

Atividade proteolítica de bactérias psicrotróficas em leites estocados em diferentes temperaturas

Thiago Braga Izidoro¹, Juliano Gonçalves Pereira², Vanessa Mendonça Soares³,
Thiago Luiz Belém Spina⁴, José Paes de Almeida Nogueira Pinto⁵

RESUMO

A difusão do uso da tecnologia do resfriamento, como estratégia para manutenção das características microbiológicas e organolépticas do leite, não associada aos cuidados básicos de higiene na obtenção do produto, fez com que os micro-organismos psicrotróficos emergissem como as principais bactérias deteriorantes da indústria láctea. Este estudo teve por objetivo avaliar como o metabolismo psicrotrófico proteolítico responde a diferentes temperaturas de incubação do leite, delineando um paralelo entre multiplicação de psicrotróficos, quantidade de micro-organismos com capacidade de hidrolisar proteínas e quantidade de GMP (glicomacropéptido) liberada. As amostras de leite, coletadas diretamente do tanque de resfriamento, foram submetidas à contagem de micro-organismos psicrotróficos, contagem de micro-organismos proteolíticos e determinação da concentração de GMP, em diferentes tempos (12 h; 24 h; 48 h) e temperaturas (4°C; 8°C; 12°C) de armazenamento. Não houve linearidade entre os parâmetros microbiológicos e o GMP aferido, segundo o binômio tempo/temperatura. A maior concentração de GMP (5,07 µg/mL) foi aferida no binômio 8°C/24 h (T8/M24). Esses dados indicam a necessidade de estudos sobre o metabolismo da microbiota psicrotrófica, de forma a elucidar questões básicas e de profunda relevância sobre seu metabolismo.

Palavras-chave: leite, proteólise, psicrotróficos.

ABSTRACT

Proteolytic activity of psychrotrophic bacteria in milk stored at different temperatures

The widespread use of cooling technology as a tool for maintaining the microbiological and organoleptic characteristics of milk, Without effective hygienic practices throughout the milk production, caused the psychrotrophic micro-organisms to become major deteriorative bacteria in the dairy industry. The present study aimed to assess how the proteolytic psychrotrophic metabolism responds to different milk storage temperatures, drawing a parallel among psychrotrophic growth, amount of micro-organisms capable of breaking down proteins and amount of GMP (glycomacropéptide) released. Milk samples were collected directly from the cooling tank and subjected to count of psychrotrophs, count of proteolytic micro-organisms and the concentration of GMP at different storage times and temperatures. There was no linearity between the microbiological parameters and the GMP measured, according to the time/temperature binomial. The highest concentration of GMP (5.07 mg/mL) was measured in the binomial 8°C/24h (T8/M24). The data make clear the need for further studies about questions involving the psychrotrophic microbiota in order to clarify extremely important basic questions about their metabolism.

Key words: milk, proteolysis, psychrotrophs.

Recebido para publicação em 20/04/2012 e aprovado em 25/04/2013.

¹Médico Veterinário, Doutor. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Caixa Postal 572, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. tizidoro@gmail.com

²Médico Veterinário. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Caixa Postal 572, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. julianopereira@veterinaria.com.br (autor para correspondência).

³Médica Veterinária. Mestre. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Caixa Postal 572, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. vanessamssoares@gmail.com

⁴Médico Veterinário. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Caixa Postal 572, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. thiagospina@uol.com.br

⁵Médico Veterinário, Doutor. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, Caixa Postal 572, 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. josepaes@fmvz.unesp.br

INTRODUÇÃO

Os psicrotróficos são definidos como bactérias que apresentam altas taxas de multiplicação em baixas temperaturas, por causa do elevado metabolismo, predominantemente lipoproteolítico (Cousin, 1982).

A difusão do uso da tecnologia do resfriamento, como estratégia para manutenção das características microbiológicas e organolépticas do leite, não associada aos cuidados básicos de higiene na obtenção do produto, fez com que esse grupo de micro-organismos emergisse como o mais impactante na indústria de laticínios. O motivo dessa relevância está no fato de serem bactérias de caráter altamente deteriorante (Munsch-Alatossava & Alatossava, 2006), sendo, por consequência, um dos principais limitantes da vida de prateleira do leite (Dogan & Boor, 2003). Destacam-se, no grupo, os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*.

