

Avaliação das características físico-químicas de iogurtes naturais produzidos a partir de leite contaminado por bactérias psicrotróficas proteolíticas

Physicochemical evaluation of plain yogurt produced by psychrotrophic and proteolytic bacteria contaminated milk

DOI:10.34117/bjdv7n6-250

Recebimento dos originais: 07/05/2021

Aceitação para publicação: 13/06/2021

Juliana Querino Goulart

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Instituição de atuação atual: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Endereço :Faculdade de Veterinária UFRGS - Av. Bento Gonçalves, 9090 - Agronomia,
Porto Alegre - RS, 91540-000.
E-mail: juquerino@gmail.com

Fabiano Barreto

Doutor em Ciências Farmacêuticas

Instituição de atuação atual: Laboratório Federal de Defesa Agropecuária – LFDA/RS
Endereço: Estrada Retiro da Ponta Grossa, 3036 - Ponta Grossa, Porto Alegre - RS,
91780-580.
E-mail: fabiano.barreto@agricultura.gov.br

João Feliz Duarte de Moraes

Doutor em Gerontologia Biomédica

Instituição de atuação atual: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Endereço: Faculdade de Veterinária UFRGS - Av. Bento Gonçalves, 9090 - Agronomia,
Porto Alegre - RS, 91540-000.
E-mail: 00008450@ufrgs.br

Marisa da Costa

Doutora em Microbiologia

Instituição de atuação atual: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Endereço: R. Sarmiento Leite, n° 500 - Farroupilha, Porto Alegre - RS, 90050-170.
E-mail: mdcosta@ufrgs.br

Andrea Troller Pinto

Doutora em Tecnologia de alimentos

Instituição de atuação atual: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Endereço: Faculdade de Veterinária UFRGS - Av. Bento Gonçalves, 9090 - Agronomia,
Porto Alegre - RS, 91540-000.
E-mail: andrea.troller@ufrgs.br

RESUMO

O resfriamento do leite na unidade produtora favorece a multiplicação de microrganismos psicrotróficos que podem produzir enzimas proteolíticas termorresistentes com potencial para degradar os componentes do leite. Visando verificar os efeitos destas enzimas em derivados lácteos, este estudo teve por objetivo avaliar as características físico-químicas do iogurte natural produzido a partir de leite contaminado com bactérias psicrotróficas proteolíticas. Para isso, microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas foram isolados do leite cru refrigerado, tendo sido identificados até nível de gênero *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. e *Butiauxella* sp. Esses microrganismos foram inoculados em leite pasteurizado e armazenados por 48 e 72 horas a temperatura de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após o período de armazenamento, o leite foi tratado termicamente a $90^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 10 min e imediatamente resfriados a 43°C . Foram adicionados os ingredientes e produzidos iogurtes naturais, sendo posteriormente avaliados quanto aos seus teores de proteína, gordura e acidez. Os iogurtes naturais produzidos, quanto aos teores de gordura e proteína foram significativamente maiores em iogurtes produzidos com os leites controles (não inoculados). Além disso, a acidez do iogurte produzido com leites armazenados por 72 horas a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ foi significativamente maior no dia zero, independente dos microrganismos intencionalmente adicionados. Com isso, pode-se concluir que as características físico-químicas dos iogurtes naturais produzidos com leites contaminados com as bactérias foram diferentes das obtidas dos iogurtes produzidos com leites não contaminados, sendo importante a reflexão sobre os tempos de armazenamento a frio devido ao favorecimento da multiplicação de microrganismos psicrotróficos proteolíticos.

Palavras-chave: Leite, resfriamento, psicrotróficos, enzimas proteolíticas, teores de proteína e gordura.

