

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ATIVIDADE
PROTEOLÍTICA RESIDUAL SOBRE A ESTABILIDADE
PROTÉICA DO LEITE ESTERILIZADO "LONGA-VIDA"**

MARIA ISABEL FRANCHI VASCONCELOS GOMES

**Orientador
Prof. Dr. Luiz Francisco Prata**

Prata

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Maria Isabel Franchi Vasconcelos Gomes e aprovada pela Comissão julgadora em 13.05.96.



**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de DOUTOR em Tecnologia de Alimentos.**

1995

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CLASSIFICAÇÃO	1/1111/AMT
	585c
	27936
	667/96
	x
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	04/07/96
N.º CTD	

CM-00089535-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

G586c

Gomes, Maria Isabel Franchi Vasconcelos

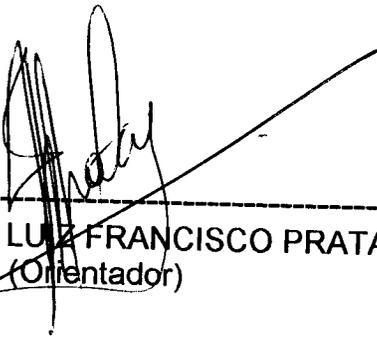
Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade protéica do leite esterilizado "longa-vida"/ Maria Isabel Franchi Vasconcelos Gomes. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Luiz Francisco Prata.

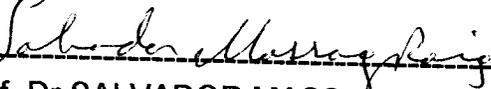
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.*Leite UHT. 2. Proteólise. 3. Plasmina. 4. *Vida de prateleira. 5. Conservação. I. Prata, Luiz Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

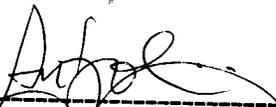
BANCA EXAMINADORA



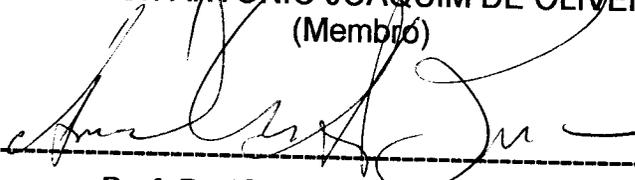
Prof. Dr LUIZ FRANCISCO PRATA
(Orientador)



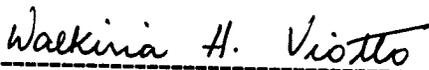
Prof. Dr SALVADOR MASSAUGER ROIG
(Membro)



Prof. Dr. ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA
(Membro)



Prof. Dr. ISMAEL ANTONIO BONASSI
(Membro)



Prof^a. Dra. WALKIRIA H. VIOTTO
(Membro)

Dra. ARIENE FERNANDES VAN DENDER
(Suplente)

Prof^a Dra. GLAUCIA MARIA PASTORE
(Suplente)

Para
RUI e NANCY,
JOSÉ CARLOS,
DANIEL, FABRÍCIO e RICARDO.
O início, os sonhos, a continuidade.

“... BASTA PENSAR em sentir
Para sentir em pensar.
Meu coração faz sorrir
Meu coração a chorar.
Depois de parar e andar,
Depois de ficar e ir,
Hei de ser quem vai chegar
Para ser quem vai partir.

Viver é não conseguir...”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Francisco Prata, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. José Sátiro de Oliveira, pelos ricos ensinamentos.

Às jovens Claudia e Beth, técnicas da planta de leite da FEA-UNICAMP, pela atenção.

Aos funcionários Wilson, Leia e Marcinha, eficiente colaboradora, pelo perfeito atendimento no Depto. de Tecnologia dos Produtos Agropecuários da FCA-UNESP.

Ao auxiliar técnico, Edson Bruder, do Depto de Física e Biofísica do IB-UNESP, pelas análises de eletroforese.

À Lurdinha, pelas idéias maravilhosas e, à Yara, pela alegre cooperação.

Aos amigos, Ana Lurdes, Marney, Waldemar e Afra pelo apoio e à Adília, agradecimento especial, pela hospedagem e pelas horas esquecidas em longos papos.

A todos que, de uma forma ou outra, estiveram envolvidos na execução deste projeto.