Pseudomonas é o psicrotrófico clássico, de todos os micro-organismos presentes no leite é o que possui a maior atividade metabólica (tendendo à lipolítica) na faixa de temperatura de 4°C a 7°C (Nörnberg *et al.*, 2010). Por outro lado, os *Bacillus* são predominantes em temperaturas de resfriamento marginal, de 8 a 10°C, e, embora aproveitem frações graxas, o metabolismo proteolítico prevalece (Sørhaug & Stepniak, 1997; Zacharov & Helpert, 2007).

A atividade psicrotrófica-proteolítica expressa-se, principalmente, sobre as caseínas (Gebre-Egziabher *et al.*, 1980), mais especificamente sobre as porções glicolisadas e hidrofílicas da κ -caseína. Essa atividade é muito similar à ação da quimosina (coalho) sobre as frações proteicas do leite no processo de fabricação dos queijos, pois resulta na liberação de moléculas de GMP. As proteinases produzidas por essa microbiota são termoestáveis, mantêm-se íntegras e ativas após o tratamento térmico, e os prejuízos econômicos decorrentes dessa atividade são consideráveis (Rowe *et al.*, 2003). A clivagem e a consequente floculação das micelas de caseína geram, além da geleificação do leite UHT (Renner, 1998; Datta & Deeth, 2001), dificuldades para a obtenção dos parâmetros físico-químicos necessários na fabricação de queijos (Raynal & Remeuf, 1998). Além disso, o acúmulo de dipeptídeos e de aminoácidos (especialmente tirosina) confere ao leite o sabor amargo (Chen *et al.*, 2003).

Apesar da relevância do assunto, poucas respostas consensuais existem entre os pesquisadores, a respeito do mecanismo de quebra de frações proteicas pela ação da microbiota psicrotrófica (Tondo *et al.*, 2004). Isto porque atuam, sinérgica e simultaneamente, em processos proteolíticos de origem bacteriana, endógena e oxidativa (Wiking *et al.*, 2003). Além disso, a partir da quebra do GMP, existem várias rotas metabólicas possíveis, o que torna praticamente impossível aferir a quantidade de pro-

teínas clivadas, por cada um dos fatores descritos. Finalmente, pequenas variações de temperatura podem implicar variações consideráveis no metabolismo da microbiota do leite (Muir *et al.*, 1978).

Tendo em vista o exposto, este trabalho teve o objetivo de verificar como o metabolismo psicrotrófico proteolítico responde a diferentes temperaturas de incubação do leite, traçando um paralelo entre multiplicação de psicrotróficos, quantidade de micro-organismos com capacidade de quebrar proteínas e quantidade de GMP liberada.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras e estocagem do leite

O experimento avaliou amostras de leite, colhidas, semanalmente, em uma propriedade de médio porte, com produção diária média de 500 L/dia. As coletas foram realizadas no período vespertino, tendo havido a preocupação de que o leite fosse, invariavelmente, recém-ordenhado.

As amostras foram colhidas, diretamente do tanque de resfriamento da propriedade, para três frascos estéreis tipo Scott, com capacidade de 600 mL, acondicionados em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável e, imediatamente, transportadas ao laboratório.

Chegando ao laboratório, foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas. A seguir, os frascos foram incubados em estufas tipo BOD (*Biochemistry Oxygen Demand*), ajustadas para as temperaturas 4, 8 e 12°C (T4, T8 e T12, respectivamente).

Definiu-se como M0, o momento em que as primeiras análises foram efetuadas. Posteriormente, os procedimentos analíticos foram repetidos para cada uma das temperaturas de estocagem já citadas, 12, 24, 48 h (após M0) e estes momentos foram denominados, respectivamente, M12, M24, M48.

Análises microbiológicas

Contagem total de micro-organismos psicrotróficos: primeiramente, cada frasco foi homogeneizado e, a seguir, foram realizadas diluições decimais seriadas, empregando-se solução salina 0,85%. Posteriormente, 0,1 mL de cada diluição foi transferido para placas de Petri, contendo ágar padrão para contagem (PCA), realizando-se a semeadura em superfície (*spread plate*). Após a secagem, as placas foram incubadas em estufas, a 21°C, por 25 h (APHA, 2002). O resultado final foi expresso em log de UFC/mL.

