Artigo DOI: 10.14295/2238-6416.v71i4.484

SEDIMENTAÇÃO, ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E PROTEÓLISE DE LEITE UHT INTEGRAL DURANTE O ARMAZENAMENTO

Sedimentation, proteolytic activity and proteolysis of whole UHT milk during storage

Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto[1], Solimar Gonçalves Machado[2], Rodrigo Rezende Cardoso[3], Maria Cristina Dantas Vanetti[3]*

RESUMO

A desestabilização do leite UHT durante a estocagem pode ser atribuída, entre outros fatores, à ação de proteases endógenas e, ou bacterianas e constitui um dos principais entraves na cadeia produtiva desse produto. Objetivou-se avaliar a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado e seu efeito sobre a formação de sedimentos, grau de proteólise e atividade proteolítica de leite UHT integral durante o período de armazenamento. As médias das contagens de bactérias mesófilas, psicrotróficas, psicrotróficas proteolíticas e *Pseudomonas* spp. das amostras do leite cru refrigerado foram, respectivamente, de 5,5 x 10^6 UFC/mL, 3,0 x 10^6 UFC/mL, 8,0 x 10^5 UFC/mL e 1,1 x 10^6 UFC/mL. O tratamento UHT reduziu 93,2% da atividade proteolítica em relação ao leite cru. Ao longo do período de estocagem do leite UHT integral ocorreu o aumento da massa de sedimentos, do grau de proteólise e da atividade proteolítica. Todas as amostras de leite UHT apresentaram baixa contagem de mesófilos e permaneceram termicamente estáveis e sem sinais de gelificação. Considerando a atividade residual de proteases no leite UHT e a sua relação com a formação de sedimentos, atividade proteolítica e proteólise, o emprego de leite com baixas contagens de bactérias psicrotróficas e de bactérias psicrotróficas proteolíticas deve ser considerado para fins de prevenção de defeitos tecnológicos

1 Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) Sudeste, Viçosa, MG, Brasil.E-mail:claudia.epamig@gmail.com
2 Instituto Federal do Norte de Minas Gerais – campus Salinas, Fazenda Varginha, s/n, 39560-000,Salinas, MG, Brasil.
3 Universidade Federal de Viçosa (UFV), Departamento de Microbiologia, Viçosa, MG. Brasil.
* Autor para correspondência.

Recebido / Received: 07/04/2016
Aprovado / Approved: 17/05/2017

como sedimentação e gelificação, os quais reduzem, consideravelmente, a aceitação do produto pelo consumidor além de ocasionarem prejuízos à indústria.

Palavras-chave: *Pseudomonas*; psicrotrófico; qualidade de leite.

ABSTRACT

The UHT milk destabilization during storage may be assigned, among other factors, to the activity of endogenous and, or bacterial proteases. This technological problem is a major obstacle in the dairy chain. The aim of this study was to evaluate the microbiological quality of raw milk and its effect on the formation of sediment, degree of proteolysis and proteolytic activity of whole UHT during storage. Mean counts of mesophilic bacteria, psychrotrophic, psychrotrophic proteolytic and *Pseudomonas* spp. from samples of raw milk were respectively 5.5 x 10^6 CFU/mL, 3.0 x 10^6 CFU/mL, 8.0 x 10^5 CFU/mL and 1.1 x 10^6 CFU/mL. The UHT treatment has reduced 93.2% of proteolytic activity detected comparing to the proteolytic activity of raw milk. The increase in sediment mass, degree of proteolysis and proteolytic activity of whole UHT milk has been detected during storage. All UHT milk samples have presented low count of mesophilic bacteria and remained thermally stable without evidence of gelation. Considering the residual activity of proteases in UHT milk and its relevance to sedimentation, proteolytic activity and proteolysis, the use of raw milk with low levels of proteolytic psychrotrophic bacteria hould be considered to prevent technological problems as sedimentation and gelation, which reduce significantly product acceptance by consumers besides causing industrial losses.