Índice Geral

ASSUNTO	PÁGINA
ÍNDICE GERAL	I
ÍNDICE DE TABELAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
RESUMO.....	VII
SUMMARY	VIII
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
1. Considerações gerais	7
2. Caracterização das frações protéicas do leite	8
3. Leite UHT	16
3.1. Considerações gerais	16
3.2. Alterações decorrentes do processamento UHT	17
4. Enzimas proteolíticas	23
4.1. Enzimas proteolíticas de origem microbiana	24
4.2. Plasmina (EC 3.4.21.7).....	29
5. Considerações sobre métodos de monitoração de atividade proteolítica.....	36
MATERIAL E MÉTODOS	44
1. Matéria prima	45
1.1. Leite “longa-vida” (UHT)	45
1.2. Leite cru	46
1.3. Tratamentos efetuados na matéria prima	46
2. Atividade proteolítica.....	47
2.1. Diálise	47
2.2. Método ultravioleta	48
2.3. Método da ninidrina	48
2.4. Método da ninidrina ácida.....	48
2.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamina (PAGE)	49

3. Acidez Dornic.....	49
4. Provas de estabilidade do leite.....	49
4.1. Ao calor.....	49
4.2. Ao álcool.....	49
5. Análises microbiológicas.....	50
5.1. Psicotróficos.....	50
5.2. Psicotróficos proteolíticos.....	50
5.3. Pseudomonas sp.	50
6. Análise estatística.....	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
1. Monitoração da proteólise no leite UHT comercial.....	53
2. Avaliação microbiológica de leite cru refrigerado.....	62
3. Monitoração da proteólise em leite UHT desnatado comercial após os tratamentos.....	71
4. Comparação de médias pelo teste de Tukey.....	80
5. Separação eletroforética PAGE da caseína inteira.....	82
CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

Índice de Tabelas

Tabela 1. Concentração das diversas frações que compõem as proteínas do leite de vaca.	9
Tabela 2. Alguns peptídeos ou fragmentos derivados da caseína (cn) por proteólise limitada.	14
Tabela 3. Perdas vitamínicas em leite de vaca esterilizado pelo processo clássico e pelo processo UHT.	18
Tabela 4. Composição das frações nitrogenadas solúvel obtida por diferentes técnicas de precipitação.	36
Tabela 5. Métodos para estimação rápida de proteólise em queijos.	37
Tabela 6. Evolução da atividade proteolítica em leite UHT armazenado a temperatura ambiente (A 210nm).	54
Tabela 7. Evolução da atividade proteolítica em leite UHT armazenado à temperatura ambiente (A 220nm).	55
Tabela 8. Evolução da atividade proteolítica em leite UHT armazenado a temperatura ambiente (A 570nm).	57
Tabela 9. Evolução da proteólise. Comparação de metodologia.....	60
Tabela 10. Contagem total de leite cru (ufc/ml), fornecida pela Industria para produtores cadastrados como fornecedores do tipo B.	64
Tabela 11. Microrganismos psicrotróficos em leite cru (ufc/ml) obtido de produtores cadastrados como tipo B.	65
Tabela 12. Psicrotróficos proteolíticos em leite cru (ufc/ml) obtido de produtores cadastrados como tipo B.	66
Tabela 13. Valores médios das contagens microbianas (ufc/ml) obtidas de leite cru refrigerado e suas relações percentuais.	67
Tabela 14. Contagem total de leite cru (ufc/ml) obtido de produtores cadastrados como tipo B.	69
Tabela 15. Microrganismos psicrotróficos proteolíticos (ufc/ml) em leite cru obtido de produtores cadastrados como tipo B.	69
Tabela 16. Pseudomonas sp. (ufc/ml) em leite cru obtido de produtores cadastrados como tipo B.	70

Tabela 17. Valores médios (ufc/ml) das contagens microbianas obtidas de leite cru de produtores tipo B, e suas relações percentuais	71
Tabela 18. Evolução de proteólise nos tratamentos de leite UHT desnatado pelo método da ninidrina ácida (A470).	72
Tabela 19. Evolução de proteólise nos tratamentos de leite UHT desnatado pelo método da ninidrina normal (A570).	73
Tabela 20. Evolução da acidez (°D) dos tratamentos de leite UHT desnatado	73

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura espacial da β -caseína A.	10
Figura 2. Estrutura tridimensional da α S ₁ -caseína.	11
Figura 3. Estrutura tridimensional da κ -caseína.	12
Figura 4. Separação eletroforética PAGE de caseína inteira. Amostras obtidas a pH 4,6, gel corado com Coomassie R250. Densitograma a 590nm.	39
Figura 5. Comparação de densitometria de caseína inteira obtida de leite cru e de leite esterilizado UHT.	40
Figura 6. Média dos valores obtidos para os métodos utilizados na avaliação da atividade proteolítica de leite UHT.	56
Figura 7. Comparação das médias obtidas durante o armazenamento de vários tipos de leite UHT em dois comprimentos de ondas. (220 e 570nm).	58
Figura 8. Evolução da proteólise. Comparação de metodologia.	62
Figura 9. Evolução da proteólise em leite UHT desnatado. Comparação dos tratamentos 0, 1 e 2. (A_{470nm}).	75
Figura 10. Evolução da proteólise em leite UHT desnatado. Comparação dos tratamentos 0, 3 e 4. (A_{470nm}).	76
Figura 11. Evolução da proteólise em leite UHT desnatado. Comparação dos tratamentos 0, 5 e 6. (A_{470nm}).	77
Figura 12. Evolução dos tratamentos 0, 1 e 2 em leite UHT desnatado. (A_{570nm})	78
Figura 13. Evolução dos tratamentos 0, 3 e 4 em leite UHT desnatado. (A_{570nm})	79
Figura 14. Evolução dos tratamentos 0, 5 e 6 em leite UHT desnatado. (A_{570nm})	79
Figura 15. Separação eletroforética PAGE de caseína total. Densitograma do leite UHT desnatado controle, obtidos a 30 dias (a), 120 (b) e 210 dias (c) mantidos à temperatura ambiente.	83
Figura 16. Separação eletroforética PAGE de caseína total. Densitogra-	

