Artigo Técnico

INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* 041 EM LABNEH[1]

Influence of enzymatic activity of *Pseudomonas Fluorescens* 041 in Labneh

Andreza Angélica FERREIRA[2]
Karine de Almeida MARQUES[3]
João Batista BARBOSA[4]
Eliane Maurício Furtado MARTINS[5]
Cláudia Lúcia de Oliveira PINTO[6]
Maurilio Lopes MARTINS[7*]

SUMÁRIO

A refrigeração do leite proporciona a seleção de bactérias psicrotróficas deteriorantes produtoras de enzimas termoresistentes que podem comprometer a qualidade do leite e derivados. O objetivo deste trabalho foi avaliar as implicações causadas pela atividade enzimática de *Pseudomonas fluorescens* 041 na produção de Labneh. O leite pasteurizado foi inoculado intencionalmente com, aproximadamente, 10^6 UFC.mL^{-1} de *P. fluorescens* 041 e Labneh foi produzido imediatamente após inoculação no leite (tempo 0) e após 48, 72 e 96 horas de inoculação e armazenamento a 4 °C. A qualidade físico-química do leite, do Labneh e do soro resultante da fabricação foi determinada. O rendimento prático, o rendimento técnico ajustado e o aproveitamento final de sólidos no Labneh em relação ao volume de leite (coeficiente GL) também foram avaliados. Constatou-se alterações nas características físico-químicas do soro e do Labneh fabricado com leite armazenado a partir de 48 horas. Também, observou-se um aumento significativo em litros de leite destinado à produção de um quilo do produto ao longo do tempo de estocagem do leite inoculado com *P. fluorescens* 041, sendo os rendimentos prático, técnico ajustado e o coeficiente GL afetados pelo fator tempo. Portanto, a redução do tempo de estocagem do leite sob refrigeração e a prevenção da contaminação da matéria-prima por meio da adoção de boas

1 Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Campus Rio Pomba (IF Sudeste MG). Avenida Dr. José Sebastião da Paixão, s/n, Bairro Lindo Vale, caixa postal 45. Rio Pomba, Minas Gerais, Brasil. CEP: 36180-000
2 Tecnóloga em Laticínios, Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Agrárias, Rio Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. E-mail: andreza88@gmail.com
3 Tecnóloga em Laticínios, Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos. IF Sudeste MG, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio Pomba, Minas Gerais, Brasil. E-mail: karyyny@gmail.com
4 Tecnólogo em Laticínios, Doutorando em Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. E-mail: joaotla@yahoo.com.br
5 Economista Doméstica, Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos. IF Sudeste MG, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio Pomba, Minas Gerais, Brasil. E-mail: eliane.martins@ifsudestemg.edu.br
6 Farmaceutica e Bioquímica, Doutora em Microbiologia Agrícola. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG/UREZM, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E-mail: claudia.epamig@gmail.com
7 Tecnólogo em Laticínios, Doutor em Microbiologia Agrícola. IF Sudeste MG, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio Pomba, Minas Gerais, Brasil. CEP: 36180-000. E-mail: maurilio.martins@ifsudestemg.edu.br
* Autor para correspondência: Avenida Dr. José Sebastião da Paixão, s/n, Bairro Lindo Vale, caixa postal 45. Rio Pomba, Minas Gerais, Brasil. CEP: 36180-000. E-mail: maurilio.martins@ifsudestemg.edu.br

Recebido/ Received: 08/09/2011
Aprovado / Approved: 25/10/2011

práticas na cadeia do leite são medidas a serem adotadas para assegurar a qualidade e o rendimento do produto final.

Termos para indexação: leite cru refrigerado; bactérias psicrotróficas; deterioração.

