates were incubated at 4, 10, or 25°C for up to 96 h. After incubation, the medium was gently removed and microplates were washed three times with distilled water. Microplates were stained for 15 min with a 4 mg/mL crystal violet solution, washed three times with distilled water, and air-dried for 60 min. The stain was then dissolved in 400 μ l of 95% (v/v) ethanol and the absorbance at 570 nm was measured (O'Tolle and Kolter, 1998).

3.3.4 Results and discussion

3.3.4.1 Proteolytic activity of *B. cepacia*

B.cepacia 1A4 was grown in casein broth. The proteolytic activity increased linearly for up to 72 h, when reached maximum activity of 85.9 U/ml. Notable activity was also detected at 24 h (48 U/ml) and 48 h (72.4 U/ml).

The investigation for the optimum pH for *Burkholderia cepacia* proteolytic activity, was made in the range of pH 4 to 10. Maximum activity was observed between pH 6 and 7, and a reduced level of activity under more acidic and alkaline pHs was observed (Fig.1).

The effect of temperature on the activity of *B. cepacia* protease was evaluated. The maximum proteolytic activity was observed within the range 35-45°C, with accentuated decrease outside this range (Fig. 2A). The thermal stability, evaluated within 25 min, at the temperatures of 40°C, 45°C, and 50°C, showed different behavior. When the enzyme was incubated at 40°C, a high level of activity was observed within the established time maintaining at least 80% of the initial activity (Fig. 2B). By regression analysis, the residual activity correlates with time through a cubic equation was observed ($R^2 = 0.994$). At the temperature of 45°C, the enzyme showed a linear reduction of its activity during the incubation time (Fig. 2B), with a $R^2 = 0.913$. At 50°C, there was a rapid reduction of the activity within five minutes, remaining about 52% of the initial activity (Fig. 2B). However, the continued incubation caused little additional inactivation and at least 40% residual activity was observed. A polynomial relationship was observed with a $R^2 = 0.981$.

Therefore, at the temperature of 40°C, the enzyme showed higher stability throughout the established time. Even at higher temperatures, about 40% residual activity was detected indicating that the proteolytic activity of *B. cepacia* could resist to thermal treatments and be harmful to milk proteins during processing and storage.

3.3.4.2 Milk coagulation

The evaluation of the effect of *B. cepacia* protease on milk coagulation was carried out throughout consecutive seven days, by visual inspection of skimmed and whole UHT milk samples artificially spoiled with the enzyme. The results are shown in Table 1. The enzyme added to the skimmed milk, independently of quantity (0.8, 1.6, or 4 U/mL), promoted milk coagulation from the day 2, while the milk samples with inactivated enzyme (control group) did not coagulated. Concerning the whole milk samples, coagulation was also observed, but it started from the fifth day, while control samples did not coagulate until the seventh day of the evaluation. The fact that proteolysis occurs with higher velocity in skimmed milk samples in relation to whole UHT milk samples was also observed by Garcia-Risco et al. (1999), indicating that the proteolysis extension is influenced by the fat level present in milk, in accordance to researches done by Lopez-Fandiño et al. (1993). The concentration of free amino acids increased during incubation time, whereas the values were nearly constant for mock incubated samples (Fig. 3). These results indicate that the enzyme effectively

hydrolyzed milk proteins and an increased amount of free amino acids and soluble peptides are present in the milk serum. This suggests that the enzyme continues to hydrolyze proteins after coagulation.

Gelation/gelatinization is one of the main problems that affect UHT milk quality. The UHT process promotes the increase of milk viscosity, but not its coagulation, since heating time is short. During storage, milk viscosity increases until there is gel formation (gelatinization) showing that the product is not proper for consumption anymore. The mechanisms involved in the gelatinization phenomenon comprise basically alteration of milk proteins, association and dissociation of calcium ions, formation of polymers derived from Maillard reaction, formation and dissociation of κ -casein complex with whey proteins, and the participation of innate milk enzymes (plasmin) and proteases of psychrotrophic bacteria (Hill, 1988; Chen et al. 2003). The gelatinization phenomenon is induced, initially, by the action of thermal-resistant enzymes (proteases) present, naturally, in the milk or derived from bacteria, mainly those of the psychrotrophic group (Tondo et al. 2004). These enzymes present the ability of degrading caseins and promote the aggregation of micelles. When the psychrotrophic bacteria counts reaches a level about 10^6 CFU/mL, protease production by such microorganisms is able to degrade considerable quantities of casein. According to Shah (1994), UHT milk samples, stored at 30°C, showing protease levels higher than one nanogram/ml can present a bitter flavor and undergone gelatinization. Degrading action of proteases from psychrotrophic microorganisms is distinct among milk protein fractions. κ -casein is the most susceptible to the action of these enzymes, while whey proteins are relatively protease-resistant. Koka and Weimer (2000) reported that the action of these psychrotrophic bacteria, mainly the proteases from the *Pseudomonas* spp., is similar to that presented by chymosin, an enzyme employed in enzymatic coagulation for cheese production. Faster appearance of the phenomenon of gelatinization in UHT milk is associated to the severity of heating process and to the levels of contamination due to the presence of psychrotrophic microorganisms.

3.3.4.3 Adherence capacity and biofilm formation

The capacity of *B. cepacia* 1A4 to adhere to stainless steel was investigated. The adherence levels on the stainless steel coupons were around 10^7 CFU/cm², independent

from the different immersion times evaluated ($P < 0.05$). The values observed for 15, 30, and 60 min were 2.56×10^7 , 4.0×10^7 and 1.52×10^7 CFU/cm², respectively.