ma do leite UHT desnatado com plasmina, obtido a 30 (a), 120 (b) e 210 dias (c) mantidos à temperatura ambiente.	85
Figura 17. Separação eletroforética PAGE de caseína total. Densitograma do leite UHT desnatado com plasmina e citrato de sódio, obtido a 30 (a), 120 (b) e 210 dias (c) mantidos à temperatura ambiente.	86
Figura 18. Separação eletroforética PAGE de caseína total. Densitograma do leite UHT desnatado com extrato de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , obtido a 30 (a), 120 (b) e 210 dias (c) mantidos à temperatura ambiente.	88
Figura 19. Separação eletroforética PAGE de caseína total. Densitograma do leite UHT desnatado com extrato de <i>Pseudomonas fluorescens</i> + citrato de sódio, obtido a 30 (a), 120 (b) e 210 dias (c) mantidos à temperatura ambiente.	88
Figura 20. Separação eletroforética PAGE de caseína total. Densitograma do leite UHT desnatado com plasmina + extrato de <i>Pseudomonas fluorescens</i> , obtido a 30 (a), 120 (b) e 210 dias (c) mantidos à temperatura ambiente.	89
Figura 21. Separação eletroforética PAGE de caseína total. Densitograma do leite UHT desnatado com plasmina + extrato de <i>Pseudomonas fluorescens</i> + citrato de sódio, obtido a 30 (a), 120 (b) e 210 dias (c) mantidos à temperatura ambiente.	89

RESUMO

O leite esterilizado UHT pode sofrer alterações importantes durante o armazenamento, limitando seu período de conservação. Essas alterações são atribuídas à ação de proteases produzidas por bactérias psicrófilas ou à plasmina. Poucas pesquisas tem sido realizadas, no Brasil, dificultando a identificação correta do problema.

Foram verificadas as condições proteolíticas e as alterações nas frações da caseína do leite UHT adquirido no comércio. Foram realizados, também, experimentos com adição de 7 tratamentos diferentes durante 180 dias de manutenção a temperatura ambiente, empregando metodologia padronizada, com densitogramas obtidos através de eletroforese (PAGE) da caseína total.

Os resultados mostraram que a diálise não foi eficaz como método alternativo de fracionamento, na avaliação da atividade proteolítica. No entanto, o método da ninidrina ácida mostrou-se eficiente para monitorar alterações na κ -caseína. A adição de citrato de sódio 0,025% protegeu o leite de geleificação pela ação da plasmina, embora os densitogramas tenham mostrado alterações nas frações de caseína. Não foi observado geleificação em todos os outros tratamentos, apesar de se observar evolução da proteólise sobre a caseína evidenciada pelas variações de absorvância e pelos respectivos densitogramas.

O leite cru refrigerado apresentou qualidade microbiológica adequada, com contagens menores nas análises efetuadas durante o período de junho e, contagens maiores para as amostras analisadas em dezembro, possibilitando um reconhecimento das condições microbiológicas das regiões de Campinas e Botucatu.

SUMMARY

Alterations occurred during the storage of UHT sterilised milk limit its shelf-life. These alterations are probable due to proteinases coming from psychrotrophic bacteria or to plasmin. The lack of research on this subject, in Brazil, difficult the correct identification of the problem.

In the present work it was determined the proteolytic conditions and casein alterations of UHT milk usually found in the market. In addition, it were also performed experiments during 180 days of storage, with 7 different treatments, at room temperature employing standardised methodology through whole casein electrophoresis (PAGE).

The results showed that the dialysis did not work as an alternative method for the fractionation to evaluate the proteolytic activity. However, the acid ninhydrin method was shown to be a efficient way to control the κ -casein alterations. The addition of sodium citrate (0.025%) avoided the occurrence of milk gelation due to the plasmin action, although the densitograms showed alterations in the casein fractions. It was not observed gelation with all other treatments, in spite of the evolution of the proteolytic activity on the casein, evidenced by absorbance variation and respective densitograms.