SUMMARY

Refrigeration of milk in farms permits selection of psychrotrophic bacteria, that with its enzymatic activity, compromise quality of dairy products. The aim of this work was to evaluate the implications caused by enzymatic activity of *Pseudomonas fluorescens* 041 in production of Labneh. Pasteurized milk was inoculated with 10^6 CFU.mL^{-1} of *P*seudomonas *fluorescens* 041. Labneh was produced immediately after inoculation of milk and after storage of inoculated milk at 4 °C per 48 hours, 72 hours and 96 hours. Physical-chemistry quality of milk and Labneh whey was determined, as well as the economical yield, technical yield and GL coefficient. It was observed alterations in physical-chemistry characteristics of whey and of Labneh produced with milk storaged after 48 hours. It was verified increase of milk volume used to produce Labneh, being the economical and technical yields and GL coefficient affected by time. Therefore, reduction of storage time of milk under refrigeration and adequate hygiene of equipments and milking place are practices that must be adopted in order to ensure quality and yield of final dairy product.

Index terms: cooled raw milk; psychrotrophic bacteria; spoilage.

1 INTRODUÇÃO

O leite constitui um meio de cultura ideal para a multiplicação de micro-organismos patogênicos e deterioradores considerando seu alto valor nutricional, alto teor de água e pH próximo da neutralidade (FRANK, 1997; ARCURI et al., 2006).

A qualidade microbiológica do leite é influenciada pela saúde do rebanho e pela higiene praticada na cadeia produtiva (FAGUNDES et al., 2006). Com o objetivo de propiciar a melhoria da qualidade do leite, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento implementou a Instrução Normativa nº 51, em vigor a partir de 01 de julho de 2005 com o estabelecimento da coleta do leite a granel em todo território nacional (BRASIL, 2002). De acordo com essa Instrução, o leite deve ser armazenado na propriedade rural em tanques de refrigeração por expansão direta até a temperatura de 4 °C e quando for utilizada refrigeração por imersão dos latões em tanques, o limite de temperatura é de 7 °C, sendo que o intervalo entre a ordenha inicial e a recepção no estabelecimento que processará o leite deverá ser de até 48 horas, e o transporte feito em carro com tanque isotérmico à temperatura máxima de 10 °C.

As condições higiênicas de produção, armazenamento, transporte e refrigeração nas diferentes etapas da cadeia produtiva do leite devem ser adequadas para minimizar a contaminação microbiana e a multiplicação de bactérias psicrotróficas (PINTO et al., 2006). No leite obtido sob condições sanitárias adequadas, os psicrotróficos representam menos de 10% da microbiota total do produto, comparado a mais de 75% quando obtido sob condições não-higiênicas (NIELSEN, 2002).

O leite cru recém-ordenhado é composto por uma microbiota predominantemente Gram-positiva. No entanto, as condições de higiene, transporte e estocagem do leite cru refrigerado promovem uma alteração dessa microbiota para predominantemente Gram-negativa (MARTINS, 2003). Pinto (2004), em um estudo sobre bactérias psicrotróficas proteolíticas, constatou que bactérias Gram-negativas constituíram 84,6% do total de isolados do leite cru refrigerado. Essa microbiota é representada principalmente, por espécies dos gêneros *Pseudomonas, Achromobacter, Aeromonas, Serratia, Alcaligenes, Chromobacterium, Enterobacter, Hafnia* e *Flavobacterium* spp. (PINTO, 2004; MUNSCH-ALATOSSAVA; ALATOSSAVA, 2006).

Os micro-organismos psicrotróficos mesmo em temperaturas abaixo de 10 ºC encontram um ambiente favorável para sua multiplicação, independente da sua temperatura ótima de crescimento. Além disso, possuem uma ampla faixa de temperatura de crescimento, que varia de 2 °C até, aproximadamente, 30 °C, sendo 25 °C a temperatura ótima para a maioria das espécies (LORENZETI, 2006).

Os processos de pasteurização inativam a maioria dos micro-organismos presentes inicialmente no leite cru. Entretanto, a multiplicação de bactérias psicrotróficas possibilita a produção de proteases e lipases resistentes à pasteurização, que estão associadas a alterações sensoriais e tecnológicas indesejáveis

no leite e seus derivados (SILVEIRA et al, 2002; LORENZETI, 2006).