Microbial adherence to surfaces can occur directly through contact with contaminated materials or indirectly through bacterial particles present in the atmosphere, when the process of bacterium adhesion to the substratum is initialized (Kusumaningrum et al., 2003). Some studies report that bacterial adhesion consists in a cell attraction by the surface, followed by adsorption and later by adherence by the bacterium cell (Katsikogianni and Missirlis, 2004). Surfaces with more free energy, such as steel and glass, are less hydrophobic. These surfaces generally allow less bacterial adherence than hydrophobic surfaces, such as teflon, nylon, and the vast variety of polymers, among which polyethylene (Sinde and Carballo, 2000). However, elevated counts of *B. cepacia* 1A4 were found on stainless steel substratum, indicating that this strain has a high capability to adhere and potentially form biofilms.

The biofilm formation by *B. cepacia* was evaluated by crystal violet staining of extracellular polysaccharides. This strain showed an increased biofilm formation on microplates, in a temperature-dependent manner (Fig. 4). Although low absorbance values were observed at 4°C, it suggests that this bacteria could adhere and to form biofilms even at refrigeration temperatures. This strain of *B. cepacia* showed similar capability than other recognized food spoilage bacteria like *Pseudomonas putida*, *Citrobacter freundii* and *Proteus vulgaris*, to form biofilms at low temperatures (Michaels et al., 2003).

Psychrotrophic gram-negative bacteria have been related to deleterious effects on milk, but research has been mostly focused on *Pseudomonas* spp. (Enerhot et al., 1998; Martins et al. 2006). There is growing evidence that other genus may have similar relevance (Tondo et al., 2004) by producing strong proteolytic activity. In addition, the potential for biofilm formation increases their resistance to usual sanitization and cleaning procedures, which represent a risk to food industry.

3.3.5 Conclusion

Burkholderia cepacia, isolated from refrigerated raw milk, presents a high level of proteolytic activity, maximized at pHs from 6 to 7 and at 40°C. This enzyme caused coagulation of skimmed and whole milk samples within 2 and 5 days, respectively. *B. cepacia* showed a high level of adherence to stainless steel and capability to form

biofilms even at refrigeration temperatures, which may represent a hazard to food industry. This is a concern for milk industry because the potential contamination of equipment and tools, since stainless steel is widely used.

3.3.6 References

- BURTON, E., YAKANDAWALA, N., LO VETRI, K., MADHYASTHA, M.S. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 1-4 (2007)
- CARBALLO, J., FERREIROS, C.M., CRIADO, M.T. Factor analysis in the evaluation of the relationship between bacterial adherence to biomaterials and changes in free energy. *J. Biomat. Applicat.* 7, 130-141 (1992)
- CARPENTIER, B. Sanitary quality of meat chopping board surfaces: a bibliographical study. *Food Microbiol.* 14, 31-37 (1997)
- CHEN, L., DANIEL, R.M., COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Int. Dairy J.* 13, 255-275 (2003)
- COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322 (1999)
- COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *J. Food Protec.* 45, 172-207 (1982)
- DATTA, N., DEETH, H.C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *LWT Food Sci Technol* 36, 173-182 (2003)
- DRENKARD, E., AUSUBEL, F.M. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416, 695-696 (2002)
- ENEROTH, A, CHRISTIANSSON, A., BRENDENHAUG, J., MOLIN, G. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *Int Dairy J* 8, 829-834 (1998)
- GARCIA-RISCO, M.R., RAMOS, M., LÓPEZ-FANDIÑO, R. Proteolysis, protein distribution and stability of UHT milk during storage at room temperature. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1171-1178 (1999)
- HILL, A. Quality of ultra-high-temperature processed milk. *Food Technol.* 12, 92-97 (1988)
- HOLAH, J.T., THORPE, R.H. Cleanability in relation to bacterial retention on unused abraded domestic sink materials. *J. Appl. Microbiol.* 69, 599-608 (1999)

- HOOD, S.K., ZOTTOLA, E.A.A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *Int. J. Food Microbiol.* 37, 145-153 (1997)
- KATSIKOIANNI, M., MISSIRLIS, Y.F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial and techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur. Cells Mat.* 8, 37-57 (2004)
- KOKA, R., WEIMER, B.C. Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. *J. Appl. Microbiol.* 89, 280-288 (2000)
- KUSUMANINGRUM, H.D., et al. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 227-236 (2003)
- LÓPEZ-FANDIÑO, R., OLANO, A., CORZO, N., RAMOS, M. Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. *J. Dairy Res.* 60, 339-347 (1993)
- MARTINS, M.L., PINTO, C.L.O., ROCHA, R.B., ARAÚJO, E.F., VANETTI, M.C.D. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotropic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 144-148 (2006)
- MICHAELS, B., AYERS, T., CELIS, M., GANGAR, V. Inactivation of refrigerator biofilm bacteria for application in the food service environment. *Food Service Technol.* 1, 169-179 (2003)
- MOORE, S., STEIN, W.H. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 211, 907-913 (1954)
- O'TOOLE, G.A., KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30, 295-304 (1998)
- ROSSONI, E.M.M., GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 81-85 (2000)
- SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft*, 49, 432-437 (1994)
- SINDE, E., CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol.* 17, 439-447 (2000)
- SØRHAUG, T., STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 35-37(1997)

THYS, R.C.S.; LUCAS, F.S.; RIFFEL, A.; HEEB, P.; BRANDELLI, A. Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. Lett. Appl. Microbiol. 39, 181–186 (2004)

TONDO, E.C.; LAKUS, F.R.; OLIVEIRA, F.A.; BRANDELLI, A. Identification of heat stable protease of *Klebsiella oxytoca* isolated from raw milk. Lett. Appl. Microbiol. 38, 146-150 (2004)

Table 1. Coagulation of skimmed and whole UHT milk samples by *Burkholderia cepacia* protease

Milk samples	Enzyme (U/ml)	Days						
		1	2	3	4	5	6	7
	Control*	-	-	-	-	-	-	-
Skimmed	4	-	+	+	+	+	+	+
	1.6	-	+	+	+	+	+	+
	0.8	-	+	+	+	+	+	+
	Control*	-	-	-	-	-	-	-
Whole	4	-	-	-	-	+	+	+
	1.6	-	-	-	-	+	+	+
	0.8	-	-	-	-	+	+	+

*Control, 4 U/ml enzyme inactivated at 100° C for 10 min.