ABSTRACT

Cooling of milk in dairy favors the multiplication of psychrotrophic bacteria that can produce thermoresistant proteolytic enzymes and degrade milk components. To verify the effects of these enzymes in dairy products, this study aimed to evaluate the physical-chemical characteristics of plain yogurt produced from milk contaminated with proteolytic psychrotrophic bacteria. For this, psychrotrophic bacteria producing proteolytic enzymes were isolated from raw milk, having been identified like *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. and *Butiauxella* sp. These microorganisms were inoculated in pasteurized milk and stored for 48 and 72 hours at a temperature of $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. After the storage, the milk was heated to $90^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$ for 10 min and immediately cooled to 43°C . The ingredients were added and plain yogurts were produced, and then evaluated for their protein, fat and acidity contents. The plain yogurts produced, in terms of fat and protein contents, were significantly higher in yogurts produced with control milk (not inoculated). In addition, the acidity of yogurt produced with milk stored for 72 hours at $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ was significantly higher on day zero, regardless of the microorganisms intentionally added. Thus, it can be concluded that the physical-chemical characteristics of plain yogurts produced with contaminated milks were different from those obtained from yogurts produced with non-contaminated milks, being important to reflection of the cold storage periods due to the favoring of multiplication of proteolytic psychrotrophic microorganism.

Keywords: Milk, cooling, psychrotrophic bacteria, proteolytic enzymes, protein and fat content.

1 INTRODUÇÃO

O resfriamento do leite após sua obtenção é método amplamente aceito para minimizar a velocidade de multiplicação de microrganismos mesófilos, que normalmente são os responsáveis pela deterioração deste produto. Porém, as temperaturas de refrigeração favorecem o crescimento de microrganismos psicrotróficos, que se tornaram prevalentes na microbiota do leite cru refrigerado. Quanto maior o tempo de permanência em refrigeração, sem tratamento térmico apropriado, mais favorecida é a multiplicação destes microrganismos. O principal problema associado a estes microrganismos é a produção de enzimas extracelulares que degradam os componentes do leite e, conseqüentemente, alteram as características dos derivados lácteos produzidos a partir desta matéria-prima (QUIGLEY et al. 2013; STOECKEL et al., 2016, VITHANAGE et al., 2016).

Os tratamentos térmicos convencionais eliminam a maioria desses microrganismos, já que eles normalmente não resistem às temperaturas de pasteurização. Porém, suas enzimas podem ser termoestáveis, permanecendo ativas mesmo após a destruição dos microrganismos a elas associados. É o caso de algumas proteases produzidas pelos microrganismos psicrotróficos, que podem estar presentes nos derivados lácteos e continuar o processo de degradação (BAUR et al, 2015; PUKANČÍKOVÁ et al., 2016; VON NEUBECK, et al., 2015; MARCHAND et al., 2017).

Um dos derivados lácteos que pode ser afetado pela presença de proteases é o iogurte, cuja composição pode ser alterada pela redução do conteúdo proteico associada à proteólise. Mesmo quando não ocorre diminuição no teor de proteínas, a ação destas enzimas pode formar peptídeos menores que dão sabor amargo ou tornam o coágulo menos denso e o iogurte menos consistente. Para avaliar os efeitos da presença de proteases termoestáveis produzidas por microrganismos psicrotróficos nos iogurtes naturais, este estudo teve por objetivo avaliar os parâmetros físico-químicos do iogurte natural produzido a partir de leite contaminado intencionalmente com bactérias psicrotróficas proteolíticas.

2 MÉTODOS E MATERIAIS

Bactérias psicrotróficas isoladas de leite cru refrigerado foram testadas quanto à sua capacidade de produzir proteases em temperaturas de refrigeração, por meio da semeadura em ágar leite desnatado. A expressão fenotípica foi evidenciada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia, decorrente do metabolismo bacteriano sobre

as proteínas do leite após armazenamento em temperatura de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por dez dias. Três isolados, que demonstraram essa capacidade de formar halo, foram identificados por espectrometria de massas com ionização por dessorção a laser e análise por tempo de voo (MALDI TOF MS, AutoflexSpeed®, programas FlexControl® e Biotyper®-Bruker, Alemanha) como *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. e *Butiauxella* sp. Esses microrganismos também foram testados quanto à capacidade de produzir enzimas lipolíticas, utilizando-se a semeadura em ágar tributirina suplementado com bromocresol a 1% (v/v) e armazenamento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por dez dias. A visualização de resultado positivo seria observada pela formação de halo transparente ao redor da colônia, porém nenhum apresentou tal resultado (Metodologia adaptada de MOREIRA e MONTANHINI, 2014; ARAÚJO et al., 2019).