Machado et al. (2007) verificaram por meio de um estudo sobre a termoestabilidade do leite integral, que amostras de leite inoculadas com população semelhante de psicrotróficos proteolíticos apresentaram estabilidade térmica em tempos de estocagem diferentes, demonstrando que o leite inoculado com população entre 6,0 e 7,5 x 10^4 UFC.mL^{-1} de *Hafnia alvei* ou *Enterobacter* sp. permaneceu estável até 18 dias de análise e o leite inoculado com 3,3 x 10^4 UFC.mL^{-1} de *P. fluorescens* perdeu a estabilidade no 11° dia de estocagem a 4 °C.

Espécies do gênero *Pseudomonas* constituem importantes agentes de deterioração do leite cru refrigerado (ENEROTH et al., 2000; PINTO, 2004), por produzirem enzimas deterioradoras termoresistentes e possuírem, dentre as bactérias psicrotróficas, o menor tempo de geração a temperaturas compreendidas entre 0 ºC e 7 ºC (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997). A multiplicação dos micro-organismos psicrotróficos em temperatura de refrigeração é associado ao alto teor de ácidos graxos insaturados na membrana celular, o que confere maior fluidez em temperaturas de refrigeração possibilitando trocas com o meio extracelular e atividade metabólica mesmo em baixas temperaturas (JAY, 2002).

P. fluorescens é a espécie isolada com maior frequência de produtos lácteos refrigerados (COUSIN, 1982; PINTO et al., 2007), dentre as espécies do gênero. Esta bactéria produz proteases e lipases que causam vários problemas tecnológicos e econômicos para a indústria de laticínios como alterações na aparência, odor e sabor do leite e derivados, geleificação do leite UHT, instabilidade térmica nos derivados do leite e perdas de rendimento durante a produção de queijos devido à perda de finos no soro (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; PINTO, 2004; MARTINS, 2007; PINTO et al., 2007).

Segundo Cardoso (2006), as indústrias de laticínios são afetadas por perdas econômicas devido a redução de rendimento de queijos, uma vez que as proteases degradam a micela de caseína aumentando compostos solúveis no soro e as lipases hidrolisam a gordura do leite liberando ácidos graxos, comprometendo as propriedades físico-químicas e sensoriais do produto final. De acordo com Furtado (2005), se ocorrer uma formação expressiva de ácidos graxos livres, estes podem inibir o crescimento da cultura lática usada na fabricação de derivados lácteos, o que não é desejável do ponto de vista tecnológico.

Barbosa et al. (2008) constataram uma redução média no rendimento técnico ajustado, em L Kg^{-1}, de 1,55 para o queijo Minas Frescal e 2,07 para o queijo Minas Padrão, após 72 horas de incubação do leite inoculado com *P. fluorescens* 041 a 4 °C.

Labneh é um produto lácteo fermentado muito consumido no Oriente Médio, cuja origem é advinda do iogurte com remoção parcial do soro e possui características de maciez e consistência semelhante a creme e é produzido por bactérias láticas termofílicas, as quais fermentam a lactose presente no leite com produção de ácido lático. Por se tratar de um produto dessorado, Labneh pode ter seu rendimento influenciado pelas perdas de finos no soro, semelhante ao que pode acontecer com o queijo Petit Suisse, e apresentar sabores desagradáveis em virtude da ação das enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas por micro-organismos psicrotróficos.

Diante das mudanças implementadas no setor lácteo nacional no que se refere à temperatura e tempo de armazenamento do leite, este trabalho teve como objetivo avaliar as implicações causadas pela atividade enzimática de *P. fluorescens* na produção de Labneh, produto lácteo fermentado dessorado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Análise Físico-química e Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Campus Rio Pomba (IF Sudeste MG).

2.1 Estirpe de *Pseudomonas fluorescens* e condições de cultivo

Utilizou-se neste estudo a estirpe de *P. fluorescens* 041 isolada por Pinto (2004) a partir de leite cru refrigerado. Esta cultura foi doada pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa ao IF Sudeste MG.

Para a realização dos experimentos, a cultura de *P. fluorescens* 041, estocada a -20 ºC em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) (Merck, Darmstadt, Germany) adicionado de 20% de glicerol, foi previamente ativada a 25 °C por 18 horas, por duas vezes consecutivas, em um volume de 5 mL de caldo BHI (Merck).

