Artigo DOI: 10.14295/2238-6416.v69i4.333

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROTEASE PRODUZIDA POR *Pseudomonas fluorescens* IB 2312 EM LEITE DESNATADO SUBMETIDO AO PROCESSO DE HOMOGENEIZAÇÃO À ALTA PRESSÃO

Proteolytic activity of protease produced by *Pseudomonas fluorescens* IB 2312 in skimmed milk subject to the process of high pressure homogenization

Claudia Regina Gonçalves Pinho[1], Bruno Ricardo de Castro Leite Júnior[1], Miguel Meirelles de Oliveira[1], Alline Artigiani Lima Tribst[1], Marcelo Cristianini[1]*

RESUMO

A presença de proteases termorresistentes produzidas por microrganismos psicrotróficos tem sido apontada como fator limitante para a vida útil do leite UHT, além de causar modificações indesejáveis em derivados lácteos. O processo de homogeneização à alta pressão (HAP) é um método não térmico de preservação de alimentos capaz de promover a segurança microbiológica e inativação de algumas enzimas. Desta forma, este trabalhou avaliou a atividade proteolítica de protease produzida por *Pseudomonas fluorescens* em leite UHT desnatado submetido ao processo de homogeneização à alta pressão. As amostras de leite foram adicionadas de 10% de extrato enzimático desta protease e homogeneizadas em pressões de até 300 MPa. Os ensaios demonstraram que pressões da ordem de 300 MPa causaram uma redução de 72,5% na atividade proteolítica. Portanto, o processo à altas pressões resulta em significativa inativação desta enzima termorresistente, o que possivelmente favorece a extensão da vida útil do leite UHT, além de limitar a perda de rendimento e de qualidade de queijos devido a alterações sensoriais indesejáveis de sabor e textura provocada por esta enzima.

Palavras-chave: leite UHT, atividade enzimática, tecnologias emergentes, enzima termorresistente.

1 Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", s/n, 13083-862, Campinas, SP, Brasil. E-mail: brunorclj@gmail.com

* Autor para correspondência

Recebido / Received: 09/05/2014
Aprovado / Approved: 18/06/2014

ABSTRACT

The presence of thermoresistant proteases produced by psychrotrophic microorganisms have been identified as a limiting factor of the UHT milk shelf-life, causing undesirable changes in milk products. High pressure homogenization (HPH) processing is a non-thermal method of food preservation, able to promotes the microbiological safety and inactivation of some enzymes. Thus, this work assessed the proteolytic activity of protease produced by *Pseudomonas fluorescens* in skim milk subjected to high pressure homogenization process. The milk samples were added by the protease enzymatic extract (10% v/v) and subjected to pressures up to 300 MPa. The assays showed that pressures on the order of 300 MPa caused a 72.5% reduction in proteolytic activity. Therefore, the process at high pressures resulted in significant inactivation of this thermoresistent enzyme, which possibly favors the shelf-life extension of the UHT milk and also limits the yield and quality loss of cheeses due to undesirable sensory changes in flavor and texture caused by this enzyme.

Keywords: UHT milk, enzyme activity, emerging technologies, thermoresistent enzyme.

INTRODUÇÃO

O leite é um produto extremamente susceptível à deterioração microbiológica em função das suas características intrínsecas como pH, atividade de água e composição (LEITE JÚNIOR et al., 2011; CAVALCANTE et al., 2013). A proteólise em leite pode ser causada por proteases nativas e também por enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos psicrotróficos, especialmente os do gênero *Pseudomonas* sp. (BAGLINIÈRE et al., 2013).

Pseudomonas fluorescens é uma importante espécie desse gênero e produz uma metaloprotease extracelular que desestabiliza a micela de caseína por hidrólise, afetando a vida de prateleira do leite UHT e a qualidade dos derivados lácteos (PINTO et al., 2010; JONGHE et al., 2011; MACHADO et al., 2013).