The raw milk showed adequate microbiological quality. The bacterial counts were lower in June and higher in December allowing the determination of the microbiological conditions in Campinas and Botucatu areas.

INTRODUÇÃO

O leite é um produto de grande importância na alimentação humana, porque fornece uma proporção equilibrada de nutrientes. É um dos produtos alimentícios em estado líquido de maior volume atualmente vendido em todo o mundo. Por ser um alimento bastante perecível, tornou-se necessário submetê-lo a um tratamento térmico, a fim de que o seu período de conservação se tornasse maior. O processo de esterilização UHT (Ultra High Temperature Treatment) é um dos métodos que permite a conservação e o prolongamento de sua durabilidade em condições de temperatura ambiente.

Entretanto, o leite tratado pelo sistema UHT, pode sofrer alterações importantes durante o armazenamento, limitando o seu período de conservação. A causa principal destas alterações tem sido atribuída a ação de lipases e proteases, próprias do leite (nativas) ou de origem bacteriana, que não sendo afetadas pelo tratamento térmico, permanecem ativas.

A atividade proteolítica está associada à desestabilização do leite "longa vida" durante o período de armazenamento. Ela é responsável pela rarefação ou aumento de transparência, gelificação e coagulação, aparecimento de sabor amargo e aumento gradual do nitrogênio não proteico (NNP).

A utilização de baixas temperaturas para possibilitar um maior período de armazenamento do leite cru, a nível de produção, tem favorecido a seleção e desenvolvimento de microrganismos psicrófilos, principalmente do gênero *Pseudomonas*, com capacidade de produzir proteases extracelulares, que demonstram extrema resistência aos tratamentos térmicos convencionais de laticínios.

A presença de plasmina ou de seu precursor, plasminogênio, tem sido apontados como fatores limitantes para o armazenamento do leite UHT. Sabe-se que essa enzima assume um papel importante frente as alterações proteolíticas, porém sua situação é praticamente invariável e encontra-se bem definida.

O defeito de gelificação tem sido verificado em partidas de leites comerciais, fazendo com que, na maioria das vezes, a indústria reduza o tempo de validade de seu produto. É sabido que esse tempo pode ser de até seis meses à temperatura ambiente e o que se verifica, na prática, é que o aparecimento de alterações geralmente ocorre por volta de três meses.

Poucas pesquisas sobre o assunto tem sido conduzidas no Brasil. Isso faz com que não haja uma identificação correta das causas do defeito quando ele ocorre no leite UHT nacional. Não se conhecem os verdadeiros parâmetros envolvidos na gelificação, ou seja, se ela é decorrente do excesso de microrganismos psicrófilos no leite cru, ou devido ao mecanismo plasmina-plasminogênio, ou da somatória desses fatores.

Através de metodologia utilizando diálise e espectrometria na região ultravioleta do espectro, em comprimentos de onda de 210 a 220 nanômetros, pode-se determinar de forma simples a atividade proteolítica em amostras de leite. Outros métodos que utilizem reações com ninidrina, na faixa visível do espectro, também foram aplicados, tentando fornecer parâmetros que possam auxiliar na detecção precoce da proteólise, de forma a poder identificar leites com potencial de geleificação antes da ocorrência deste defeito. Em paralelo tentou-se conhecer o comportamento microbiano do leite cru, em regiões produtoras de leite tipo B.

OBJETIVOS

O presente trabalho será dividido em três fases com os objetivos seguintes:

- Verificar as condições proteolíticas do leite UHT comercializado, utilizando marcas e características diferentes, durante período prolongado, utilizando, para tanto metodologia espectrofotométrica nas regiões ultravioleta e visível do espectro.
- Monitorar possíveis alterações nas diferentes frações da caseína no leite UHT comercial, utilizando procedimentos variados para obtenção das frações nitrogenadas, com análises efetuadas através de metodologias diferentes.
- Reconhecer a qualidade microbiológica do leite cru, mantido sob refrigeração, em nosso meio, visando identificar a representatividade dos principais grupos de microrganismos envolvidos em alterações proteolíticas,
- Caracterizar a evolução proteolítica em amostras de leite UHT comercial, de mesma marca, característica e partida, empregando tratamentos diferentes e metodologia padronizada, durante armazenagem por 210 dias à temperatura ambiente.
- Ilustrar as possíveis alterações proteolíticas, já caracterizadas, empregando eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Considerações gerais

Alguns aspectos básicos da conservação de alimentos devem ser considerados. Até cerca de 150 a 200 anos atrás não existiam conhecimentos suficientes que permitissem elaborar alimentos duradouros mediante a aplicação de calor. Graças aos avanços no campo da microbiologia, aos conhecimentos sobre as regras de destruição térmica e devido aos desenvolvimentos técnicos das indústrias alimentares, conseguiu-se a elaboração de conservas alimentares duradouras.