2.2 Fabricação de Labneh

Labneh foi fabricado no Laboratório de Microbiologia do IF Sudeste MG conforme a metodologia descrita por Lopes et al. (2006), sendo pasteurizados 20 litros de leite a 75 °C por 15 segundos para a sua fabricação. Posteriormente, este volume foi fracionado em quantidades de cinco

litros as quais foram inoculadas com, aproximadamente, 10^6 UFC.mL^{-1} de *P. fluorescens* 041. Labneh foi produzido imediatamente após a inoculação utilizando-se uma fração de cinco litros de leite o que correspondeu ao tempo zero. As demais frações foram inoculadas e armazenadas a 4 °C por 48 horas, 72 horas e 96 horas para a produção após cada um destes tempos de armazenamento. Os experimentos foram realizados em três repetições.

2.3 Análises do leite pasteurizado, do Labneh e do soro

Previamente à fabricação, uma alíquota do leite inoculado armazenado a 4 °C por 48, 72 e 96 horas foi coletada, sendo realizadas em duplicata, segundo a Instrução Normativa n.°68 (BRASIL, 2006), as análises de gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, acidez titulável e proteína. Além disso, previamente à fabricação, em cada um dos tempos de armazenamento, foi coletada assepticamente uma alíquota do leite inoculado e analisada quanto ao número de bactérias psicrotróficas proteolíticas viáveis em Ágar Caseinato para Métodos Padronizados (SMCA) com incubação a 6,5 ± 0,5ºC, por 10 dias (FRANK et al., 1992).

As análises de gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, acidez titulável, proteína, pH e resíduo mineral fixo (RMF) do Labneh e do soro proveniente de sua produção foram realizadas segundo Brasil (2006).

2.4 Avaliação do rendimento de produção de Labneh fabricado com leite inoculado intencionalmente com *P. fluorescens* 041

Para avaliação do rendimento, Labneh foi pesado após a fabricação e o rendimento prático foi expresso em litros de leite por quilo de produto obtido (L kg^{-1}). Esse cálculo foi feito dividindo-se o volume total de leite (L) pelo peso total do Labneh (kg). O rendimento técnico ajustado foi determinado de acordo com a equação: $V(100 - U_p)/P \times ST$, sendo (V) o volume de leite em litros, (U_p) o percentual de umidade pretendida ou 76,7% para o Labneh, (P) quilos de Labneh produzidos e (ST) o teor de sólidos totais do Labneh (FURTADO, 2005). O aproveitamento final de sólidos no Labneh em relação a cada litro de leite usado na fabricação (coeficiente GL) foi determinado utilizando a equação: ST x P x 10/V, sendo (ST) o teor de sólidos totais do Labneh, (P) quilos de Labneh produzidos e (V) o volume de leite utilizado na produção em litros (FURTADO, 2005).

2.5 Análises estatísticas

Os dados de rendimento da produção de Labneh foram submetidos à análise de regressão. Os modelos foram escolhidos com base no coeficiente de determinação e na significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se o Teste t ao nível de 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico SAEG 9.0 (2005).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que a partir de 48 horas de incubação, a 4 °C, o leite usado para produção de Labneh inoculado com *P. fluorescens* 041 apresentava teores de proteína e extrato seco desengordurado (Tabela 2) em desacordo com os padrões estabelecidos pela Instrução Normativa n.° 51 (BRASIL, 2002), que preconiza mínimos de 2,9 % e 8,4 %, respectivamente.

Na contagem de psicrotróficos proteolíticos, constatou-se que o leite inoculado apresentou aumento de um ciclo logarítmico na população destes micro-organismos a cada 24 horas de incubação, a 4 °C, o que indicou a multiplicação de *P. fluorescens* 041 (Tabela 1).

Após 72 horas de incubação do leite com *P. fluorescens* 041, a 4 °C, foi verificada fragilidade na formação da coalhada (Figura 1) e elevada sinérese na massa destinada a fabricação de Labneh (Figura 2).