Para a produção do iogurte natural, foram preparados inóculos com cada um destes microrganismos para que, posteriormente fossem adicionados ao leite utilizado como matéria-prima deste produto.

- preparação do inóculo: cada um dos microrganismos identificados foi cultivado em 20mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI), a temperatura de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante sete dias. A multiplicação dos microrganismos no meio líquido foi conferida com o auxílio da escala nefelométrica de Mc Farland, onde a turvação obtida pelo crescimento do número de bactérias era comparada aos tubos diluídos com diferentes concentrações de sulfato de bário. Uma alíquota de cada inóculo (1mL) foi adicionado a 1 litro de leite pasteurizado para obtenção de uma concentração final do microrganismo inoculado de 10^6 UFC/mL de leite. O leite pasteurizado e com gordura padronizada a 3% utilizado foi adquirido no mercado local, sendo todos de mesma marca e mesmo lote.

O leite contaminado foi armazenado por 48 ou 72 h a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Para garantir o controle do processo, um litro de leite que não recebeu inóculo foi acondicionado nas mesmas condições dos que os receberam. Após o período de armazenamento, uma alíquota de 2mL de cada leite foi retirada para que fossem quantificadas as unidades formadoras de colônias de microrganismos psicrotróficos (UFC/mL) e a atividade enzimática de proteases, conforme métodos descritos por Arcuri et al. (2008) e Nornberg, Tondo e Brandelli (2009), respectivamente. As análises foram realizadas em duplicata.

- preparação do iogurte natural: Após o armazenamento, os leites contaminados assim como os controles foram tratados termicamente a $90^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 10 min e imediatamente resfriados a 43°C . Ao atingir $43^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, uma alíquota de 2mL foi novamente retirada para a quantificação de UFC/mL de microrganismos psicrotróficos e atividade

enzimática de proteases. Mantendo-se a temperatura $43^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ com o auxílio do banho-maria digital, adicionou-se um grama de fermento comercial para produção de iogurtes (bactérias *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* na proporção de 10^8 bactérias por grama de fermento) por litro de leite. Após breve homogeneização, cada mistura foi dividida em duas alíquotas iguais, acondicionadas em dois novos recipientes esterilizados e incubadas a $43^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 4h. Após este período os iogurtes foram retirados do banho-maria e acondicionados no refrigerador a $4^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Uma das alíquotas foi avaliada quanto às suas características físico-químicas após 24h, enquanto a outra após 30 dias no refrigerador (LEE e LUCEY, 2010).

As características avaliadas foram percentuais de gordura, proteína e acidez titulável. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Foram feitas três repetições com cada microrganismo, em cada tempo de armazenamento.

- análise estatística: Os resultados médios de log UFC/mL de microrganismos psicrotróficos e atividade enzimática do leite utilizado como matéria-prima para a produção de iogurtes, assim como resultados médios características físico-químicas dos iogurtes, foram comparados por ANOVA, avaliando-se suas diferenças de acordo com o microrganismo inoculado e os diferentes tempos de armazenamento. Para diferenças significativas ($p < 0,05$), o teste de Tukey foi aplicado para identificar grupos com médias homogêneas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de log UFC/mL de microrganismos psicrotróficos e atividade enzimática de proteases dos leites utilizados como matérias-primas para a produção dos iogurtes naturais são apresentados na tabela 01.