O envase asséptico em latas foi desenvolvido nos anos 40 pela companhia americana Dole-Martin. Esse sistema utilizava vapor a 273^o a 300^oC durante 40 segundos para esterilizar as latas e para manter a esterilidade até o final do processo. Há relativamente poucos anos sabe-se que se pode utilizar, também, um processo esterilizador que segue ordem inversa, isto é, esteriliza-se e, após, faz-se o envase, tal como é praticado no processo UHT. Esse processo tem sido considerado por alguns pesquisadores como um dos mais destacados avanços, depois que o francês Louis Pasteur demonstrou o efeito benéfico do aquecimento sobre vinhos e líquidos similares. O aquecimento do leite por temperatura ultra alta (UHT) junto com o envase asséptico teve, a partir dos anos sessenta, uma crescente aceitação em todo o mundo. (SCHULZ, 1994).

SOUZA (1975) em artigo técnico sobre o leite UHT faz a seguinte ponderação interessante: "Quando o leite longa-vida em suas embalagens assépticas irá substituir o leite pasteurizado no Brasil? A resposta a essa pergunta poderá vir no dia em que o leite longa-vida competir em sabor e preço com o leite pasteurizado".

No Brasil, pode-se considerar que sómente na década de 90, mais precisamente nos três últimos anos, é que o consumo de leite longa-vida vem se acentuando. O consumo cresceu de 184 milhões de litros em 1990 para 759 milhões de litros em 1994 , estimulado pelo preço que, às vezes, se iguala ao do tipo B.

Poucos artigos nacionais de pesquisa foram encontrados sobre o assunto durante esta revisão, embora haja sérios problemas ocorrendo durante o tempo de prateleira do leite UHT, envolvendo o equilíbrio físico-químico do leite.

Sabe-se que a gelificação que pode ocorrer com os produtos lácteos durante o seu tempo de prateleira pode ter dois mecanismos diferentes. Um deles é a degradação proteolítica da caseína, que torna as micelas sensíveis à agregação. Algo semelhante ao que ocorre na coagulação pela renina sucede em leite UHT, porque as proteinases, especialmente algumas bacterianas, resistem ao tratamento térmico. O armazenamento do leite cru durante alguns dias à temperaturas baixas agrava consideravelmente o problema pelo crescimento de psicotróficos que produzem proteinases termorresistentes. Se existe proteinase láctea (plasmina) haverá dissolução da caseína muito mais marcante do que sua geleificação. Um outro mecanismo envolve a ocorrência de reações químicas, indicando o papel importante dos enlaces químicos cruzados. Variáveis diversas envolvem efeitos distintos nessa instabilidade, tais como: as reações redox, a reação de Maillard, concentrações do leite, armazenamento à temperaturas baixas, tratamento térmico intenso, adição de açúcares, adição de polifosfatos, adição de sequestrantes de cálcio, etc. (WALSTRA & JENNESS, 1987).

2. Caracterização das frações protéicas do leite.

A caseína é a principal envolvida na instabilidade do sistema durante o armazenamento do leite UHT, sendo que as proteínas solúveis também influenciam no processo. As concentrações das diversas frações que compõem as proteínas do leite, estão relacionadas na tabela 1.

Tabela 1. Concentração das proteínas e suas frações no leite de vaca

	concentração no leite		% prot total
	mmol.m ⁻³	g.kg ⁻¹	p/p
proteína total	33.0	~1490	100.0
caseína total	26.0	1170	79.5
prot. do soro	6.3	~320	19.3
prot na membrana			
do glob. gordura	0.4		1.2
caseína- α_{s1}	10.0	440	30.6
caseína- α_{s2}	2.6	110	8.0
caseína- β	9.3	400	28.4
caseína- γ *	0.8	40	2.4
caseína- κ	3.3	180	10.1
α -lactoalbumina	1.2	90	3.7
β -lactoglobulina	3.2	180	9.8
soroalbumina	0.4	6	1.2
imunoglobulinas	0.7	~4	2.1
várias (incluída proteose-peptona)	0.8	~40	2.4