Houve variação nos percentuais de gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, proteína e resíduo mineral fixo (RMF) do Labneh no decorrer do tempo de incubação do leite inoculado com *P. fluorescens* 041 (Tabela 2). Verificou-se ainda redução do teor médio de proteínas neste produto de 1,35%, enquanto que no soro o teor de proteínas aumentou de 1,40% no tempo zero para 1,48% após 72 h de armazenamento do leite inoculado, o que condiz com a redução no rendimento do processo (Figura 3). Esses resultados provavelmente podem estar associados à atividade de proteases produzidas por *P. fluorescens* 041 sobre as micelas de caseína do leite, com conseqüente aumento das perdas de compostos solúveis no soro, enquanto, as lipases provavelmente hidrolisaram a gordura, com liberação de ácidos graxos no soro.

O rendimento prático, o rendimento técnico ajustado e o coeficiente GL do Labneh, foram alterados significativamente (p<0,05) em função do tempo de armazenamento do leite inoculado com *P. fluorescens* 041 a 4 °C (Figura 3), sendo evidente a perda de rendimento ao longo do tempo de incubação (Figura 3A). Por meio do cálculo do rendimento técnico ajustado também foi detectado aumento da perda de

Tabela 1 – Média da composição físico-química e contagem de bactérias psicrotróficas proteolíticas (n=3) do leite pasteurizado usado para a produção de Labneh após inoculação com *P. fluorescens* 041

Tempo (horas)	Gordura (%)	EST (%)	ESD (%)	Acidez titulável (% ácido lático)	Proteína (%)	Psicrotróficos ($UFC.mL^{-1}$)
0	3,50 ±0,10	12,00 ±0,30	8,50 ±0,30	0,15 ±0,01	2,90 ±0,10	$1,2 \times 10^6$
48	3,50 ±0,10	11,80 ±0,24	8,30 ±0,20	0,16 ±0,01	2,60 ±0,08	$1,0 \times 10^7$ (estimado)
72	3,50 ±0,10	11,59 ±0,20	8,09 ±0,20	0,16 ±0,01	2,50 ±0,20	$2,2 \times 10^8$ (estimado)
96	3,60 ±0,10	11,90 ±0,40	8,30 ±0,48	0,16 ±0,01	2,42 ±0,03	$2,5 \times 10^9$ (estimado)

(EST): extrato seco total; (ESD): extrato seco desengordurado.

Tabela 2 – Média da composição físico-química de Labneh produzido a partir de leite inoculado com *P. fluorescens* 041

Tempo (horas)	Gordura (%)	EST (%)	ESD (%)	Acidez titulável (% ácido lático)	Proteína (%)	pH	RMF (%)
0	14,80 ±0,80	28,48 ±2,20	13,68 ±1,30	0,71 ±0,13	9,29 ±1,60	4,51 ±0,02	1,63 ±0,60
48	12,00 ±0,70	26,63 ±2,50	14,63 ±1,20	0,66 ±0,13	9,26 ±2,00	4,53 ±0,02	1,50 ±0,60
72	12,80 ±0,30	25,38 ±2,70	12,58 ±2,40	0,76 ±0,10	9,06 ±1,20	4,41 ±0,02	1,27 ±0,40
96	11,50 ±0,80	25,81 ±1,40	14,31 ±1,30	0,61 ±0,07	7,94 ±0,60	4,29 ±0,01	0,95 ±0,09



Figura 1 – Diferenças de fragilidade observadas durante a formação da coalhada de Labneh produzido com leite inoculado com *P. fluorescens* 041 e armazenado a 4 °C. Controle, leite imediatamente após inoculação com *P. fluorescens* 041 - tempo 0 (A), 72 horas após a inoculação (B), 96 horas após a inoculação (C).