Estudos mostram que várias espécies de *Pseudomonas*, quando presentes em número superior a 10^6-10^7 UFC mL^{-1}, produzem proteases extremamente termorresistentes que podem degradar a caseína e reduzir a vida útil do leite UHT durante a estocagem, resultar em perda de rendimento e de qualidade dos queijos devido a alterações sensoriais de sabor e textura (PINTO et al., 2006; BAGLINIÈRE et al., 2012; BAGLINIÈRE et al., 2013), além da formação de biofilme em trocadores de calor conforme descrito por Haun (2004). Além disso, a protease produzida por *P. fluorescens* não é totalmente inativada pelo processo UHT, apresentando valor D a 140 ºC de 1 minuto (CROMIE, 1992).

A homogeneização à alta pressão (HAP) ou alta pressão dinâmica (APD) é um processo não térmico desenvolvido com propósito de garantir a qualidade microbiológica dos alimentos, sem afetar seus atributos sensoriais e nutricionais (TRIBST et al., 2009; PEDRAS et al., 2012; 2014). O efeito da HAP em enzimas foi estudado por diversos autores (LACROIX et al., 2005; WELTI-CHANES et al., 2009; LIU et al., 2009 a,b; LIU et al., 2010 a,b; LEITE JÚNIOR et al., 2014), sendo verificado que o processo é capaz de promover ativação e estabilização de enzimas

(LIU et al., 2009a,b; LIU et al., 2010a; TRIBST et al., 2012a,b). Em outros estudos, entretanto, foi observada apenas inativação enzimática pela HAP (LACROIX et al., 2005; WELTI-CHANES et al., 2009; LEITE JÚNIOR et al., 2014). A diferença entre os resultados obtidos pode ser associado ao uso de diferentes equipamentos e condições de processo (pH, temperatura, complexidade do meio e presença de substratos), como também às características intrínsecas das diferentes enzimas.

Assim como o tratamento térmico, Pinho et al. (2005a) verificaram que o processo de homogeneização a alta pressão a 200 MPa foi capaz de inativar 6 ciclos logarítmicos de *P. fluorescens*. Entretanto, o principal problema tecnológico existente em leite relacionado aos microrganismos psicrotróficos é a sua protease. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade proteolítica da protease produzida por *P. fluerencens* IB 2312 em leite desnatado submetido ao processo de homogeneização à alta pressão.

MATERIAL E MÉTODOS

Leite desnatado

Os ensaios foram realizados utilizando-se leite desnatado UHT (0,48 ± 0,03 % de gordura) proveniente de um único lote e adquirido em estabelecimento comercial do município de Campinas, SP.

Enzima de *P. fluorescens*

A cultura de *P. fluorescens* utilizada na produção da enzima empregada nos ensaios foi a IB 2312 do Instituto Biológico de São Paulo.

A cultura congelada em Skim Milk (Oxoid, UK) foi reativada em dois repiques sucessivos em caldo TSB (Oxoid, UK), com incubação a 30 °C por 24 horas a cada repicagem. Após a reativação da cultura, a produção da enzima consistiu em inocular uma alíquota de 10 mL de *P. fluorescens* em 400 mL de caldo TSB (Oxoid, UK) e posterior incubação a 30 °C por 48 horas. Após este período, o caldo foi centrifugado duas vezes a 4.000 rpm por 20 minutos e em seguida, aplicou-se um tratamento térmico (80 °C por 30 segundos) de modo a eliminar as células vegetativas. O extrato enzimático assim obtido foi armazenado a -18 °C até o momento de sua utilização.

Equipamento e processamento de homogeneização à alta pressão (HAP)

O equipamento de HAP utilizado foi um homogeneizador contínuo (FGP7400H:350 - Stansted Fluid Power Ltd., Essex, Inglaterra) com pressão de operação variando de 0 a 300 MPa e vazão de, aproximadamente, 270 mL min^{-1}. O homogeneizador é dotado de dois pistões intensificadores com acionamento hidráulico a óleo, movidos por um motor que aciona uma bomba que gera a pressurização necessária no fluido, controlada por uma válvula manual.