Keywords: *Pseudomonas*; psychrotrophic; milk quality.

INTRODUÇÃO

Entende-se por leite UHT (ultra alta temperatura, UAT) o leite (integral, parcialmente desnatado ou semidesnatado e desnatado) homogeneizado que foi submetido, durante 2 a 4 segundos, à temperatura entre 130 ºC e 150 ºC, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a temperatura inferior a 32 ºC e envasado em condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas (BRASIL, 1997). Portanto, constitui um produto estável do ponto vista bacteriológico à temperatura ambiente, o que permite classificá-lo como "comercialmente estéril".

Dentre os leites fluidos disponíveis no mercado brasileiro, o leite UHT, introduzido no Brasil na década de 70, apresenta maior consumo, associado ao tipo de embalagem e a sua maior vida útil (GUERRA, 2012).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) para leite UHT do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece o mínimo de 3% de gordura para o leite integral, acidez titulável entre 0,14% e 0,18% de ácido lático e estabilidade ao etanol 68% e, no mínimo, 8,2% de extrato seco desengordurado (ESD). Após a incubação da embalagem fechada por 7 dias, a 35 ºC – 37 ºC, nenhuma amostra deve apresentar-se com contagem de aeróbios mesófilos superior a 10^2 UFC/mL em um lote de 5 amostras. Além disso, permite-se apenas a adição dos estabilizantes monofosfato, difosfato, trifosfato, separados ou em

combinação, em uma concentração não superior a 0,1 g/100 mL (BRASIL, 1997).

Embora o leite UHT ofereça muitas vantagens como vida útil longa à temperatura ambiente, certas alterações indesejáveis podem ocorrer durante o período de estocagem, como a sua desestabilização, com consequente formação de gel ou sedimentos no fundo da embalagem (BAGLINIÈRE et al., 2012). A formação de sedimentos durante o armazenamento é um grande problema para a indústria do leite UHT, uma vez que reduz a vida útil do produto e ocasiona a sua rejeição pelo consumidor (SILVA, 2003). Diversos fatores estão associados a este problema tecnológico (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997), mas a principal causa da desestabilização do leite, descrita em diversos estudos, é a proteólise (SØRHAUG; STEPANIAK, 1997; DATTA; DEETH, 2003; TOPÇU et al., 2006; LONGHI et al., 2012; SØRHAUG; VESCONSI, 2012).

A redução da estabilidade e a ocorrência de proteólise do leite estão associadas à atividade de proteases de bactérias psicrotróficas na matéria-prima, além da ação de plasmina, uma protease endógena do leite. Segundo Dogan e Boor (2003), diversas espécies bacterianas pertencentes a essa microbiota multiplicam-se sob temperatura de refrigeração e produzem em proteases extracelulares termorresistentes (MARCHAND et al., 2008; MATÉOS et al., 2015; NÖRNBERG et al., 2010). Para a prevenção desses problemas é imprescindível o emprego de leite cru que atenda aos padrões de qualidade, o que refletirá diretamente na qualidade do produto final durante seu armazenamento. Diante do exposto, no presente estudo objetivou-se avaliar o efeito da qualidade microbiológica sobre a formação de sedimentos, grau de proteólise e atividade proteolítica de leite UHT integral durante o período de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Amostras de leite cru refrigerado granelizado e de leite UHT integral, processado pelo sistema indireto, foram coletadas em uma Indústria de Laticínios na Zona da Mata Mineira com, aproximadamente, 98% de leite recebido de forma granelizada. Essa indústria era receptora e processadora de, aproximadamente, 200.000 litros de leite por dia proveniente de uma rede de fornecedores composta de 230 tanques individuais e 90 tanques coletivos, de capacidade entre 250 e 3.000 litros/tanque e que atende aproximadamente 1.000 cooperados.