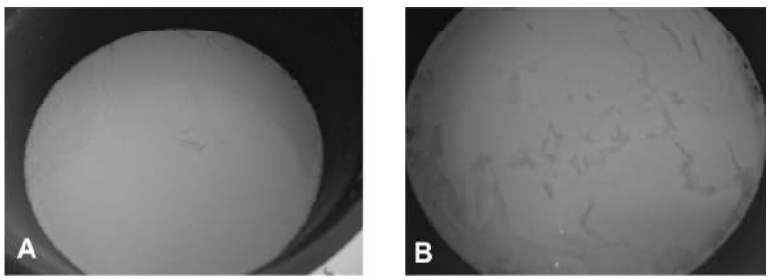

Figura 2 – Sinérese observada durante a formação da coalhada de Labneh produzido com leite inoculado com *P. fluorescens* 041 e armazenado a 4 °C. Controle, leite imediatamente após inoculação com *P. fluorescens* 041 - tempo 0 (A), 72 horas após a inoculação (B).

rendimento do Labneh de 0,57 L Kg^{-1} após 96 horas de incubação (Figura 3B), o que se refere à perda real, uma vez que para este cálculo considerou-se os dados das análises físico-químicas relativos à composição do leite, do soro resultante e do Labneh.

O coeficiente GL (Figura 3C), refere-se ao aproveitamento de sólidos totais por litro de leite destinado a produção de Labneh. Assim, foi constatada uma redução do teor de sólidos ao longo do tempo de incubação do leite inoculado com *P. fluorescens* 041, confirmando a perda de rendimento.

Desta forma, o rendimento prático, o rendimento técnico ajustado e o coeficiente GL foram influenciados significativamente (p<0,05) quanto à perda de rendimento ao longo do tempo de incubação do leite, a 4 ºC. Barbosa et al. (2009), também constataram perda significativa do rendimento na fabricação de queijo Minas Frescal e Minas Padrão fabricados a partir de leite inoculado com *P. fluorescens* 041 ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C.

4 CONCLUSÕES

Alterações na fragilidade da coalhada e elevada sinérese na massa destinada a fabricação de Labneh, bem como perda de rendimento na fabricação a partir de leite inoculado com *P. fluorescens* 041 ao longo do tempo de armazenamento a 4 °C foram constatados. Desta forma, medidas preventivas devem ser adotadas pelas indústrias de laticínios para evitar a contaminação e a multiplicação de *P. fluorescens* no leite cru, a fim de reduzir os prejuízos financeiros decorrentes da redução no rendimento dos produtos lácteos. Práticas higiênicas adequadas, refrigeração rápida do leite cru a temperaturas inferiores a 4 ºC e redução do tempo de estocagem do leite são medidas necessárias para minimizar a multiplicação de bactérias psicrotróficas como *P. fluorescens* no leite cru e prevenir o comprometimento da qualidade da matéria-prima e seus derivados.

AGRADECIMENTOS

A equipe agradece a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro concedido para a execução desta pesquisa e o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa pela doação da estirpe de *P. fluorescens* 041.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCURI, E.F. et al. Qualidade Microbiológica do Leite Refrigerado nas Fazendas.