Na saída do equipamento de HAP foi acoplado um trocador de calor, com o objetivo de reduzir a temperatura das amostras após a saída da válvula, minimizando os efeitos térmicos do processo. A temperatura do leite durante o processamento foi monitorada por três termopares acoplados na entrada (T1), na saída da válvula (T2) e na saída do trocador de calor (T3).

Leite UHT desnatado adicionado de 10 % (v/v) de caldo contendo a protease de *P. fluorescens* foi submetido ao processamento de HAP nas pressões de 200, 250 e 300 MPa. Após o processo as amostras foram coletadas em recipientes estéreis. Os ensaios foram realizados em três repetições em dias diferentes. Foram preparadas, para controle do processo, amostras não processadas

com adição de enzima (AP_oCE) e amostras sem adição de enzima, sendo parte delas processadas (AP_xSE) e parte mantida sem processo (AP_oSE). Estas amostras foram avaliadas para determinação de eventual atividade proteolítica oriunda do leite UHT utilizado nos experimentos.

Avaliação da atividade proteolítica após processamento por HAP

A atividade proteolítica sobre as amostras processadas foi determinada por meio de método espectrofotométrico descrito por Gomes (1995). Para isto, as amostras de leite UHT desnatado contendo a protease de *P. fluorescens* (10 % v/v) processado por HAP em diferentes pressões foram incubadas a 37 ºC por 24 horas. Simultaneamente, foram incubadas amostras de leite processadas e sem enzima (AP_xSE), amostras de leite não processadas com adição de enzima (AP_oCE) e amostras de leite não processadas sem enzima (AP_oSE) e um branco com água deionizada adicionada de 10% de caldo (Br Enz). Após o período de incubação, as amostras foram submetidas a uma diálise para separação dos peptídeos obtidos da hidrólise da caseína.

Para a realização da diálise das amostras, foram utilizadas membranas de celulose industrial (Viskaze, Brasil), utilizadas como envoltório de alimentos embutidos, com diâmetro achatado de 32 mm e diâmetro aberto de 20 mm. A membrana de diálise utilizada tem capacidade de retenção específica de 12.400 Daltons, portanto, permeável à maioria dos fragmentos oriundo da atividade proteolítica (< 12.220 Daltons, segundo Prata (1991)).

Os sacos de diálise foram preparados conforme descrito por Prata (1991): unidades de 25 cm de comprimento foram lavadas, fervidas em água deionizada e estocadas sob refrigeração por, no máximo, 15 dias. Os sacos de diálise foram fechados com um nó em uma das suas extremidades e, então, adicionados de 10 mL da amostra, posteriormente, a outra extremidade também foi fechada. Os sacos foram então lavados com água deionizada e colocados em tubos de ensaio contendo 20 mL de água destilada. A diálise foi realizada a 37 ºC por 2 horas.

Após esse período, os sacos de diálise foram retirados e procedeu-se a reação com o dialisado (rico em aminoácidos e peptídeos livres) com ninidrina para obtenção de um complexo colorido conforme metodologia descrita por Gomes (1995). Para isto, 1 mL de dialisado foi adicionado a 1 mL da solução de ninidrina (0,2 % em água) e a mistura foi aquecida a 100 ºC por 15 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 3 mL de etanol 60%, e, em seguida, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm. O branco das amostras foi preparado da mesma maneira que os demais, porém utilizando-se água destilada ao invés de leite. Esta alteração nas proporções dos reagentes foi validada através da construção de uma curva padrão de alanina (Sigma, USA), para a qual se obteve um aumento de absorbância linear com o aumento de concentração do aminoácido, com R^2 de 0,99.

A atividade enzimática percentual residual (A.E.) foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$A.E.= \frac{(Abs\ AP_xCE - Abs\ AP_xSE - Abs\ BrEnz)}{(Abs\ AP_oCE - Abs\ AP_oSE - Abs\ BrEnz)} X100 \quad (1)$$

Onde:

Abs AP_xCE: absorbância da amostra processada à pressão "x" com enzima;

Abs AP_xSE: absorbância da amostra processada à pressão "x" sem enzima;

Abs Br Enz: absorbância do branco de água com enzima;

Abs AP_oCE: absorbância da amostra sem processar com enzima;

Abs AP_oSE: absorbância da amostra sem processar sem enzima.