Contagem de micro-organismos proteolíticos: após a realização da contagem de micro-organismos psicrotróficos, como descrito no item anterior, as placas que apresentaram colônias isoladas (máximo de 50 colônias por placa) foram utilizadas para a verificação da percentagem

de micro-organismos psicrotróficos proteolíticos, por meio da semeadura em ágar leite desnatado (ALD). Das placas escolhidas, foram retiradas 20 colônias, utilizando-se alça de níquel cromo, e transferidas para uma placa contendo ALD. As placas foram incubadas em estufa, a 21°C, por 72 h (Frank *et al.*, 1992). A expressão metabólica foi evidenciada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia, decorrente do metabolismo bacteriano sobre as porções proteicas existentes no meio. O resultado foi expresso em porcentagem, baseado no número de colônias de psicrotróficos replicadas e número de colônias confirmadas.

Análise físico-química

Determinação da concentração de GMP por espectrofotometria: para a determinação da concentração de GMP, a prova foi executada em quatro etapas:

1ª etapa – Precipitação: Foram transferidos 20 mL da amostra de leite para um béquer (utilizando-se uma pipeta volumétrica) e adicionados 20 mL de ácido tricloroacético 24% (TCA). Após 30 min, (tempo necessário para que ocorra a coagulação ácida), o conteúdo foi filtrado. A seguir, 20 mL do filtrado foram pipetados em 2 tubos (10 mL em cada tubo), conferindo repetibilidade ao resultado. A cada um dos tubos citados, foi acrescido 1 mL de ácido fosfotungstíco.

2ª etapa – Centrifugação: Os tubos contendo o filtrado foram centrifugados a 3000 rpm, por 10 min. O sobrenadante foi descartado e, aos tubos, foram adicionados 6 mL de álcool etílico absoluto. Uma nova centrifugação foi realizada, na mesma rotatividade e pelo mesmo tempo. Após a centrifugação, o líquido sobrenadante foi descartado, restando apenas um precipitado (*pellet*) no fundo de cada tubo.

3ª etapa – Leitura: Utilizando-se uma pipeta automática, foram adicionados 1 mL de ninhidrina ácida e 2 mL de ácido acético glacial nos tubos contendo o *pellet*. A solução foi, então, homogeneizada e levada ao banho-maria (água em estado de alta ebulição) por 10 min. Após esse período, os tubos foram imediatamente levados ao banho de gelo, com o intuito de interromper a reação. A leitura da absorbância da solução foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 470 nm.

4ª etapa – Conversão dos valores de absorbância em µg/mL de ácido siálico: Seguindo a metodologia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2006) foram feitas dez diluições de ácido siálico e, para cada um delas, foi aferido um valor de absorbância. Foi então traçada uma reta de tendência, que serviu de parâmetro para a conversão dos valores de absorbância para µg/mL de ácido siálico (Fukuda *et al.*, 1994; Brasil, 2006).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas a partir de 30 repetições de todos os procedimentos descritos, ou seja, efetuaram-se colheitas por 30 semanas seguidas. Utilizou-se a técnica da análise de variância para o modelo com dois fatores, complementar ao teste de comparação de múltiplos de Tukey (SAS). Todas as discussões foram realizadas a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como descrito na Tabela 1, em M0, a contagem média de micro-organismos psicrotróficos foi de 3,81 (log UFC/mL). Independentemente da temperatura analisada, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) de M12 para M48. Além disso, independentemente do momento, as contagens foram mais altas ($p < 0,05$), na medida em que se elevou a temperatura de incubação do leite.

Os resultados obtidos eram esperados, pois, com o aumento da temperatura, reduziu-se sua importância como fator limitante da multiplicação bacteriana (Ercolini *et al.*, 2009). Da mesma forma, as contagens foram sempre crescentes, na medida em que se aumentava o tempo de estocagem.

Como observado na Tabela 2, a partir de M0, momento no qual foi aferido o valor médio de 59,3%, a porcentagem de psicrotróficos proteolíticos permaneceu constante, para todas as temperaturas e todos os momentos de análise ($p > 0,05$). Entretanto, as pequenas variações positivas, aferidas em M24, podem indicar que, naquele momento, houve uma conversão metabólica em direção à atividade proteolítica.

Na literatura, os valores de psicrotróficos com capacidade de clivar frações proteicas convergem para algo em torno do valor de 40 a 45% de psicrotróficos proteolíticos (Silveira *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2006; Nörnberg *et al.*, 2010).

É preciso cautela para se interpretar essa aparente constância descrita; isto porque a prova apenas demonstra a produção de enzimas e não a quantidade de enzimas produzidas. Isto significa que os dados não necessariamente descrevem uma constância na atividade proteolítica geral; afinal, um mesmo micro-organismo pode produzir quantidades diferentes de enzimas proteolíticas, conforme se altera o binômio tempo/temperatura.