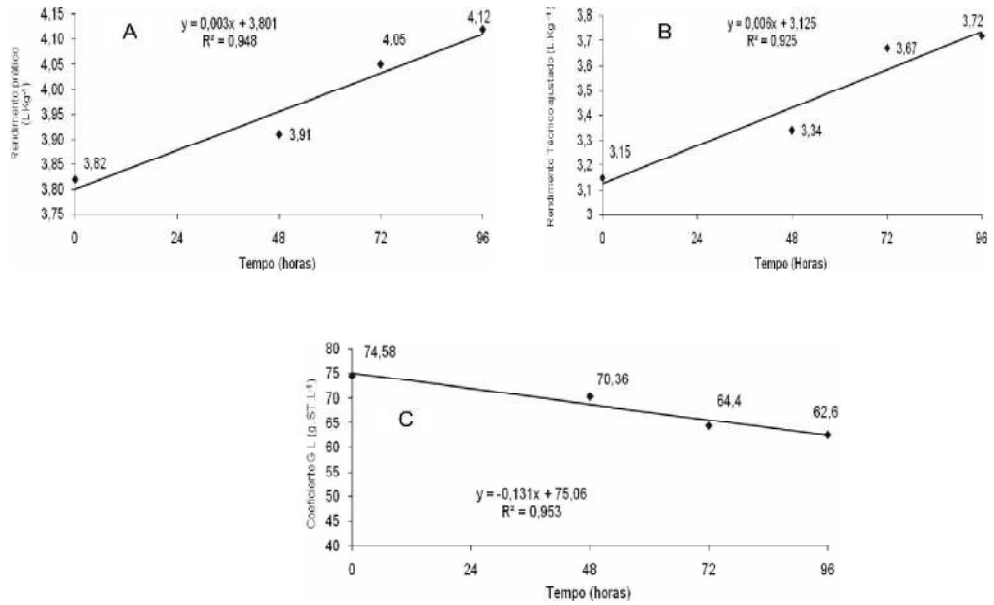

Figura 3 – Rendimento prático (A), rendimento técnico ajustado (B) e coeficiente GL (C) calculados após a fabricação do Labneh a partir de leite pasteurizado imediatamente após inoculação com *P. fluorescens* 041 (tempo zero) e armazenado durante 96 horas, a 4 °C.

Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

BARBOSA, J.B. et al. Perda de rendimento na produção de queijos Minas Frescal e Minas Padrão fabricados a partir de leite contaminado com *Pseudomonas fluorescens*. In: Congresso Nacional de Laticínios, 25, 2008, Juiz de Fora. **Anais**... Juiz de Fora: EPAMIG - Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2008, p.1-8.

BARBOSA, J.B. et al. Avaliação de rendimento da produção dos queijos minas frescal, minas padrão e mussarela fabricados com leite inoculado com pseudômonas fluorescens. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.64, n.371, p.26-33, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de origem Animal. Instrução Normativa n° 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, 20 set. 2002, Seção I, p.13.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, 14 dez. 2006, Seção I, p.8.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrotrófica sobre o rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração.** 43f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, 2006.

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

ENEROTH, A. et al. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, p.99-106, 2000.

FAGUNDES, S.M. et al. Presença de *Pseudomonas* spp. em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.568-572, 2006.

FRANK, J.F. et al. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. (Ed.) **Standard methods for the examination of dairy products**, 16th. American Public Health Association, Washington DC, pp. 271-286, 1992.

FRANK, J.F. Milk and dairy products. In: DOYLE, P., BEUCHAT, R., MONTVILLE, J. **Food Microbiology - Fundamentals and frontiers**, Washington, p.101-116, 1997.

FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção.** São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2005. 200p.

JAY, J.M. **Microbiología Moderna de los Alimentos.** 4. ed. Zaragoza: Editora Acribia. 2002. 615 p.

LOPES, K.O. et al. Tecnologia da fabricação do queijo Labneh e avaliação de suas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 61, n. 352 , p.191-194, 2006.

LORENZETI, D.K. **Influência do tempo e da temperatura no desevolvimento de micro-organismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul**. 2006. 71p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MACHADO, S.G. et al. Termoestabilidade do leite integral inoculado com bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.62, n.357, p.34-38, 2007.

MARTINS, M.L. **Caracterização de protease e lipase de *Pseudomonas fluorescens* e *quorum sensing* em bactérias psicrotróficas isoladas de leite.** 2007. 163p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MARTINS, M.L. **Diversidade de bactérias psicrotróficas proteolíticas de leite e presença do gene que codifica metaloprotease alcalina**. 2003. 51p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

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

PINTO, C.L.O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite UHT**. 2004. 97p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PINTO, C.L.O. et al. Bactérias psicrotróficas e importância de seu controle na cadeia produtiva do leite. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.28, n.238, p.29-37, maio/jun., 2007.

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

SAEG 9.0. **Sistema para Análises Estatísticas-SAEG**. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 2005. Cd Rom. Versão 9.0.

SILVEIRA, I.A. et al. Influência de microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. **Revista Higiene Alimentar.** Disponível em: <http:// www.bichoonline.com.br/artigos/ha0005.htm> Acesso em: 08 ago. 2010.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, p.35-40, 1997.