Tabela 01

Média de log UFC/mL de microrganismos psicrotróficos e atividade enzimática de proteases (U/mL) dos leites utilizados como matéria-prima do iogurte natural

Bactéria inoculada	TA H	Psicrotróficos (log UFC/mL)		Atividade enzimática (U/mL)	
		Antes do TT	Após o TT	Antes do TT	Após o TT
<i>Pseudomonassp.</i>	48	7,90±0,48 ^{Aa}	>1	0,56±0,04 ^{Aa}	0,25±0,14 ^{Aa}
	72	7,78±0,20 ^{Aa}	>1	0,74±0,36 ^{Aa}	0,13±0,15 ^{Aa}
<i>Alcaligenessp.</i>	48	7,17±0,17 ^{Ba}	>1	0,38±0,25 ^{Aa}	0,82±1,05 ^{Aa}
	72	6,76±0,21 ^{Ba}	>1	0,30±0,25 ^{Aa}	0,32±0,27 ^{Aa}
<i>Butiauxellasp.</i>	48	7,00±0,43 ^{Ba}	>1	0,58±0,57 ^{Aa}	0,095±0,13 ^{Aa}
	72	6,52±0,22 ^{Ba}	>1	0,62±0,47 ^{Aa}	0,64±0,32 ^{Aa}
Controle (não inoculado)	48	4,36±0,05 ^{Ca}	>1	0,085±0,01 ^{Bb}	0,035±0,01 ^{Bb}
	72	4,60±0,00 ^{Ca}	>1	0,295±0,02 ^{Aa}	0,035±0,01 ^{Bb}

Bactéria inoculada em leite pasteurizado; TA= Tempo em horas de armazenamento do leite a 7°±1°C. U= Unidade; TT = Tratamento térmico.

A, B,...: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05) em relação aos microrganismos inoculados. a, b,...: Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey em relação ao tempo de incubação (P<0,05).

Conforme esperado antes do tratamento térmico, o log UFC/mL de microrganismos psicrotróficos foram, em média, significativamente menores (p<0,05) nos controles nos dois diferentes tempos de armazenamento. Em relação aos leites contaminados, observou-se maior média de log UFC/mL nos que receberam inóculos de *Pseudomonassp.* Após o tratamento térmico a 90°± 5°C durante 10 min, as médias de todos os leites analisados foram inferiores a um log UFC/mL, o que indica que a relação tempo x temperatura utilizada foi eficaz na redução dos microrganismos psicrotróficos ali presentes.

A atividade enzimática das proteases no leite utilizado como controle foi menor que a apresentada no leite inoculado (P<0,05) no leite tratado termicamente. Este achado era esperado já que não houve a inoculação das bactérias psicrotróficas proteolíticas. Entretanto, as diferenças não foram significativas menores nos leites utilizados como controles no tempo de armazenamento de 72h antes do tratamento térmico.

Apesar de não apresentar diferenças significativas, o valor mais elevado de atividade enzimática antes do tratamento térmico foi observado no leite contaminado com o inóculo da bactéria pertencente ao gênero *Pseudomonas* após 72h de armazenamento a 7°±1°C. Após o tratamento térmico a 90°± 5°C durante 10 min, a maior média de atividade enzimática de proteases foi obtida no leite armazenado por 48h com inóculo de bactéria do gênero *Alcaligenessp.*

O resultado acima descrito revela que maiores contagens de microrganismos psicrotróficos presentes antes do tratamento térmico são indicativos de maiores atividades enzimáticas no leite, o que aumenta a possibilidade de degradação dos componentes do leite e, por consequência, reduz sua qualidade. Zhang et al. (2020) demonstrou que leites armazenados em temperatura de 7°C por 5 dias atingem contagens superiores a 7log UFC/ml de microrganismos psicrotróficos o que, segundo Muir e Kjaerbye (1996), é mais que suficiente para produção de enzimas, já que esta se inicia em contagens acima de 6log UFC/mL. Portanto, a diminuição do número de microrganismos psicrotróficos é necessária, podendo ser obtida através da adoção de medidas higiênico-sanitárias rigorosas do ambiente de produção ou pela redução no tempo de armazenamento a frio (YUAN et al., 2019).