Análise estatística

O processo e as análises foram realizados em três repetições e cada análise foi realizada em triplicata. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o software STATISTICA 5.0 por meio da análise de variância ANOVA e teste de média (Tukey) ao nível de 5 % de probabilidade. Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Monitoramento da temperatura de processo

O processo de HAP causa aumento de temperatura dos alimentos processados em função do intenso cisalhamento, turbulência, impacto e cavitação (HAYES; KELLY, 2003; PINHO et al., 2011), que ocorrem imediatamente após a passagem pela válvula de homogeneização. O monitoramento de temperaturas durante o processo é importante para mensurar o quanto os efeitos observados no alimento ocorreram em função deste aumento de temperatura. A temperatura do leite na entrada da válvula de homogeneização foi de 28,4 ºC ± 1,4 ºC.

A Figura 1 apresenta as temperaturas registradas após a passagem do leite na saída da válvula de homogeneização em função da pressão de processo. Constatou-se correlação linear entre a pressão aplicada e o aumento da temperatura, com um aumento médio de 18,3 ºC a cada 100 MPa.

Após sair da válvula de homogeneização, o leite processado por HAP apresentou uma temperatura máxima de 83,7 ºC (300 MPa). Em seguida, o leite foi imediatamente resfriado no trocador de calor e o tempo de residência em altas temperaturas foi de, aproximadamente, 0,7 s. A temperatura do trocador de calor foi regulada para obtenção da mesma temperatura de saída em todos os tratamentos (média de todos os tratamentos de 28,6 ± 1,6 ºC, T3). Para a maior temperatura (83,7 ºC) obtida no processo a 300 MPa, o tempo necessário para que a amostra atingisse a temperatura final foi de 5 segundos, sendo inferior nos processos realizados nas demais pressões.

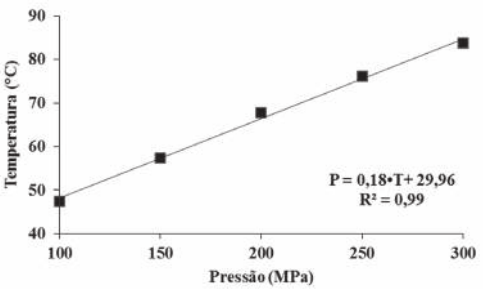

Figura – Temperatura registrada na saída da válvula de homogeneização/entrada do trocador de calor dos ensaios realizados em cada uma das pressões com uma temperatura constante de entrada de 28,4 ± 1,4 °C após o processo de HAP

Avaliação da atividade proteolítica da protease de *P. fluorescens* submetida ao processo de HAP

A atividade proteolítica na amostra de leite não processada a HAP foi de 216,0 ± 5,0 U mL^{-1} e a atividade enzimática proteolítica residual das amostras processadas a HAP em diferentes pressões é mostrada na Tabela 1.

As amostras processadas em pressões < 200 MPa apresentaram intensa taxa de coagulação, não sendo possível obter um dialisado homogêneo e, consequentemente, leituras de atividade enzimática adequadas. Esta intensa coagulação pode ter sido causada pelo aumento da atividade proteolítica após a homogeneização à alta pressão, especialmente considerando-se que o processo foi previamente descrito como capaz de aumentar a atividade de enzimas similares (TRIBST et al., 2012a; LEITE JÚNIOR et al., 2014). Em pressão de 200 MPa, foi observado uma atividade enzimática igual a da amostra

controle e, em pressões superiores, ocorreu uma inativação parcial da enzima, com redução máxima de 72,50 % de atividade após HAP a 300 MPa.