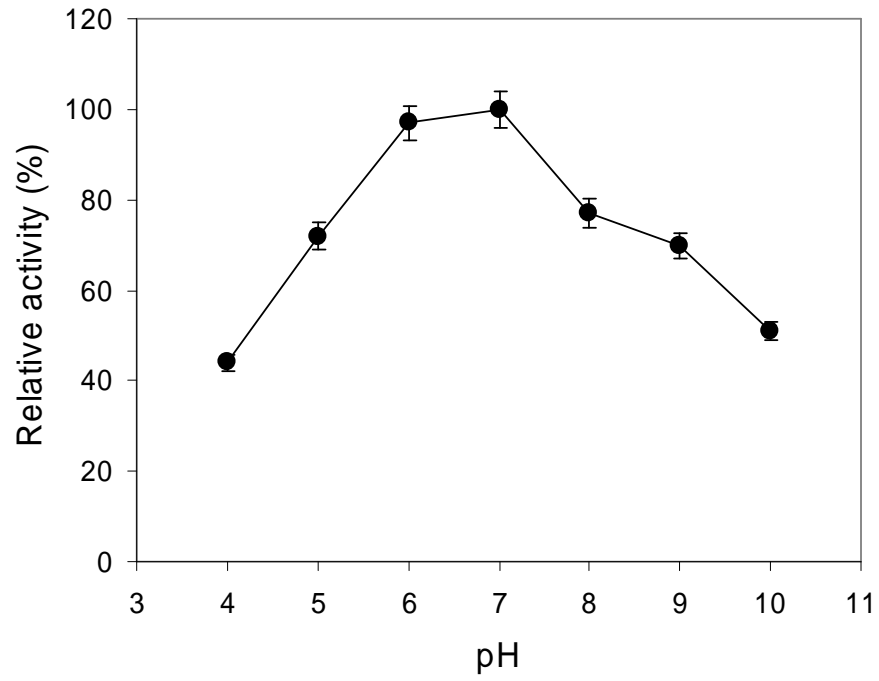


Figure 1. Effect of pH on proteolytic activity of *Burkholderia cepacia* 1A4.

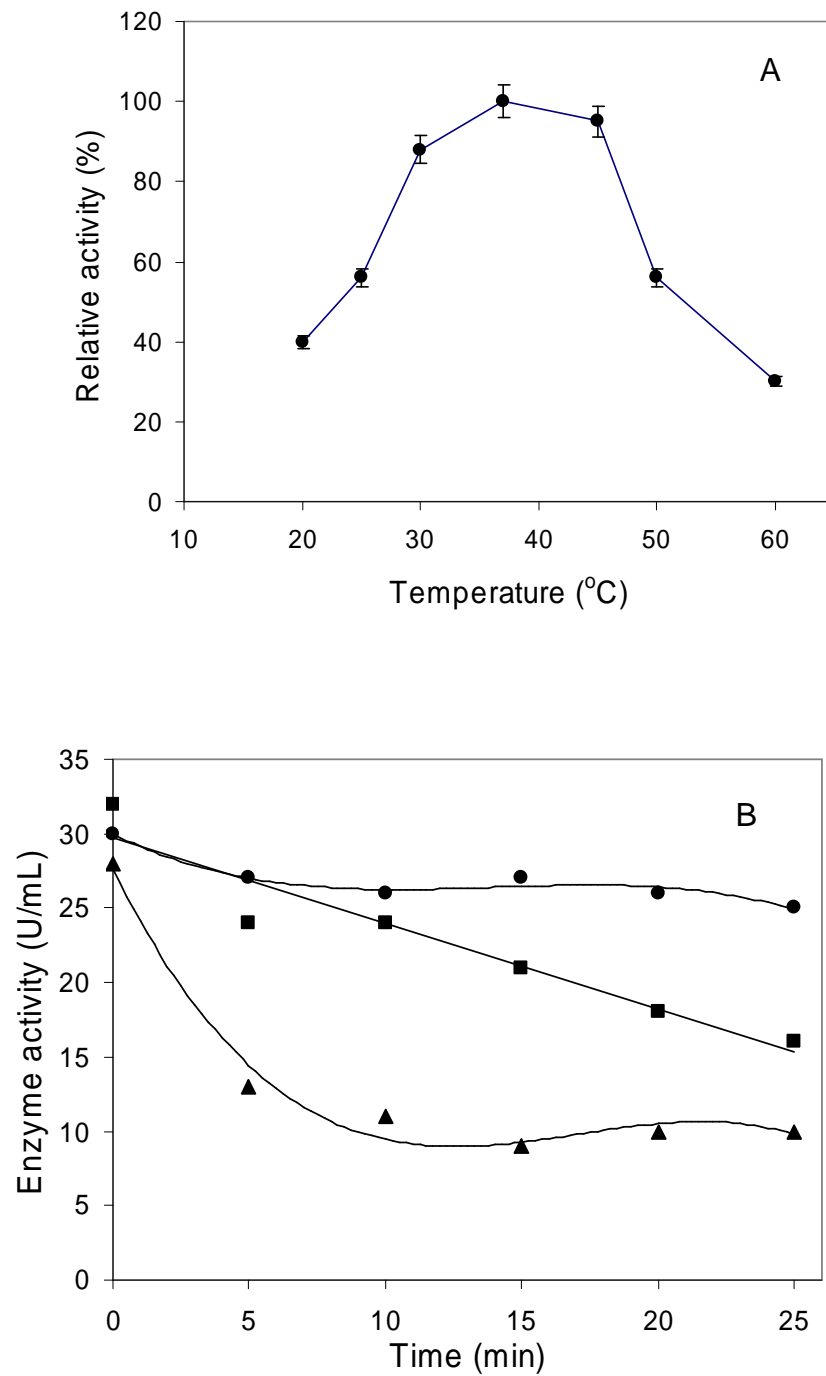


Figure 2. (A) Effect of temperature on proteolytic activity of *Burkholderia cepacia* 1A4. (B) Thermal stability of *B. cepacia* protease at 40°C (circles), 45°C (squares) and 50°C (triangles).