Os microrganismos psicrotróficos presentes no leite cru refrigerado pertencem a diversos gêneros, porém o mais estudado é, sem dúvida, o *Pseudomonas*. Bactérias pertencentes a este gênero fazem parte da microbiota do leite cru e são capazes de se multiplicar em temperaturas de refrigeração. Além disso, são conhecidas produtoras de proteases, inclusive termoestáveis que podem degradar o conteúdo proteico dos derivados lácteos. A produção de enzimas está associada a uma diversidade de fatores, sendo normalmente aumentada na fase estacionária do crescimento bacteriano. Temperaturas menores desaceleram o crescimento e aumentam o tempo para que as culturas atinjam tal fase. Alves et al. (2018) observaram que a atividade enzimática da protease produzida por uma cepa de *P. fluorescens* variou de acordo com a temperatura de armazenamento, sendo observada diferença significativamente maior entre a atividade enzimática após 24h de incubação a 25°C em relação ao mesmo período aos 4°C e 10°C. Porém, após 36h e 48h houve aumento da atividade enzimática a 10°C e 4°C, respectivamente. No entanto, não atinge os níveis de atividade enzimática obtido aos 25°C, nos períodos de armazenamento correspondentes. *Alcaligenessp.* também é relatado como psicrotrófico e presente em amostras de leite cru refrigerado, porém não há informação sobre a sua capacidade de produzir enzimas proteolíticas termoestáveis na mesma proporção que o descrito para as bactérias do gênero *Pseudomonas*. (BAUR et al, 2015; STOECKEL et al., 2016; MARCHAND et al., 2017; XIN et al., 2017; YUAN et al., 2019;).

A atividade enzimática de proteases, observada após o tratamento térmico a 90°± 5°C durante 10 min, indica que algumas enzimas proteolíticas produzidas pelos microrganismos psicrotróficos presentes no leite são termoestáveis, conforme indicado por Stoeckel et al. (2016) e Marchand et al. (2017). Seus efeitos na composição do iogurte

natural foram avaliados mediante análise de características físico-químicas como percentuais de proteína e gordura, além da acidez titulável no dia seguinte a produção (dia 1) e após 30 dias em refrigeração (dia 30). Os resultados destas podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2
Média dos resultados das análises físico-químicas realizadas nos dias 0 e 30 após a produção dos iogurtes naturais

Bactéria inoculada	TA h	% Gordura		% Proteína		Acidez titulável (gac. lat*L ⁻¹)	
		(dia1)	(dia30)	(dia 1)	(dia30)	(dia 1)	(dia 30)
<i>Pseudomonassp.</i>	48	3,02±0,11 ^{Aa}	3,02±0,11 ^{Aa}	2,79±0,34 ^{Aa}	2,68±0,34 ^{Aa}	6,66±0,81 ^{Aa}	6,65±0,33 ^{Aa}
	72	3,40±0,19 ^{Aa}	3,52±0,11 ^{Aa}	2,93±0,21 ^{Aa}	2,82±0,17 ^{Aa}	8,01±0,05 ^{Ab}	6,75±0,08 ^{Aa}
<i>Alcaligenessp.</i>	48	3,15±0,31 ^{Aa}	3,18±0,42 ^{Aa}	2,77±0,32 ^{Aa}	2,71±0,29 ^{Aa}	6,42±1,22 ^{Aa}	6,69±0,08 ^{Aa}
	72	3,48±0,04 ^{Aa}	3,35±0,19 ^{Aa}	2,85±0,13 ^{Aa}	2,77±0,22 ^{Aa}	7,35±0,95 ^{Ab}	6,99±0,46 ^{Aa}
<i>Butiauxellasp.</i>	48	3,05±0,07 ^{Aa}	3,18±0,20 ^{Aa}	2,83±0,27 ^{Aa}	2,81±0,12 ^{Aa}	6,72±0,60 ^{Aa}	6,92±0,14 ^{Aa}
	72	3,53±0,45 ^{Aa}	3,50±0,14 ^{Aa}	2,80±0,08 ^{Aa}	2,80±0,37 ^{Aa}	7,68±0,12 ^{Ab}	7,16±0,23 ^{Aa}
Controle (não inoculado)	48	3,30±0,42 ^{Ba}	3,15±0,07 ^{Aa}	3,06±0,00 ^{Ba}	2,99±0,00 ^{Ba}	6,52±0,00 ^{Aa}	7,12±0,00 ^{Aa}
	72	3,85±0,07 ^{Ba}	3,55±0,07 ^{Aa}	2,93±0,00 ^{Aa}	2,35±0,00 ^{Bb}	7,02±0,28 ^{Ab}	7,12±0,00 ^{Aa}