Foram coletadas, de forma sequencial e em três repetições, em semanas e horários diferentes, 250 mL de amostras do leite cru refrigerado no silo industrial, 250 mL de leite pasteurizado no tanque de estocagem e amostras de leite UHT envasadas fabricadas a partir do leite cru amostrado. As amostras de leite cru foram submetidas à enumeração de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas, psicrotróficas proteolíticas e *Pseudomonas* spp., e à determinação da atividade proteolítica. As amostras de leite pasteurizado, coletadas nos tanques de alimentação do sistema UHT, foram submetidas a determinação da atividade proteolítica. As amostras de leite UHT (uma caixa contendo 12 unidades de 1 L de leite UHT) foram armazenadas a 37 ºC, por 120 dias, período este correspondente ao seu prazo de validade. Em intervalos de 24 dias, as amostras de leite UHT foram avaliadas quanto ao grau de proteólise, atividade proteolítica e taxa de sedimentação, resistência à cocção e observações quanto a indícios de gelificação. Estas mesmas amostras foram submetidas à contagens de bactérias mesófilas e mesófilas esporuladas, no início e no final da estocagem, para verificar contaminações do produto ao longo do processamento.

Avaliação microbiológica do leite cru refrigerado, pasteurizado e UHT

Contagem de bactérias mesofílicas

Após diluições sucessivas em solução salina (NaCl 0,85 %), alíquotas de 100 µL das amostras do leite cru e do leite UHT foram plaqueadas em ágar caseinato para métodos padronizados (SMCA), para contagem de bactérias mesofílicas viáveis, após a incubação, a 35 ºC, por 48 horas (FRANK et al., 1992). A contagem de bactérias mesofílicas foi realizada no início do experimento (tempo 0), nas amostras de leite cru e nas amostras de leite UHT, e após 120 dias de estocagem. O ágar caseinato foi preparado conforme referência citada a partir de ágar padrão para contagem (Merck, Darmstadt, Alemanha) acrescido de caseinato de sódio. Foram contadas todas as colônias visíveis na superfície do meio de cultura.

Procedeu-se a enumeração de bactérias esporuladas mesofílicas no leite UHT após tratamento a 80 ºC, por 10 minutos de acordo com a metodologia estabelecida por Stevenson e Segner (2001).

***Contagem de bactérias psicrotróficas e Pseudomonas* spp.**

Alíquotas de 100 µL das diluições decimais das amostras do leite cru foram plaqueadas em SMCA para contagem de bactérias psicrotróficas e psicrotróficas proteolíticas viáveis, com incubação a 6,5 ± 0,5 ºC, por 10 dias (FRANK et al., 1992). Todas as colônias visíveis na superfície do ágar após período de incubação foram contabilizadas como psicrotróficas. As colônias que apresentavam halo claro de hidrólise foram contabilizadas como psicrotróficas proteolíticas.

O volume de 100 µL de diluições sucessivas das amostras de leite cru foram plaqueadas na superfície do ágar base para *Pseudomonas* CM559 (Oxoid), adicionado de cetrimida (10,0 mg/L), fucidina (10,0 mg/L) e cefalosporina (50,0 mg/L) (suplemento seletivo SR 103E, Oxoid®). A contagem de colônias típicas de *Pseudomonas* spp. foi realizada após 72 horas de incubação, a 22 ºC conforme procedimento descrito por Pinto (2004).

Determinação da massa de sedimentos

A formação de sedimentos do leite UHT foi determinada pela técnica descrita por Neira (1986). A embalagem Tetra Brik Aseptic foi aberta cortando-se, com auxílio de tesoura, na parte superior e retirou-se todo o leite cuidadosamente, por escoamento. A embalagem foi cortada de forma a obter uma altura final de, aproximadamente, 4 cm a partir da base. Em seguida, a embalagem foi invertida e mantida emborcada por 10 minutos. Posteriormente, ela foi cortada pelas arestas e aberta completamente para facilitar a secagem de algum sedimento retido. A secagem da embalagem foi feita à temperatura controlada de 37 ºC por 48 horas. Após este período, ela foi pesada em balança analítica e, posteriormente, lavada, empregando-se pequeno volume de água, com auxílio de uma pisseta. Após a secagem, a embalagem foi pesada e o seu valor anotado. A massa de sedimentos foi obtida pela diferença entre as duas pesagens e o resultado foi expresso em g/L.