Tabela 1 – Percentual de atividade enzimática proteolítica em leite UHT desnatado após processamento de HAP

Pressão (MPa)	A. E. (%)*
Controle**	100,00 ± 9,8[a]
200	102,53 ± 4,5[a]
250	43,58 ± 2,5[b]
300	27,50 ± 5,1[b]

* valor médio (n = 3); médias com letras diferentes diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ($p<0,05$). **Controle: Amostra de leite UHT adicionado da protease de *P. fluorescens* IB 2312 não submetida ao processo de HAP.

Alguns trabalhos prévios avaliaram o efeito da HAP sobre proteases nativas e microbianas presentes no leite. Hayes et al. (2005) observaram inativações de 85%, 90% e 96% de proteases endógenas do leite em processos de HAP realizados a 150, 200 e 250 MPa, respectivamente. Já Hayes; Kelly (2003) observaram inativação de 65% da plasmina presente após processamento a 200 MPa. A comparação destes resultados com os obtidos no presente estudo mostram que a protease de *P. fluorescens* é mais resistente à HAP do que as proteases endógenas do leite.

Considerando-se que o processamento de HAP é proposto para substituição do tratamento térmico de leite com melhor retenção de nutrientes e características sensoriais, ele precisa ser realizado em pressões superiores a 250 MPa, para garantia da inativação adequada de microrganismos (PINHO et al, 2004; PINHO et al., 2005ab; PEDRAS et al, 2014). Assim, é possível concluir que nas condições de processo de HAP requeridas para substituição da pasteurização de leite, certamente ocorrerá uma redução da atividade proteolítica de *P. fluorescens* IB 2312. O leite obtido desta forma passa a ser interessante para a produção de derivados lácteos, especialmente queijos, para os quais a redução da atividade proteolítica permite a obtenção de um produto com melhor rendimento devido a menor perda de peptídeos para soro promovendo manutenção da rede do gel rígida e consistente, além de melhorar o perfil sensorial, possivelmente, com menores alterações durante a estocagem limitando o desenvolvimento de *off flavours* e texturas quebradiças (LEITE JÚNIOR et al., 2014).

Além disso, os resultados destacam a possibilidade de inclusão da homogeneização a alta pressão como um pré-tratamento para produção de leite UHT, visto que causa uma inativação enzimática superior às obtidas neste processamento térmico, e, assim, pode garantir uma maior estabilidade do leite durante a estocagem.

CONCLUSÕES

O processo de homogeneização à alta pressão é capaz de reduzir a atividade proteolítica das amostras de leite desnatado adicionadas de protease produzida por *P. fluorescens* IB 2312 em pressões superiores a 250 MPa, sendo que pressões da ordem de 300 MPa causam uma redução de cerca de 72,5% na atividade enzimática. Portanto, a tecnologia de HAP apresenta aplicabilidade para ser utilizada como uma operação unitária para redução da atividade de protease de *P. fluorescens*, com possível extensão da vida de prateleira do leite e derivados.

REFERÊNCIAS

BAGLINIÈRE, F. et al. Quantitative and qualitative variability of the caseinolytic potential of different strains of *Pseudomonas fluorescens*: Implications for the stability of casein micelles of UHT milks during their storage. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2593-2603, 2012.

BAGLINIÈRE, F. et al. Proteolysis of ultra high temperature-treated casein micelles by AprX enzyme from *Pseudomonas fluorescens* F induces their destabilization. **International Dairy Journal**, v. 31, n. 2, p. 55-61, 2013.

CAVALCANTE, D. A. et al. Improvement of the raw milk microbiological quality by ozone treatment. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 4, p. 2017-2021, 2013.

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

GOMES, M. I. F. V. **Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade proteica do leite esterilizado "longa vida"**. 1995. 108f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

HAUN, M. A. D. **Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens***. 2004. 71f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

HAYES, M. G.; KELLY, A. L. High pressure homogenization of milk (b) effects on indigenous enzymatic activity. **Journal of Dairy Research**, v. 70, n. 3, p. 307-313, 2003.

HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potencial applications of high pressure homogenization in processing of liquid milk. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 1, p. 25-33, 2005.