Em M0, o valor aferido de GMP livre foi de 2,83 µg/mL, valor próximo ao de Fukuda *et al.* (1994), que obtiveram média de 2,71 µg/mL. Já Furlanetti & Prata (2003), também trabalhando com leite cru, descreveram uma média bem superior, de $4,33 \pm 0,62$ µg/mL. Entretanto, neste experimento, os próprios autores consideraram que a influência de alguns fatores, como estágio de lactação e presença de vacas mastíticas no rebanho podem ter gerado uma média superestimada.

A concentração inicial de GMP, obtida neste trabalho, está dentro do limite estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como normal para o leite cru (Brasil, 2006).

Nota-se, pela Tabela 3, que maiores concentrações foram aferidas em M24, do que em M48. Isso ocorre por causa da quebra do GMP em frações menores, o que naturalmente impossibilitaria a ligação do ácido siálico à ninhidrina ácida.

As técnicas mais utilizadas para detecção de atividade proteolítica no leite, seja de origem bacteriana seja por consequência de fraude por adição de soro, baseiam-se na concentração do GMP e apresentam essas variações na leitura (Lopez-Fandiño & Olano, 1999).

Na temperatura de 4°C, os valores de GMP se mantiveram constantes. Tanto pela temperatura de incubação, quanto pela contagem de psicrotróficos, em 48 h, não se esperaria atividades metabólico-proteolíticas muito detectáveis (Grieve & Kitchen, 1985).

Entretanto, os maiores teores de GMP foram obtidos com o leite incubado a 8°C, e não a 12°C, como seria mais provável. Independentemente do período de análise, foi observada quebra de estrutura quaternária de caseína em moléculas de GMP, a 8°C, mais do que a 12°C.

Além da quebra de GMP não variar linearmente, de modo crescente, acompanhando a multiplicação bacteriana (Tabela 1) e a elevação da temperatura, outro padrão microbiológico é questionado pelos resultados apresen-

Tabela 1. Contagem de psicrotróficos (log UFC/mL) em leites estocados em diferentes temperaturas (4°C/T4, 8°C/T8, 12°C/T12) e analisados em diferentes momentos (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48)

Temperatura	População analisada em diferentes momentos ¹			
	M0	M12	M24	M48
Resfriada ²	3,81 ± 1,41	nr	nr	Nr
T4	nr	4,76 ± 0,90 ^{aA}	5,10 ± 0,94 ^{abA}	5,51 ± 0,91 ^{bA}
T8	nr	5,21 ± 0,92 ^{aAB}	5,58 ± 0,99 ^{aA}	6,22 ± 0,91 ^{bb}
T12	nr	5,77 ± 1,05 ^{ab}	6,42 ± 0,96 ^{bb}	7,45 ± 0,89 ^{cc}

Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

¹Valores expressos em média e desvio padrão.

²Análises realizadas com amostras em temperatura resfriada.

nr = não realizada

Tabela 2. Percentagem de psicrotróficos proteolíticos (%) em leites estocados em diferentes temperaturas (4°C/T4, 8°C/T8, 12°C/T12) e analisados em diferentes momentos (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48)

Temperatura	População analisada em diferentes momentos ¹			
	M0	M12	M24	M48
Resfriada ²	59,3 ± 13,1	nr	nr	nr
T4	nr	58,3 ± 11,5 ^{aA}	62,5 ± 10,0 ^{aA}	59,0 ± 8,0 ^{aA}
T8	nr	59,7 ± 11,7 ^{aA}	65,7 ± 8,6 ^{aA}	59,5 ± 7,7 ^{aA}
T12	nr	62,5 ± 9,8 ^{aA}	66,8 ± 6,1 ^{aA}	62,7 ± 9,8 ^{aA}

Valores seguidos de letras minúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Valores seguidos de letras maiúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

¹Valores expressos em média e desvio padrão.

²Análises realizadas com as amostras em temperatura resfriada.

nr = não realizada

Tabela 3. Teor de GMP (µg/mL de ácido siálico) em leites estocados em diferentes temperaturas (4°C/T4, 8°C/T8, 12°C/T12) e analisados em diferentes momentos (0h/M0, 12h/M12, 24h/M24, 48h/M48)

Temperatura	Teor de GMP analisado em diferentes momentos ¹			
	M0	M12	M24	M48
Resfriado ²	2,83 ± 0,97	nr	nr	nr
T4	nr	2,66 ± 0,70 ^{aA}	3,05 ± 0,88 ^{aA}	2,94 ± 0,72 ^{aA}
T8	nr	3,82 ± 1,46 ^{aA}	5,07 ± 2,25 ^{bb}	4,52 ± 1,93 ^{bb}
T12	nr	3,05 ± 0,92 ^{aA}	3,85 ± 1,40 ^{aA}	3,31 ± 0,95 ^{aA}

Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

¹Valores expressos em média e desvio padrão.