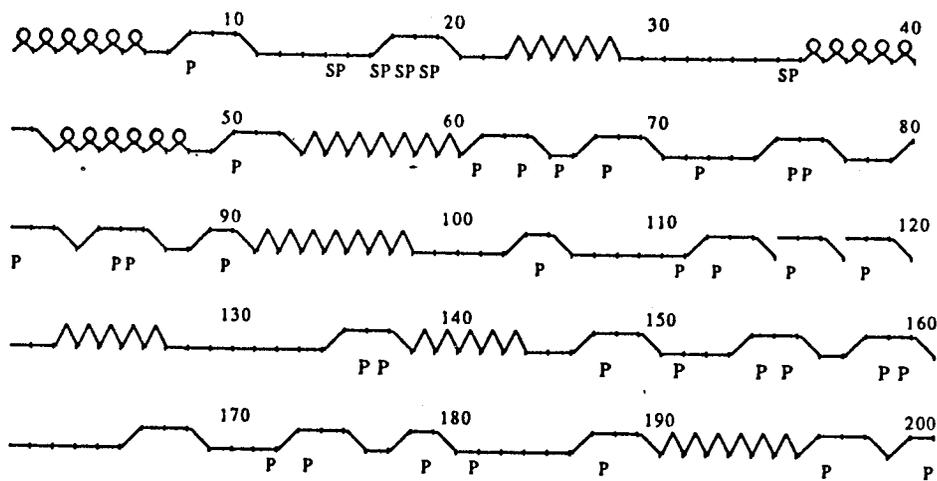
* frações resultantes de ação enzimática sobre β -caseína

Fonte: Walstra & Jenness (1987).

Originalmente, as caseínas são definidas como fosfoproteínas que se precipitam, no leite cru, após acidificação a pH 4.6, a 20 °C. Sua solubilidade, nessas condições, é muito menor que a de qualquer proteína do soro, o que permite uma separação eficiente. Sob o ponto de vista de composição, a marca de pureza das caseínas é o enlace éster-fosfato. Todas as cadeias polipeptídicas de caseína têm, ao menos, um destes grupos por molécula, enquanto nenhuma proteína do soro os contém. As caseínas α_{s1} e β não possuem resíduos de cisteína; as caseínas α_{s2} e κ possuem dois cada uma; o conteúdo de prolina é alto em todas as frações (WALSTRA & JENNESS, 1987).

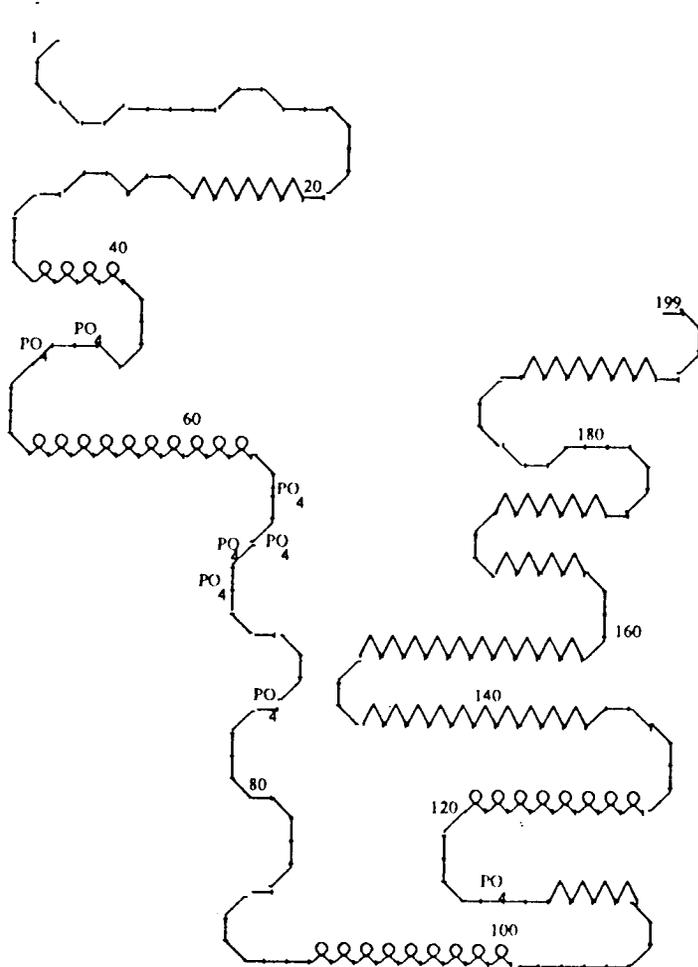
Nenhuma das quatro frações de caseína tem uma estrutura secundária muito organizada. Os métodos de análise sugerem nada mais que estruturas de α -hélice e lâmina β de longitudes curtas. Sua conformação se parece muito com a das proteínas globulares desnaturadas. O número elevado e a distribuição uniforme dos resíduos de prolina permitem uma estrutura secundária densa e ordenada. Uma pequena parte de α S₂-cn aparece como dímero unido por pontes dissulfeto, e a caseína κ se apresenta naturalmente como uma mistura de oligômeros unidos por pontes dissulfeto. As quatro caseínas diferem muito entre si na distribuição de carga e na tendência a agregar-se na ausência e presença de íons cálcio. (WALSTRA & JENNESS, 1987).

As figuras 1, 2 e 3 mostram um modelo molecular tridimensional das frações da caseína mais diretamente envolvidas com a ação enzimática, β -caseína, α S₁-cn e por último a configuração da fração κ -cn.