Grau de proteólise

O grau de proteólise do leite UHT foi determinado pelo método de Hull (1947). Uma alíquota de 10 mL de ácido tricloroacético 0,72 mol/L foi adicionada a 5 mL da amostra de leite. Após agitação e repouso de 10 minutos, a mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman n. 42. Posteriormente, foi adicionado, a 5 mL do filtrado, 10 mL de solução de carbonato de sódio e tetrafosfato de sódio, a 40 ºC. Após 10 minutos, foram

adicionados 3 mL de reagente fenólico, sob agitação. A leitura foi feita após cinco minutos, em espectrofotômetro Spec 20-D, a 650 nm. Os valores de absorvância obtidos foram convertidos em seu equivalente de tirosina, empregando-se uma curva padrão, previamente preparada, com soluções de concentrações conhecidas. Os resultados foram expressos em miligramas de tirosina por 5 mL de leite.

Atividade proteolítica

As amostras do leite cru, do leite pasteurizado e do leite UHT foram submetidas a determinação da atividade proteolítica, segundo Linden et al. (1982). O método baseia-se na hidrólise de um substrato de síntese da série 4-nitroanilidas, L-leucil 4-nitroanilida (Sigma®). A medida foi feita em espectrofotômetro Spec 20-D. Os valores de absorvância obtidos foram convertidos em seu equivalente em micromoles de 4-nitroanilina/L, formados após 18 horas de incubação, a 37 ºC, empregando-se curva padrão de concentrações conhecidas de 4-nitroanilina previamente preparadas.

Análises estatísticas

Realizou-se análise descritiva dos resultados das análises microbiológicas coletadas no silo industrial por comparação com padrões da legislação (BRASIL, 2011). A análise das variáveis da massa de sedimentos, do grau de proteólise e da atividade proteolítica, em função do tempo de estocagem, a 37 ºC, por 120 dias, foi realizada por meio da análise de regressão linear simples. Empregou-se, para as análises estatísticas, o Sistema de Análise Estatística – SAS (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias das contagens de bactérias mesófilas, psicrotróficas, psicrotróficas proteolíticas e *Pseudomonas* spp. das amostras do leite cru destinado ao processamento UHT coletadas no silo foram, respectivamente, de 5,5 x 10^6 UFC/mL, 3,0 x 10^6 UFC/mL, 8,0 x 10^5 UFC/mL e 1,1 x 10^6 UFC/mL. Ressalta-se que a contagem de mesófilos estava em desacordo com o limite máximo estabelecido pelo MAPA para leite refrigerado, que é de 3,0 x 10^5 UFC/mL (BRASIL, 2011). As contagens de bactérias mesofílicas e mesofílicas esporuladas no leite UHT foram inferiores a 1,0 x10^0 UFC/mL.

Bactérias potencialmente proteolíticas no leite cru, como *Pseudomonas* spp. são capazes de produzir enzimas proteolíticas estáveis à temperatura de pasteurização e ao tratamento UHT. Dessa forma, deve-se considerar que o alto índice de contaminação da matéria-prima por este grupo de microrganismos pode comprometer a vida útil de leite UHT ao longo da estocagem com possível ocorrência da presença de sedimento no produto e, ou gelificação (HONORIO, 2015).