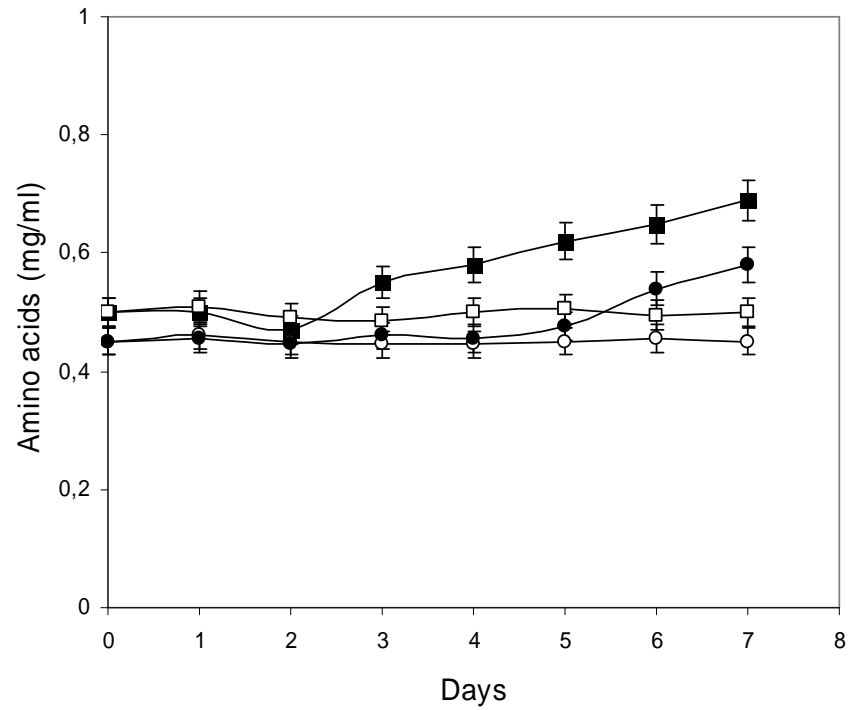


Figure 3. Concentration of amino acids of whole (circles) and skimmed milk (squares) incubated with 4 U/mL protease (black symbols) or heat-inactivated protease (white symbols).

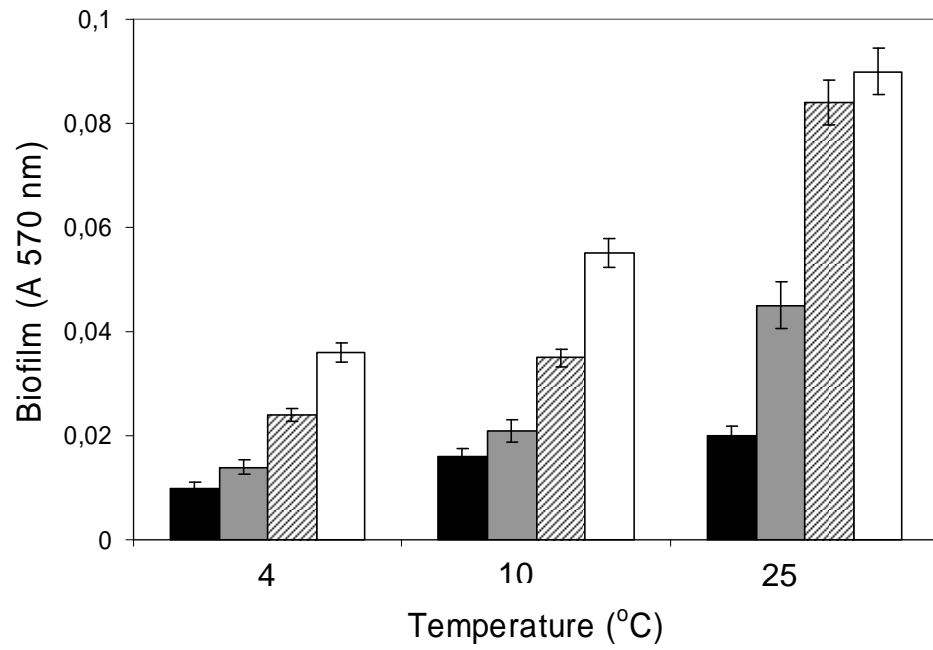


Figure 4. Crystal violet staining of biofilms formed by *B. cepacia* 1A4. Values were determined after 24 (black bars), 48 (gray bars), 72 (dashed bars) and 96 h (white bars) of incubation at the indicated temperatures.