JONGHE, V. et al. Influence of Storage Conditions on the Growth of *Pseudomonas* Species in Refrigerated Raw Milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 460-470, 2011.

LACROIX, N.; FLISS, I.; MAKHLOUF, J. Inactivation of PME and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. **Food Research International**, v. 38, n. 5, p. 569-576, 2005.

LEITE JÚNIOR, B. R. C. et al. Aplicação das boas práticas agropecuárias no processo de ordenha em uma propriedade rural do município de Rio Pomba, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 380, p. 31-39, 2011.

LEITE JÚNIOR, B. R. C.; TRIBST, A. A. L.; CRISTIANINI, M. Proteolytic and milk-clotting activities of calf rennet processed by high pressure homogenization and the influence on the rheological behavior of the milk coagulation process. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v. 21, n. 1, p. 44-49, 2014.

LIU, W. et al. Characterization and high-pressure microfluidization-induced activation of polyphenoloxidase from Chinese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5376-5380, 2009a.

LIU, W. et al. Activation and conformational changes of mushroom polyphenoloxidase by high pressure microfluidization treatment. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 2, p. 142-147, 2009b.

LIU, W. et al. The effect of dynamic high-pressure microfluidization on the activity, stability and conformation of trypsin. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 616-621, 2010a.

LIU, W. et al. The effect of dynamic high pressure microfluidization on the activity of papain. **Gaoya Wuli Xuebao/Chinese Journal of High Pressure Physics**, v, 24, n. 2, p. 129-135, 2010b.

MACHADO, S. G.; BAZZOLLI, D. M. S.; VANETTI, M. C. D. Development of a PCR

method for detecting proteolytic psychrotrophic bacteria in raw milk. **International Dairy Journal**, v. 29, n. 1, p. 8-14, 2013.

PEDRAS, M. M. et al. The effect of high pressure homogenization on microorganisms in milk. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 1-5, 2012.

PEDRAS, M. M.; TRIBST, A. A. L.; CRISTIANINI, M. Effects of high-pressure homogenisation on physicochemical characteristics of partially skimmed milk. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 861-866, 2014.

PINHO, C. R. G. et al. Avaliação do escoamento de leite desnatado durante homogeneização a alta pressão (HAP) por meio de fluidodinâmica computacional (CFD). **Brazilian Journal Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 232-240, 2011.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HIGH PRESSURE BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY, 3., 2004, Rio de Janeiro. **Proceedings…** Rio de Janeiro: IAHPBB, 2004. 1 CD-ROM.

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* in skim milk. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 6., 2005, Campinas. **Anais...** Campinas: SBCTA, 2005a. 1 CD-ROM

PINHO, C. R. G.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. Ultra High Pressure Homogenization Inactivation of *Lactobacillus helveticus* in skim milk. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 6., 2005, Campinas. **Anais...** Campinas: SBCTA, 2005b. 1 CD-ROM.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite *in natura* refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PINTO, U. M. et al. The proteolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* 07A isolated from milk is not regulated by quorum sensing signals. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 91-96, 2010.

PRATA, L. F. **Espectrofotometria de Absorção na região ultravioleta para detecção de atividade proteolítica em leite e derivados.** 1991. 101f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1991.

TRIBST, A. A. L.; AUGUSTO, P. E. D.; CRISTIANINI, M. The effect of the high pressure homogenisation on the activity and stability of a commercial neutral protease from *Bacillus subtilis*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 4, p. 716-722, 2012a.

TRIBST, A. A. L.; CRISTIANINI, M. Increasing fungi amyloglucosidase activity by high pressure homogenization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, n. 4, p. 21-25, 2012.

TRIBST, A. A. L.; SANT'ANA, A. S.; DE MASSAGUER, P. R. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices – past, present and future perspectives**. Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 310-339, 2009b.

WELTI-CHANES, J.; OCHOA-VELASCO, C. E.; GUERRERO-BÉLTRAN, J. Á. High-pressure homogenization of orange juice to inactivate pectinmethylesterase. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 4, p. 457-462, 2009.