Os valores médios de sedimentos de amostras de leite UHT integral processadas pelo sistema indireto, variaram entre 0,1241g/L e 0,2567g/L. Houve aumento gradual da massa de sedimentos ao longo do tempo de estocagem (Figura 1A). Esses resultados são semelhantes aos observados por Santos (2007) e inferiores aos obtidos por Neira (1986), Silva (2003) e Vesconsi et al. (2012). Essa diferença pode estar associada ao tipo de tratamento térmico empregado no processo (GARCÍA-RISCO et al., 2002; SILVA, 2003). Em geral, maior formação de sedimentos é observada no leite UHT processado por meio de sistema direto. A sedimentação pode variar também de acordo com as alterações das condições de processamento e das condições climáticas (SILVA, 2003).

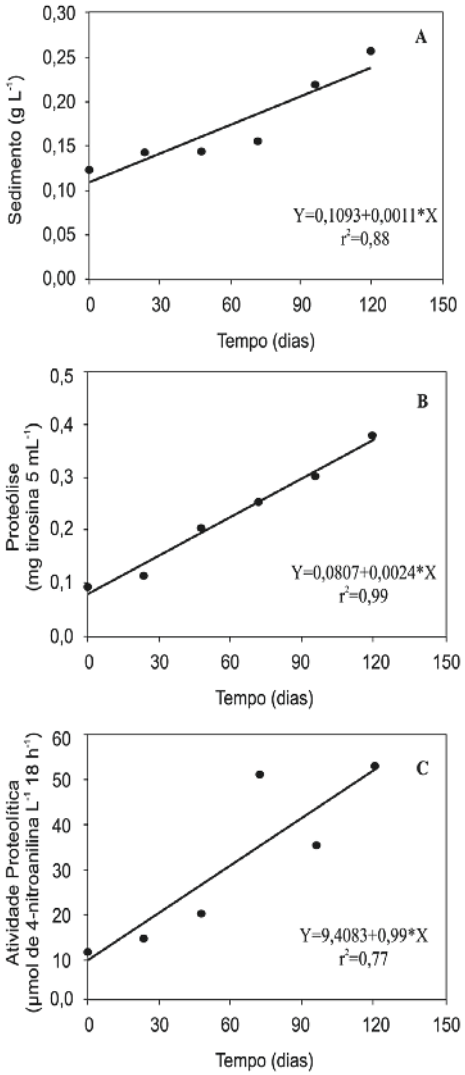

Figura 1 – Regressão linear da massa de sedimentos (A), do grau de proteólise (B) e da atividade proteolítica (C) em função do tempo de estocagem do leite UHT integral, a 37 ºC, por 120 dias.

O efeito do tempo de estocagem sobre a formação da massa de sedimentos demonstra a importância do controle do fenômeno de sedimentação para a competitividade industrial, considerando-se que a formação de sedimentos no produto final pode ocasionar a redução da vida de prateleira do produto, levando à rejeição deste pelo consumidor.

Da mesma forma, maior grau de proteólise do leite UHT foi observado no final do prazo de validade, ou seja, aos 120 dias de estocagem (Figura 1B). Auldist et al. (1996) também constataram o aumento gradual do grau de proteólise durante a estocagem de leite UHT, sendo os maiores valores observados no produto fabricado com matéria-prima em estágio final de lactação. Gillis et al. (1985) observaram que o grau de proteólise do leite UHT variou em função da qualidade da matéria-prima e foi significativamente menor quando o leite cru utilizado como matéria-prima apresentava contagens de mesófilos inferiores a 10^4 UFC/mL.

A atividade proteolítica média do leite cru, do leite pasteurizado e do leite UHT coletadas de forma sequencial foram, respectivamente, 246,7 µmol, 19,1 µmol e 11,8 µmol de 4-nitroanilina/L/18h.

A evolução da atividade proteolítica do leite UHT durante a estocagem é apresentada na Figura 1C. Houve redução, por meio do processo de esterilização comercial do leite de, em média, 93,2% da atividade presente no leite cru, resultado indicativo da presença de atividade proteolítica residual a qual pode ser de origem bacteriana ou endógena.