4 DISCUSSÃO GERAL

As contagens de bactérias psicrotróficas apresentaram um padrão semelhante durante o período de coleta, independente da origem (caminhões-tanque e de silos de armazenamento), com valores mais baixos no quinto mês, isto é, julho coincidindo com o inverno no sul do Brasil. Hantsis-Zacharov and Halpern (2007) observaram contagens de psicrotróficas entre 3 e 4logUFC/ml em amostras de leite coletadas ao longo de 10 meses em 4 fazendas em Israel. Eles encontraram contagens de psicrotróficas que variavam ao longo das estações e que denotavam dinâmica semelhante às populações de bactérias mesofílicas. As contagens observadas no presente trabalho são semelhantes àquelas descritas por Burdová et al. (2002) em amostras de leite do Leste Europeu, porém mais altas do que as encontradas por Silva (1998) em amostras de leite estocado em usinas de beneficiamento de leite, as quais variaram entre 3,4 e 5,9logUFC/ml, e por Pinto et al. (2006), que variaram entre 1,7 e 6,1logUFC/ml, 2,1 e 5,4logUFC/ml, e entre 4,9 e 5,8logUFC/ml, em amostras coletadas nas fazendas produtoras, em reservatórios individuais e coletivos e no silo de estocagem na indústria, respectivamente. Embora contagens totais por si só sejam um indicador de qualidade higiênica do leite cru, a contagem de psicrotróficas é um indicador complementar que pode contribuir para explicar os problemas sazonais no processamento do leite (CEMPÍRKOVÁ, 2002).

A microflora composta de bactérias psicrotróficas, geralmente produtora de enzimas termoresistentes, é a principal causa da deterioração das amostras de leite cru refrigerado (SORHAUG e STEPANIAK, 1997). Amostras de leite cru de propriedades leiteiras, do comércio e de plantas de beneficiamento na Índia apresentaram contagens de psicrotróficas de 3,66, 4,96 e 5,03logUFC/ml, respectivamente (KUMERASAN et al., 2007). Os autores indicam que reduzindo a temperatura de estocagem de 7°C para 2°C reduz de modo significativo o desenvolvimento de psicrotróficas e atividades proteolíticas e lipolíticas.

No presente trabalho, um total de 249 colônias foram obtidas em placas incubadas a 7°C. Isolados de psicrotróficas denotando atividade proteolítica em placas de agar leite foram selecionadas e identificadas. Dos 142 isolados de bactérias psicrotróficas e proteolíticas identificadas nesta pesquisa, 90% foram Gram-negativas. A predominância de bactérias Gram-negativas, isoladas em amostras de leite cru

refrigerado está de acordo com resultados obtidos por outros pesquisadores (COUSIN, 1982; MUIR, 1996; ENEROTH et al., 2000a; PINTO et al., 2006).

Entre as bactérias psicrotróficas Gram-negativas indentificadas, as espécies predominantes foram *Enterobacter* spp. (30%), *Escherichia coli* (16,4%), e *Klebsiella* spp. (12,5%). A presença de *Enterobacteriaceae* psicrotróficas no leite tem sido descrita (SUÁREZ e FERREIROS, 1991). A maioria das variedades de *Enterobacteriaceae* (73 de 75) isoladas de leite e derivados em um trabalho anterior foram psicrotróficas com a exceção de variedades de *Enterobacter cloacae* (WESSELS et al., 1989). As psicrotróficas predominantes em queijos feitos de leite cru de ovelhas na Espanha eram *Enterobacteriaceae*, e mais de 73% produziram enzimas proteolíticas e lipolíticas a 7°C (SANTOS et al., 1996). A família *Enterobacteriaceae* é representada principalmente pelos gêneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Citrobacter* e *Enterobacter*, sendo que variedades de *Enterobacter* e *Klebsiella* não são consideradas de origem fecal. *E. coli* é o coliforme principal, sendo um indicador de contaminação fecal em alimentos industrializados. A presença elevada de contagens de coliformes em leite cru pode aumentar a possibilidade de encontrá-los em produtos derivados do leite, o que representa um sério impedimento ao consumo do alimento industrializado.

Dentre as bactérias Gram-negativas não fermentadoras, prevaleceu o gênero *Pseudomonas*, embora correspondesse por volta de 8% do total de bactérias Gram-negativas identificadas. A predominância do gênero *Pseudomonas* como contaminante de leite cru refrigerado foi descrita (MARTINS et al., 2006). Eneroth et al. (2000b) observaram uma grande frequência de isolados dos gêneros *Pseudomonas* (72 a 77%) em amostras de leite cru, leite pasteurizado e temperatura ambiente em indústrias de laticínios.

Um estudo sobre a diversidade entre psicrotróficos em fazendas leiteiras em Israel apontou que as classes dominantes eram γ -Proteobacteria, Bacilli e Actinobacteria, sendo que a maioria dos isolados apresentaram atividades lipolíticas ou lipolíticas e proteolíticas, mas poucas acusaram somente atividade proteolítica (HANTSIS-ZACHAROV e HALPEM, 2007). Amostras de leite de fazendas, silos e caminhões na Finlândia produziram 180 colônias a 7°C (MUNSCH-ALATOSSAVA e ALATOSSAVA, 2006). Entre as psicrotróficas isoladas apresentando aspectos de deteriorização, uma grande quantidade foi identificada como *P. fluorescens*, e pseudomonas pareciam constituir o grupo dominante de psicrotróficas de deteriorização.

Os autores também encontraram algumas variedades dos gêneros de *Acinetobacter*, *Burkholderia* e *Stenotrophomonas*.

Proteases de bactérias psicrotróficas têm sido relacionadas com coagulação ou gelatinização das proteínas do leite, mas relativamente poucos estudos têm demonstrado tais efeitos por adição direta de proteases às amostras de leite (DATTA e DEETH, 2003; TONDO et al., 2004). Leite UAT produzido com leite de baixa qualidade (contagens psicrotróficas de 4,7logUFC/ml, atividade proteolítica de 0,71 U/ml) apresentou um aumento de 74,7% em N solúvel com valores após 180 dias versus 33,8% observados em relação a leite de boa qualidade (3,2 log UFC/ml, 0,42 U/ml). Além disso, o número e concentração de peptídeos determinado por RP-HPLC foram baixos no leite de boa qualidade (TOPÇU et al., 2006).