Bactéria inoculada em leite pasteurizado; TA= Tempo em horas de armazenamento do leite a 7°±1°C. gac.lat= gramas de ácido láctico.

A, B,...: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05) em relação aos microrganismos inoculados. a, b,...: Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey em relação ao tempo de incubação (P<0,05).

Os teores de gordura no dia zero foram significativamente maiores (p<0,05) no iogurte produzido com leitescontroles em comparaçãoaos leites contaminados. No dia 30, os percentuais de gordura não apresentam diferenças significativas entre os iogurtes produzidos com leite contaminado e o controle. Em relação ao tempo de armazenamento, os percentuais de gordura foram maiores em iogurtes produzidos após o armazenamento de 72h, porém não apresentaram diferenças significativas em relação aos produzidos após 48h de armazenamento.

Os iogurtes produzidos com leites controles possuem maiores teores de gordura devido ao menor log UFC/mL de microrganismos psicrotróficos em comparação aos contaminados, já que estes indivíduos podem utilizaros nutrientes do leite para a manutenção do seu metabolismo. Isso significa que, quanto maior a contagem de microrganismos no leite, maior a utilização dos nutrientes e menores suas concentrações nos derivados lácteos. Seguindo esta lógica, maiores tempos de armazenamento propiciaram aumento no número de microrganismos e, portanto, maior consumo de nutrientes. Porém, isto não ficou evidente no presente estudo, sendo observados maiores teores de gordura em iogurtes produzidos após 72h de armazenamento do leite. Fagnaniet

al. (2017) obtiveram resultados semelhantes em iogurtes produzidos com leites em diferentes tempos de armazenamento. Os teores de gordura não variaram significativamente, mesmo em iogurtes produzidos a partir de leites armazenados a 4°C durante sete dias, porém as contagens de microrganismos psicotróficos não ultrapassaram 6log UFC/mL no leite utilizado como matéria-prima para a produção dos iogurtes naturais.

Os teores de proteína foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos iogurtes produzidos com leites controles, independente do tempo de armazenamento. A exceção ocorre na análise do dia 30, onde iogurtes produzidos com leite armazenados por 72h possuem, em média, menor percentual proteico. Apesar de não apresentar-se estatisticamente menor em relação aos demais, os iogurtes produzidos com leite contaminado pela bactéria *Alcaligenessp.* e armazenados por 48h possuem os menores teores proteicos. Cabe destacar o fato de esta ter sido a maior atividade enzimática de proteases obtida após o tratamento térmico, o que pode estar diretamente associado ao menor teor de proteínas nos iogurtes. A presença de proteases pode alterar a composição do iogurte, degradando as proteínas em peptídeos menores hidrossolúveis que serão perdidos na separação do soro.