A presença de atividade residual de proteases bacterianas após tratamento UHT além do seu aumento durante o armazenamento do produto reforça a importância de selecionar a matéria-prima de boa qualidade microbiológica para processamento de leite UHT. Esses resultados estão de acordo com Zalazar et al. (1996). Esses autores constataram aumento da atividade de proteases de bactérias psicrotróficas sobre a κ-caseína durante a estocagem de leite UHT indicado pelo aumento de até 215% da concentração de ácido siálico. Desta forma, o método para determinação do ácido siálico livre foi indicado como uma ferramenta útil para moni-

toramento da proteólise em leite UHT, durante o armazenamento, com a possibilidade de indicação de um início de um processo de gelificação.

A desestabilização do leite UHT pode ocorrer como consequência da atividade de uma protease extracelular termorresistente produzida por *Pseudomonas fluorescens* progressivamente ao longo da estocagem (BAGLINIÈRE et al., 2013; MATÉOS et al., 2015). Baur et al. (2015) também demonstraram que amostras de leite UHT apresentaram sinais de deterioração após quatro semanas de estocagem a 20 ºC, mesmo contendo protease com atividade considerada baixa (1pkat/mL).

Embora nenhuma das amostras tenha apresentado sinais de gelificação, os resultados confirmaram a presença de atividade residual de proteases resistentes ao tratamento UHT, de origem endógena e, ou bacteriana. Pode-se considerar que, embora tenham sido observadas contagens de psicrotróficos proteolíticos e de *Pseudomonas* entre 10^5 e 10^6 UFC/mL, não ocorreu a gelificação. De acordo com Pinto (2005), este problema é associado a populações de psicrotróficos proteolíticos e de *Pseudomonas* em contagens superiores àquelas encontradas neste estudo. Batista (2015) constatou uma correlação positiva e significativa entre a contagem de microrganismos psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos e entre a contagem de microrganismos psicrotróficos proteolíticos em amostras de leite cru e o grau de proteólise do leite UHT. Essa microbiota pode formar biofilmes na superfície interna dos tanques de refrigeração de leite e de tubulações os quais constituem fonte potencial de enzimas deterioradoras (HANTIS-ZACHAROV; HALPERN, 2007; TEH et al., 2014).

Embora a homogeneização por alta pressão seja eficiente para inativação de proteases termorresistentes (PINHO et al., 2014), a principal forma de controle de proteases em leite é a implementação de boas práticas de ordenha e de fabricação e a implementação de *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP) para fins de prevenção da contaminação inicial do leite (NADA et al., 2012).

CONCLUSÕES

O grau de contaminação do leite cru com bactérias psicrotróficas proteolíticas e *Pseudomonas* entre 10^5 e10^6 UFC/mL não implicou em gelificação do produto final. Entretanto, houve aumento gradual da massa de sedimentos, do grau de proteólise e da atividade proteolítica ao longo da estocagem do leite UHT, possivelmente, associado a atividade residual de proteases. Os resultados desse trabalho reforçam a importância do emprego de matéria-prima com baixas contagens de bactérias psicrotróficas proteolíticas para fins de prevenção de defeitos como sedimentação e gelificação, os quais ocasionam a redução considerável da aceitação do produto com consequentes prejuízos industriais.

REFERÊNCIAS

AULDIST, M. J. et al. Effects of somatic cell count and stage of lactation on the qualiy and storage life of ultra high temperature milk. **Journal of Dairy Research**, v. 63, p. 377-386, 1996.

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

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.

BATISTA, C. S. **Estudo de correlação entre a qualidade do leite cru refrigerado e do leite UHT integral.** 2015. 46p. Dissertação (mestrado profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, 2015.

BAUR, C. et al. Isolation and characterization of a heat-resistant peptidase from *Pseudomonas* panacis with standing general UHT processes. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 46-55, 2015.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 29 de de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Seção 1, 30 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.Portaria nº 370, de 4 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Leite U.H.T (U.A.T). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Seção 1, 8 set. 1997.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age Gelation of UHT Milk – A Review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 79, n. 4, p. 197-210, 2001.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 130-138, 2003.