A enzima de *B. cepacia* 1A4 adicionada ao leite desnatado, independente de quantidade, promoveu a coagulação do leite a partir do segundo dia, enquanto que amostras de leite com enzimas inativadas (grupo controle) não coagularam. Quanto às amostras de leite integral, a coagulação também foi observada, mas ela iniciou a partir do quinto dia, enquanto as amostras do grupo controle não coagularam até o sétimo dia da avaliação. O fato de a proteólise ter ocorrido a uma velocidade maior nas amostras de leite desnatado em relação ao leite integral também foi observada por Garcia-Risco et al. (1999), indicando que a extensão da proteólise é influenciada pelo nível de gordura presente no leite (LOPEZ-FANDIÑO et al., 1993).

A gelatinização é um dos maiores problemas que afetam a qualidade do leite UAT. O processo UAT promove o aumento da viscosidade do leite, mas não sua coagulação já que o tempo de aquecimento é pequeno. Durante a estocagem, a viscosidade do leite aumenta até que há a formação de gel (gelatinização) apontando que o produto não está mais apropriado para consumo. Os mecanismos envolvidos no fenômeno da gelatinização compreendem basicamente alteração das proteínas do leite, associação e dissociação de íons de cálcio, formação de polímeros derivados da reação de Maillard, formação e dissociação do complexo κ -caseína e a participação de enzimas do leite (plasmina) e proteases de bactérias psicrotróficas (HILL, 1988; CHEN et al., 2003). O fenômeno da gelatinização é induzido, inicialmente, pela ação de enzimas resistentes ao calor (proteases) presentes, de forma natural, no leite ou derivados de bactérias, principalmente aquelas do grupo das psicrotróficas (TONDO et al., 2004). Estas enzimas apresentam a habilidade de degradar caseínas e promovem a agregação de micelas. Quando as contagens de bactérias psicrotróficas alcançam um nível de

10^6 UFC/mL, a produção de protease por tais microorganismos é capaz de degradar consideráveis quantidades de caseína. De acordo com Shah (1994), as amostras de leite UAT, estocadas a 30°C, apresentando níveis de protease maiores que um nanograma/mL, podem apresentar um gosto amargo e sofrer o processo de gelatinização. A ação degradadora de proteases de microorganismos psicotróficos é distinta entre as frações da proteína do leite. κ -casein é a mais susceptível à ação destas enzimas, ao passo que as proteínas do soro são relativamente mais resistentes à protease. Koka e Weimer (2000) relataram que a ação destas bactérias psicotróficas, principalmente a protease da *Pseudomonas* spp., é semelhante àquela apresentada pela quimosina, uma enzima empregada em coagulação enzimática para a manufatura de queijos. A presença mais rápida do fenômeno da gelatinização no leite UAT está associada ao processo de aquecimento severo e aos níveis de contaminação devido à presença de microorganismos psicotróficos.

Bactérias gram-negativas psicotróficas têm sido relacionadas aos efeitos nocivos ao leite, mas a pesquisa tem se concentrado mais na *Pseudomonas* spp. (ENEROTH et al., 1998; MARTINS et al., 2006). Há um aumento de evidências que outro gênero possa ter relevância similar (TONDO et al., 2004) pela produção de uma forte atividade proteolítica. Além disso, o potencial para a formação de biofilme aumenta sua resistência aos processos usuais de higiene e limpeza, o que representa um alto risco para a industrialização de alimentos.

5 CONCLUSÕES

Bactérias Gram-negativas foram isoladas com maior frequência dentre os psicrotróficos proteolíticos obtidos de leite cru refrigerado. A refrigeração do leite cru, por períodos prolongados, na fonte de produção ou na indústria, pode comprometer a sua qualidade, considerando a possibilidade de seleção de bactérias psicrotróficas proteolíticas.

No decorrer dos anos, começaram a surgir problemas, principalmente pela interpretação errônea de que o processo UAT corrigia todos os problemas anteriores da matéria-prima, principalmente os de ordem microbiológica, uma vez que promoveria a “esterilização do produto”. Mas tem sido comum o aparecimento de defeitos, como a gelificação, sedimentação, coagulação parcial ou total e o estufamento de embalagens, mesmo em produtos dentro do prazo de validade.

A linhagem de *Burkholderia cepacia*, isolada a partir de leite cru refrigerado apresenta elevada atividade proteolítica, maximizada em pHs de 6 a 7 e temperatura de 40°C, além disso possui poder coagulante e capacidade de aderência e de formar biofilmes.

REFERÊNCIAS

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

ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.59, n.6, p.823-827, 1976.

ALVARES, J.G. et al. Perspectivas para o cooperativismo de leite no Brasil. In: VILELA, D. et al. Gestão ambiental e políticas para o agronegócio do leite. Embrapa Gado de Leite; CNPq; **Serrana Nutrição Animal**, Juiz de Fora, p.59-80, 2003.

ANDRADE, N.J.; BRIDGEMAN, T.A.; ZOTTOLA, E.A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.61, n.7, p.833-838, 1998.

ANTUNES, V.C. et al. Contagem total de microrganismos mesófilos e de psicrotróficos no leite cru e pasteurizado, transportado via latão ou granelizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.57, p.198-201, 2002.

BASTOS, M.S.R. Leite longa vida UHT: Aspectos do processamento e identificação dos pontos críticos de controle. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.66/67, p.32-36, 1999.

BRAMLEY, A.J. Sources of *Streptococcus uberis* in the dairy herd I: isolation from bovine feces and from straw bedding of cattle. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 49, p.369, 1982.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, n.172, p.8-13, 20 de set. Seção I. 2002.

BURDOVÁ, O.; BARANOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A.; RÖZANSKA, H.; ROLA, J.G. Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. **Bulletin of the Veterinary Institute Pulawy**, Pulawy, v.46, p.325-329, 2002.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.75, p.499-511, 1993.