²Análises realizadas com as amostras em temperatura resfriada.

nr = não realizada

tados. Griffiths (1989) afirmou que as enzimas psicotróficas são produzidas, principalmente, no início da fase estacionária de multiplicação; entretanto, o que se verificou neste experimento foi uma intensa atividade de quebra, logo nas primeiras 12 h, em T8, que se manteve no decorrer das 48 h de análises. Esses dados ratificam o raciocínio estabelecido por Stevenson *et al.* (2002), que questionam quais são, afinal, os substratos que fomentam a multiplicação das bactérias psicotróficas, durante a fase log, visto que a lactose não é consumida.

Não há dados específicos que permitam uma discussão comparativa, mas há indícios que, se não explicam totalmente, ao menos permitem hipóteses viáveis do que poderia estar ocorrendo com a microbiota do leite incubada a 8°C.

As informações contidas nas Tabelas 1 e 3 permitem o seguinte raciocínio: se a multiplicação bacteriana é sempre crescente e se na temperatura de 8°C, foi verificada maior atividade proteolítica, é provável que haja uma atividade lipolítica mínima. Caso contrário, haveria mais bactérias a 8°C do que a 12°C, já que se trata de uma microbiota essencialmente lipoproteolítica. Izidoro *et al.* (2010) já haviam verificado um brusco predomínio de atividade proteolítica no leite, nessa faixa de temperatura. Além disso, Sørhaug & Stepaniak (1997) descrevem uma inversão na microbiota do leite, a 8°C: o gênero *Pseudomonas* é suplantado por *Bacillus*. Não é apenas uma substituição de micro-organismos que está sendo reportada, está implícita uma inversão metabólica, pois, embora sejam importantes micro-organismos proteolíticos, *Pseudomonas* são preferencialmente lipolíticos, enquanto o gênero *Bacillus* é predominantemente proteolítico (Silveira *et al.*, 1998; Zacharov & Helpert, 2007).

O próprio metabolismo lipolítico pode fornecer outra explicação para o evento proteolítico registrado a 8°C: alcoóis e aldeídos, originados da degradação da gordura do leite, induzem a oxidação e quebra de frações proteicas (Wiking *et al.*, 2002). Desta forma, os resíduos metabólicos lipolíticos de *Pseudomonas* poderiam somar-se à atividade proteolítica de *Bacillus* (e de outros psicotróficos, inclusive as próprias *Pseudomonas*.) a 8°C.

Por fim, não se deve desconsiderar o fato de que as ligações peptídicas são covalentes duplas, as mais fortes da natureza orgânica. Para que um micro-organismo hidrolise proteína é necessário que seu aparato metabólico esteja funcionando de forma adequada, pois haverá um grande gasto energético, até que se obtenha o aminoácido. Talvez a temperatura de 4°C não ofereça as condições necessárias para que a microbiota do leite expresse seu metabolismo proteico. Desta forma, a 8°C haveria uma migração intensa para a atividade proteolítica, pois estaria sendo aproveitado um substrato, até então, com poucos competidores.

A exposição destes dados pode induzir a uma conclusão, equivocada, a de que as alterações no leite ocorrem de forma mais intensa a 8°C do que a 12°C. Ressalta-se que este trabalho avaliou apenas a atividade proteolítica. Na temperatura de incubação de 12°C, é provável que já possa ser verificada uma atividade metabólica residual de micro-organismos mesófilos, que possuem a capacidade de fermentar lactose e produzir ácido láctico.

CONCLUSÕES

Os resultados não demonstraram relação de linearidade entre a população de micro-organismos psicotróficos, a percentagem de bactérias proteolíticas e a atividade metabólica proteolítica. De um modo geral, cada uma dessas aferições respondeu de forma particular, diante do binômio tempo-temperatura.

Uma possível alteração na microbiota, e consequente inversão metabólica, implicou uma maior concentração de GMP, verificada na temperatura de 8°C.

Os dados demonstraram a necessidade de estudos sobre as questões que envolvem a microbiota psicotrófica, de forma a elucidar questões básicas e de profunda relevância sobre seu metabolismo, o que contribuiria para a produção de leite e derivados de melhor qualidade organoléptica e maior vida de prateleira.