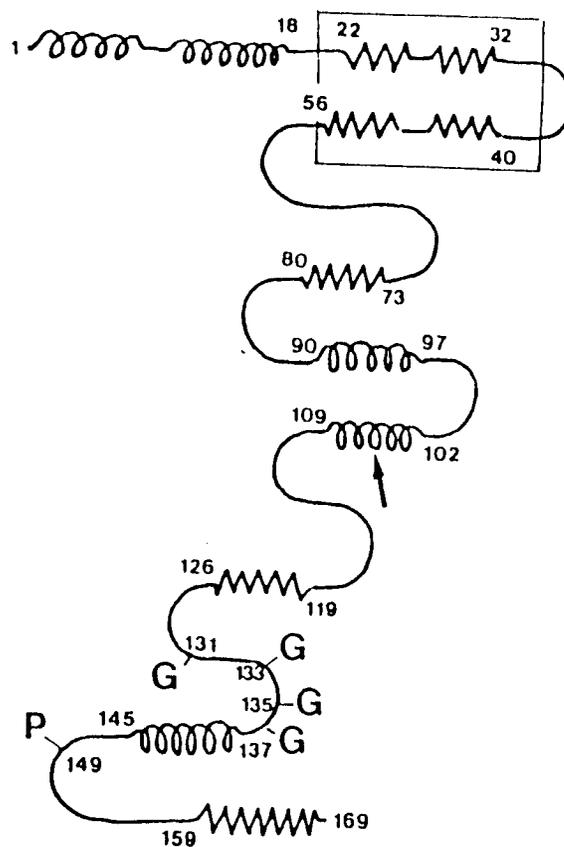
Fonte: Kumosinski et alii (1993)

Figura 1. Estrutura espacial da β -caseína A². P significa prolina e SP serina fosfato



Fonte: Kumosinski et alii (1991)

Figura 2. Estrutura tridimensional da αS_1 -caseina.



↙ : Sítio de ataque da quimosina
 G : Parte glucídica

Fonte: Cheftel et alii (1989)

Figura 3. Estrutura tridimensional da κ -caseína.

As frações α_{S_1} e α_{S_2} são cálcio sensíveis, precipitando com 0.4 M de CaCl_2 a pH 7.0 e a 4°C. São conhecidas 5 variantes genéticas da α_{S_1} -cn: A, D, B, C e E, de acordo com sua mobilidade eletroforética. Para reconhecimento de sítios específicos de fosforilação que podem caracterizar as variantes A, C e D, atualmente, tem sido utilizado a espectrometria de massa. (FERRANTI et alii, 1995).

De todas as proteínas alimentares, a proteína do leite bovino tem sido a mais caracterizada quimicamente, fisicamente e geneticamente. A fração beta é o componente com maior número de variantes genéticas (7 variantes). São resultantes dessa fração os fragmentos gama, as proteoses e peptonas, presentes no leite, quando ocorre ação da enzima plasmina. A κ -caseína possui duas variantes genéticas A e B. É sensível à renina (quimosina) e sua hidrólise ocorre em posição bem definida, resíduos Phe-Met (105-106), originando para- κ -caseína (resíduo 1-105) e um macro ou glicomacropéptideo (resíduo 106-169). Existe diferença na liberação desse macropéptideo por determinação genética. Há uma maior proporção glicídica localizada na banda de proteína derivada do alelo B da κ -caseína. A proporção destas frações na caseína total é: α_{S_1} = 38%, α_{S_2} = 10%, β = 36% e κ = 13%. A sensibilidade ao cálcio iônico está relacionada com o conteúdo de fosfoserina (Ser-P) e essa sensibilidade aumenta na ordem: α_{S_2} > α_{S_1} > β > κ -caseína. (WHITNEY, 1988; POULIOT et alii, 1994; VAN EENENNAAM & MEDRANO, 1991).

Com a proteólise, pela própria estrutura das caseínas, um certo número de resíduos susceptíveis são mais rapidamente hidrolizados enzimaticamente. Esses resíduos ocorrem nas regiões mais flexíveis da estrutura proteica, que usualmente representa resíduos em sítios ou regiões entre domínios hidrofóbico e polar, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Alguns peptídeos ou fragmentos derivados da caseína (cn) por proteólise limitada

enzima	peptídeo ou fragmento	funcionalidade
plasmina	γ -cn	
(Fibrinolisinase, EC 3.4.21.7)	β -cn X(f29-209)	hidrofóbico
	β -cn X(f106-209)	hidrofóbico
	β -cn X(f108-209)	hidrofóbico
	proteose-peptona	
	β -cn X(f1-105 ou 107)	termoestável, muito solúvel
	β -cn X(f29-105 ou 107)	termoestável, muito solúvel
	β -cn X(f1-28)	termoestável, muito solúvel
Renina ou quimosina	para- κ -cn; κ -cn X(f1-105)	hidrofóbico, baixa solubilidade
(EC 3.4.99.19)	GMP; κ -cn X(f106-169)	muito polar, muito solúvel
	α s1-cn I; α s1cn B C (f25-199)	umenta hidrofobicidade
quimotripsina (EC 3.4.21.1.)	β -cn X (f1-52)	possível hélice alifática
tripsina (EC 3.4.21.4)	peptídeos da região da β -cn X(f196-209)	peptídeos amargos
Pepsina (EC.3.4.23.1), enzimas intestinais	peptídeos da região da β -cn X (f60-70)	atividade apióica