CARVALHO, M.G.X.; MEDEIROS, N.G.A.; ALVES, A.R.S.; SANTOS, M.G.O.; LIMA, S.C.P.; AZEVEDO, S.S. Análise microbiológica do leite *in natura* e

pasteurizado tipo "C" proveniente de uma mini-usina da cidade de Patos, Paraíba. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.123, p.62-66, 2004.

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

CEMPÍRKOVÁ, R. Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. **Veterinary Medicine Czech.**, Republic Czech, v. 47, p. 227-233, 2002.

CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v.13, p.255-275, 2003.

COELHO, P.S.; BRESCIA, M.V.; SIQUEIRA, A.P. Avaliação da qualidade microbiológica do leite UAT integral comercializado em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, p.1-9, 2001.

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.64, n.1, p.157-160, 1981.

CORDEIRO, C.A.M.; CARLOS, L.A.; MARTINS, M.L.L. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo C, proveniente de micro-usinas de Campos dos Goytacazes, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, p.41-44, 2002.

COSTA, E. T. R. Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável. Seropédica, RJ. 81p. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária)** - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

COSTERTON, J. W.; MARRIE, T. J.; CHENG, K.. J. Phenomena of bacterial adhesion. In: Bacterial Adhesion. Savage, D.C., Fletcher, M (Ed.) **London: Plenum Press**, London, p.3-43, 1985.

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

CRIADO, M.T.; SUÁREZ, B.; FERRERÓS, C.M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.2, p.123-126, 1994.

CROMIE, R. Psychrotrophics and their enzyme residues in cheese milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.47, n.2, p.96-100, 1992.

CUNHA, M. F.; BRANDÃO, S. C. C. A coleta a granel pode aumentar os riscos com as bactérias psicrotóficas. **Indústria de laticínios**. Jul/ago, São Paulo, p. 71-73, 2000.

DATTA, N.; DEETH, H.C. Age gelation of UHT milk - a review. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v.79, p.197-210, 2001.

DATTA, N.; DEETH, H.C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. **Food Science Technology**, London, v.36, p.173-182, 2003.

DEMASURE, N.; GUEGUEN, M. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.64, p.271-280, 1997.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 57, p. 99-106, 2000a.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Dairy Journal**, Barking, v.10, p.325-331, 2000b.

ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDENHAUG, J.; MOLIN, G. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. **International Dairy Journal**, Barking, v.8, p. 829-834, 1998.

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

FAIRBAIRN, D.J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.53, n.1, p.139-177, 1986.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do leite e controle de mastite. **Lemos Editora**, Franca, 175p, 2000.

FORSYTHE, S.J. Microbiologia da segurança alimentar. Trad. Maria carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt – **Artmed**, Porto Alegre, p. 216-211, 2002.

GARCIA-RISCO, M.R.; RAMOS, M.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Proteolysis, protein distribution and stability of UHT milk during storage at room temperature. **Journal Science Food Agriculture and Environment**, Helsinki, v.79, p.1171-1178, 1999.

GOMES, M. I. F. V. Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana. **ESALQ**, Piracicaba, p.85, 1988.

GOMES, M. I. F. V. Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade proteica do leite esterilizado "Longa-vida". **UNICAMP**, Campinas, p.108, 1996.

GOUNOT, A.M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. **Netherlands Melk en Zuiveltijdschrift and Dairy**, Chicago, n.42, p.1192-1197. 1986.

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

HILL, A. Quality of ultra-high-temperature processed milk. **Food Technology**, Chicago, v.12, p.92-97, 1988.

HOFFMANN, F.L.; CRUZ, C.H.G.; VINTURIM, T.M.; FAZIO, M.L.S. Microbiologia do leite pasteurizado tipo C comercializado na região de São José do Rio Preto -SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.65, p.51-54, 1999.

HOGAN, J. S. et al. Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.72, p.250, 1989.

ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS). Microorganismos de los alimentos. **1. Técnicas de análisis microbiológico**. Acribia, Zaragoza, 804p, 1994.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**, 4ª Edición, Zaragoza, p. 257-262, 2002.

KOHLMANN, K.L.; NIELSEN, S.S.; LADISCH, M.R. Effects of a low concentration of added plasmin on ultra high temperature processed milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, n.4, p.1151-1156, 1991.

KOKA, R.; WEIMER, B.C. Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.89, p.280-288, 2000.

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

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

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Viable but nonculturable *Salmonella typhimurium* in single and binary biofilms in response to chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.58, p.1186-1191, 1995.

LÓPEZ-FANDIÑO, R.; OLANO, A.; CORZO, N.; RAMOS, M. Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. **Journal Dairy Research**, Cambridge, v.60, p.339-347, 1993.

MARTINS, S.C.S.; ALBUQUERQUE, L.M.B. Qualidade do leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Fortaleza. Bactérias multiresistentes a antibióticos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.59, p.39-42, 1999.

MARTINS, M.L.; ARAÚJO, E.F. de; MORAES, C.A.; MANTOVANI, H.C.; VANETTI, M.C.D. Diversidade genética de bactérias psicrotóxicas proteolíticas isoladas de leite cru granelizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.58, p.54-60, 2003.

MARTINS, M.C. Competitividade da cadeia produtiva do leite no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, n.3, p.38-51, 2004.

MARTINS, M.L.; PINTO, C.L.O.; VANETTI, M.C.D.; MEZÊNCIO, J.M.S. Detecção de Proteases Bacterianas em Leite por Métodos Imunológicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 61, jul./ago. 2004.

MARTINS, M.L; PINTO, C.L.O.; ROCHA, R.B., ARAUJO, E.F., VANETTI, M.C.D. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotropic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.111, p.144-148, 2006.

McKELLAR, R.C. Development of off-flavours in ultra high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v.64, n.11, p.2138-2145, Nov. 1981.