Os resultados médios da acidez titulável dos iogurtes naturais diferiram significativamente, sendo maiores em iogurtes produzidos com leites armazenados por 72h quando avaliados no dia zero. Este fato não se repetiu no dia 30. Maior acidez nos iogurtes produzidos com leites armazenados por 72h pode estar relacionada ao aumento da fermentação da lactose por bactérias ácido-láticas psicotróficas, que permanecem por mais tempo atuando antes do tratamento térmico do leite. Mesmo após 30 dias, com a redução do número de microrganismos devido ao tratamento térmico, ainda ocorre aumento da concentração de ácido láctico relacionada à sobrevivência de bactérias ácido-láticas (LEE e LUCEY, 2010).

Estudos avançados neste campo são necessários para avaliar os prejuízos para a indústria, já que o armazenamento a frio ainda é considerado um método bastante eficiente para manutenção da qualidade do leite na propriedade rural. Menores períodos de armazenamento nos tanques de refrigeração, segundo o presente estudo, são indicados como forma de melhorar a qualidade dos produtos derivados de leite.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As características físico-químicas dos iogurtes naturais produzidos com leites contaminados com as bactérias foram diferentes das obtidas dos iogurtes produzidos com leites não contaminados. Os teores de gordura e proteína foram maiores nos iogurtes produzidos com leite não contaminados. A acidez titulável foi maior em iogurtes produzidos com leites armazenados por 72h, quando avaliado no dia seguinte à sua produção.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Lorena Gonçalves et al. Identificação de atividade deteriorante e do gene apr na microbiota isolada de leite cru em Caxias, MA. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 74, n. 4, p. 219-230, 2019.

ARCURI, Edna Froederet al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, 2008.

BAUR, Claudia et al. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, v. 49, p. 23-29, 2015.

FAGNANI, Rafael et al. Extended storage of cold raw milk on yogurt manufacturing. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 52, n. 2, p. 104-112, 2017.

LEE, W. J.; LUCEY, J. A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(9), 1127-1136.

MARCHAND, Sophie et al. Destabilization and off-flavors generated by *Pseudomonas* proteases during or after UHT-processing of milk. *International Journal of Food Contamination*, v. 4, n. 1, p. 2, 2017.

MOREIRA, Nayara Vilarins; MONTANHINI, Maike Taís Maziero. Contaminação do leite na ordenha por micro-organismos proteolíticos e lipolíticos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 8, n. 2, p. 29-38, 2014.

MUIR, David; KJAERBYE, Henrik. Quality aspects of UHT cream. *Federation Internationale de Laiterie-International Dairy Federation*, 1996.

NÖRNBERG, Maria de Fátima Barros Leal; TONDO, Eduardo César; BRANDELLI, Adriano. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. *Acta scientiae veterinariae*, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

PUKANČÍKOVÁ, Lucia et al. Natural microflora of raw cow milk and their enzymatic spoilage potential. *Nova Biotechnologica et Chimica*, v. 15, n. 2, p. 142-155, 2016.

QUIGLEY, Lisa et al. The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *Journal of dairy science*, v. 96, n. 8, p. 4928-4937, 2013.

STOECKEL, Marina et al. Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: A challenge in the production of ultra-high temperature milk products. *International Dairy Journal*, v. 61, p. 250-261, 2016.

VITHANAGE, Nuwan R. et al. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal*, v. 57, p. 80-90, 2016.

VON NEUBECK, Mario et al. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International journal of food microbiology*, v. 211, p. 57-65, 2015.

XIN, Liang et al. The diversity and proteolytic properties of psychrotrophic bacteria in raw cows' milk from North China. *International Dairy Journal*, v. 66, p. 34-41, 2017.

YUAN, Lei et al. Insights into psychrotrophic bacteria in raw milk: a review. *Journal of food protection*, v. 82, n. 7, p. 1148-1159, 2019.

ZHANG, Dong et al. Identification and selection of heat-stable protease and lipase-producing psychrotrophic bacteria from fresh and chilled raw milk during up to five days storage. *LWT*, v. 134, p. 110165, 2020.