FRANK, J. F. et al. Tests for groups of microorganisms. In: Marshall, R.T. (Ed.), **Standard methods for the examination of dairy products.** APHA, New York, pp. 271-286, 1992.

GARCÍA-RISCO, M. R. et al. Modifications in milk proteins induced by heat treatment and homogenization and their influence on susceptibility to proteolysis. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 8, p. 679-688, 2002.

GILLIS, W. T. et al. Effect of raw milk quality on ultra-high temperature processes milk. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2875-2879, 1985.

GUERRA, J. **O boom do leite UHT no Brasil.** 2012. Disponível em: <http://www.scotconsultoria.com.br/noticias/artigos/24736/o-%3Ci%3Eboom%3Ci%3E-do-leite-uht-no-brasil.htm>. Acesso em: 12 jun. 2017.

HANTIS-ZACHAROV, E.; HALPERN, M. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7162-7168, 2007.

HONORIO, R. et al. **Efeito do Armazenamento na Qualidade de Leite UHT.** Uniciências, v. 19, n. 1, p. 11-16, 2015.

HULL, M. E. Studies on milk proteins. II Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 30, p. 881-894, 1947.

LINDEN, G. et al. Applications de ladissolution complete dulait à lade termination de quelque sactivitésenzy matiques. **Le lait**, v. 62, p. 209-219, 1982.

LONGHI, R. et al. A survey of the physicochemical and microbiological quality of ultra-heat-treated whole milk in Brazil during their shelf life. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 45-50, 2012.

MARCHAND, S. et al. Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 514-519, 2008.

MATÉOS, A. et al. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. **International Dairy Journal**, v. 49, p. 78-88, 2015.

NADA, S. et al. Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 728-731, 2012.

NEIRA, M. P. **Efecto de laactividad de proteasas sobre laestabilidad de. Lechesuht durante sualmacenamiento.** 1986. 163f. Disertación (M. S. em Ciencias y Tecnologia de La Leche) – Universidad Austral de Chile, Valdivia, 1986.

NÖRNBERG, M. F. B. L. et al. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 41-46, 2010.

PINHO, C. et al. Proteolytic activity of protease produced by *Pseudomonas fluorescens* IB 2312 in skimmed milk subject to the process of high pressure homogenization. **Revista do Instituto de Laticinios Cândido Tostes**, v. 69, n. 4, p. 289-296, 2014.

PINTO, U. M. **Quorum sensing em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite.** 2005. 90p. Dissertação (mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

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

SANTOS, M. V. **Aspectos não microbiológicos afetando a qualidade do leite.** Passo Fundo, RS: UPF, 2007.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para a sedimentação e gelificação.** 2003. 147f. Tese (doutorado em Ciência dos Alimentos) – UFLA, Lavras, MG.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35-41, 1997.

STEVENSON, K. E.; SEGNER, W. P. Mesophilic aerobic spore formers. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4ª ed. Washington: American Public Health Association – APHA, 2001. p. 483-495.

TEH, K. H. et al. Proteolysis in ultra-heat-treated skim milk after exposure to multispecies biofilms under conditions modelling a milk tanker. **International Jour nal of Dairy Technology**, v. 67, n. 2, p. 176-181, 2014.

TOPÇU, A.; NUMANOĞLU, E.; SALDAML, İ. Proteolysis and storage stability of UHT milk produced in Turkey. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 633-638, 2006.

VESCONSI, C. N.; VALDUGA, A. T.; CICHOSKI, A. J. Sedimentação do leite UHT integral, semidesnatado e desnatado durante armazenamento. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, p. 730-736, 2012.

ZALAZAR, C.; PALMA, S; CANDIOTI, M. Increase of freesialic acid and gelation in UHT milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 1, p. 22-23, 1996.