MORENO, I.; VIALTA, A.; VALLE, J.L.E. Microrganismos responsáveis pelas principais deteriorações do requeijão e outros queijos fundidos. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, v.19, p.72-75, set/out. 2002.

MOSTELLER, T. M.; BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.56, n.1, p.34-41, 1993.

MOTTAR, J. Heat resistant enzymes in UHT milk and their influence on sensoric changes during uncooled storage. **Milchwissenschaft**, Munchen, v.36, n.2, p. 87-91, 1981.

MUIR, D.D. The fresh-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Wembley, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

MUNSCH-ALATOSSAVA, P, ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, Jena, v.161, p.334-346, 2006.

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

PADILHA, M.R.F.; FERNANDES, Z.F. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite tipo C comercializado no Recife – PE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.61, p.105-110, 1999.

PARIZZI, S. Q. F. Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência. **Dissertação (Mestrado em**

Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p.57, 1998.

PINTO, C.L.O.; CARDOSO, R.R.; VANETTI, M.C.D. Bactérias Psicotróficas Proteolíticas e Potencial Determinador a Temperaturas de Refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.59, p.110-117, 2004.

PINTO, C.L.O; MARTINS, M.L; VANETTI, M.C.D. (2006) Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, p.645-651, 2006.

RANIS, S.; LEWIS, M.J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**. London, v.20, n.3, p.517-524,1995.

REZENDE, N.C.M. et al. Ocorrência de microrganismos indicadores em leite UHT (ultra high temperature) integral. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v.7, p.58-60, 2000.

ROQUE, R.A.; SCHUMACHER, S.S.P.; PAIVA, P.C. Quantificação de microrganismos psicotróficos em leites pasteurizados tipos B e C, comercializados na cidade de São Paulo - SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, p.59-68, 2003.

SANTANA, E. H. W. Contaminação do leite por microrganismos aeróbios mesófilos, psicotróficos e psicotróficos proteolíticos em diferentes pontos do processo de produção leiteira. **Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Londrina**, Londrina, p.78. 2001.

SANTOS, J.A.; LÓPEZ-DIAZ, T.M.; GARCÍA-FERNANDEZ, M.C.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; OTERO, A. Characterization and extracellular activity of psychrotrophic bacteria isolated from Villalón cheese (fresh variety of Spanish sheep's milk cheese). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.33, p.301-306, 1996.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F. Bactérias psicotróficas e qualidade do leite. **Revista CBQL**, São Paulo, v.1, n.1, p.12-15, 2002.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Bactérias psicotróficas e a qualidade do leite. **Revista CBQL**, São Paulo, v.19, p.12-15, 2003.

SANTOS, M.V.; LARANJA, F.L.F. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, p.13-19, 2001.

SILVA, M.H. **Efeito do resfriamento e estocagem sobre alguns grupos de microrganismos e propriedades físico-químicas do leite**. Viçosa: UFV, 1991. 104p.

SILVA, P.H.F.; ALMEIDA, M.C.F. Estabilidade térmica do leite. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, n.304, p.157-163, jul/ago. 1998.

SILVA, P.H.F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 1.ed. Juiz de Fora, 2004. 127p.

SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, Munchen, v.49, p.432-437, 1994.

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

SILVEIRA, I.A.; CARVALHO, E.P.; TEIXEIRA, D. Influência de Microrganismos Psicrotróficos sobre a Qualidade do Leite Refrigerado: Uma Revisão. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.55, p.21-27, 1998.

SMITH, J.L.; FRATÂMICO, P.M. Factors involved in the emergence and persistence of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.58, n.6, p.696-708, 1995.

SOARES, P.V. Estimativa rápida da carga de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado. **Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista**, Jaboticabal, p.68, 2004.

SUÁREZ, B.; FERREIRÓS, C.M. Psychrotrophic flora of raw milk: resistance to several common disinfectants. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.58, p.127-136, 1991.

SUHREN, G. **Producer microorganisms**. In: MCKELLER, R. G. Enzymes of psychrotrophs in raw food. CRC Press: Ranton, 310p, 1989.

SWAISGOOD, H.E.; BOSOGLU, F. Heat inactivation of the extracellular lipase from *Pseudomonas fluorescens* MC 50. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.32, p.7, 1984.

TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P. Qualidade microbiológica do leite tipo A pasteurizado, comercializado na cidade de Descalvado – SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.96, p.65-68, 2002.

TIMM, C.D.; GONZALES, H.L.; OLIVEIRA, D.S.; BÜCHLE, J.; ALEXIS, M.A.; COELHO, F.J.O.; PORTO, C. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral, produzido em mini-usinas na região sul do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.106, p.100-104, 2003.

TONDO, E.C.; LAKUS, F.R.; OLIVEIRA, F.A.; BRANDELLI, A. Identification of heat stable protease of *Klebsiella oxytoca* isolated from raw milk. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v.38, p.146-150, 2004.

TOPÇU, A.; NUMANOGLU, E.; SALDAMLI, I. Proteolysis and storage stability of UHT milk produced in Turkey. **Interntaional Dairy Journal**, Barking, v.16, n.633-638, 2006.

VALCARCE, M.B.; BUSALMEN, J.P.; SÁNCHEZ, S.R. The influence of the surface condition of the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v.50, p.61-66, 2002.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; ROSSI JUNIOR, O.D.; REZENDE-LAGO, N.C.M. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.3, p.396-400, 2005.

WESSELS, D., JOOSTE, P.J., MOSTERT, J. Psychrotrophic, proteolytic and lipolytic properties of Enterobacteriaceae isolated from milk and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, Amesterdam, v.9, p.79-83, 1989.

WIEDMANN, M. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.2085-2095, 2000.

WIKING, L. et al. Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. **Milchwissenschaft**, Munchen, v.57, p.190-194, 2002.