REFERÊNCIAS

- APHA - American Public Health Association (2002) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ª ed. Washington, DC, APHA. 676p.
- Brasil (2006) Instrução Normativa n.68 de 12 de dezembro de 2006. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Diário Oficial da União. 14/12/2006 - Seção 1. p.8-30.
- Chen L, Daniel RM & Coolbear T (2003) Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. International Dairy Journal, 13:255-75.
- 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 (2001) Age gelation of UHT Milk- a review. Food and Bioproducts Processing, 79:197-210.
- Dogan B & Boor KJ (2003) Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. Isolated from fluid milk products and dairy processing plants. Applied and Environmental Microbiology, 69:130-8.
- Ercolini D, Russo F, Ferrocino I & Villani F (2009) Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. Food Microbiology, 26:228-231
- Frank JF, Christen GL & Bullerman LB (1992) Tests for groups of microorganisms. In: Marshall RT (Ed.) Standard methods for the examination of dairy products. 16ª ed. Washington, DC, American Public Health Association. p.271-86.

- Fukuda SP, Roig SM & Prata LF (1994) Metodologia analítica para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite. In: 12º Congresso Nacional de Laticínios, Juiz de Fora. Anais, ILCT. p.144-20.
- Furlanetti AM & Prata LF (2003) Free and total gmp (glycomacropéptide) contents of milk during bovine lactation. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 23:121-125.
- Gebre-Egziabher A, Humbert ES & Blankenagel G (1980) Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes. *Journal of Food Protection*, 43:709-712.
- Grieve PA & Kitchen BA (1985) Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. *Journal of Dairy Research*, 52:101-112.
- Griffiths MW (1989) Effects of temperature and milk fat on extracellular enzyme synthesis by psychrotrophic bacteria during growth in milk. *Milchwissenschaft*, 44:539-443.
- Izidoro TB, Nobile C, Spina TLB, Lima MT, Tuasek SO, Pereira JG, Matos AV & Pinto JPAN (2010) Influência da temperatura sobre a atividade proteolítica do leite. In: 11º Congresso Panamericano de Leite, Belo Horizonte. Anais, FEPALE. CD-ROM.
- Lopez-Fandiño R & Olano A (1999) Review: Selected indicators of the quality of thermal preprocessed milk. *Food Science and Technology International*, 5:121-137.
- Martins ML, Pinto CLO, Rocha RB, Araújo 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.
- Muir DD, Kelly ME & Phillips JD (1978) The effect of storage temperature on bacterial growth and lipolysis in raw milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 31:203-208.
- Munsch-Alatossava P & Alatossava T (2006) Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research*, 161:334-336.
- Nörnberg MFBL, Friedrich RSC, Weiss RDN, Tondo EC & Brandelli A (2010) Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, 63:41-47.
- Raynal K & Remeuf F (1998) The effect of heating on physicochemical and renneting properties of milk: A comparison between caprine, ovine and bovine milk. *International Dairy Journal*, 8:695-706.
- Renner E (1998) Storage stability and some nutritional aspects of milk powders and ultra high temperature products at high ambient temperatures. *Journal of Dairy Research*, 55:125-142.
- Rowe MT, Dunstall G, Kilpatrick D & Wisdom GB (2003) Effect of growth phase on the subsequent growth kinetics of psychrotrophic bacteria of raw milk origin. *International Journal of Dairy Technology*, 56:35-38.
- Silveira IA, Carvalho EP & Teixeira D (1998) Verificação das atividades proteolíticas e lipolíticas da flora microbiana isolada do leite cru tipo B refrigerado. II – Microrganismos mesófilos e termófilos. *Ciência e Agrotecnologia*, 22:366-374.
- Sørhaug T & Stepaniak L (1997) Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 8:35-41.
- Stevenson RG, Rowe MT, Wisdom GM & Kilpatrick D (2002) Growth kinetics and hydrolytic enzyme production of *Pseudomonas* spp. isolated from pasteurized milk. *Journal of Dairy Research*, 70:293-296.
- 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.
- Wiking L, Björck L & Nielsen JH (2003). Influence of feed composition on stability of fat globules during pumping of raw milk. *International Dairy Journal*, 13:799-803.
- Wiking L, Bom Frøst M, Larsen LB & Nielsen JH (2002) Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. *Milchwissenschaft*, 57:190-194.
- Zacharov EH & Helpert M (2007) Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw Milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:7162-7168.