Fonte: Swaisgood (1993).

A maior parte das variações que causam a heterogeneidade da κ -cn ocorre na região do κ -macropeptídeo (glicomacropeptídeo ou GMP). Este GMP contém os carboidratos originalmente presentes na κ -cn. A hidrólise do κ -MP tem sido objeto de vários estudos porque ele possui muitas funções fisiológicas. (SHAMMET et alii, 1992a).

Cromatogramas dos produtos da hidrólise com renina de bezerro, com *Mucor miehei* e com *Cryphonectria parasitica* revelaram que as enzimas hidrolizaram a κ -caseína diferentemente. A hidrólise pela quimosina foi limitada pela formação de κ -macropeptídeo e κ -paracaseína; as reninas microbianas, particularmente de *M. miehei* produziu uma extensa hidrólise não específica, de κ -caseína e κ -paracaseína. O macropeptídeo foi resistente à ação enzimática da quimosina (SHAMMET et alii, 1992b).

Através de técnica imunológica, utilizando anticorpos específicos, é possível analisar leite de diferentes espécies baseando-se na detecção do glicomacropeptídeo bovino. A reprodutibilidade dos resultados levaram BITRI et alii (1993) a recomendarem esse método como alternativo, para quantificar a presença de leite bovino, em produtos caprinos ou ovinos via detecção de κ -cn ou GMP. Os resultados foram eficientes tanto para leite cru como para leite tratado termicamente, uma vez que os tratamentos tecnológicos podem produzir mudanças qualitativas nas frações protéicas.

A importância das variantes genéticas está relacionada com a amplitude de coagulação dos leites, isto porque essas variantes têm sequências diferentes de aminoácidos, permitindo ou não o acesso à clivagem enzimática que é específica. No caso, para um mesmo conteúdo de caseína a variabilidade de coagulação está relacionada com a frequência da variante B da κ -caseína. O conteúdo de caseína, a frequência de κ -cn B e a estação do ano são responsáveis por 82% da variabilidade na firmeza de coagulação (MARTIN & COULON, 1995).

As proteínas do soro são descritas como aquelas remanescentes no soro, após a precipitação das caseínas. Incluem as β -lactoglobulinas, α -lactoalbuminas, soro-albuminas e imunoglobulinas. Dessas proteínas solúveis, somente a β -lactoglobulina está mais relacionada com a estabilidade de leite UHT durante o armazenamento. O peso molecular dessa proteína é próximo daquele da β -cn, sendo uma proteína classificada como hidrofóbica-transportadora. Junto com a β -cn, a β -lactoglobulina tem sido amplamente caracterizada quanto aos sítios de clivagem enzimática (WHITNEY, 1988 ; BRIAND et alii, 1994).

As proteínas do soro representam a maior parte das proteínas funcionais utilizadas em alimentos, podendo constituir em um isolado obtido através de diálise. Esse isolado pode sofrer modificações durante sua armazenagem, como hidrólise parcial e polimerização, afetando suas propriedades. (RECTOR et alii, 1991).

No leite, o equilíbrio físico é atribuído ao complexo caseína-proteína que é essencial para a manutenção de sua estabilidade. É responsável, ainda, pela tensão do coágulo formado nos queijos e, também, pela produção de alimentos sintéticos que utilizem caseinatos. O fosfocaseinato nativo é um produto relativamente novo obtido da microfiltração de leite desnatado, que oferece novas possibilidades de enriquecimento protéico em queijos e possibilidades de se obter β -caseína pela sua solubilização. São forças responsáveis pela estabilidade do complexo-caseína: as interações hidrofóbicas, as interações eletrostáticas, as estruturas terciárias e secundárias, as pontes de hidrogênio, as ligações dissulfito e o fosfato de cálcio coloidal. (FARREL, 1988).

3. Leite UHT.

3.1. Considerações gerais.

O processo UHT pode ser descrito como um tratamento térmico utilizado para pasteurizar ou esterilizar o leite. No caso da esterilização, que é o objetivo principal desta revisão, utilizam-se temperaturas de 135-150^o C. por não menos que 1 segundo, seguido por envase asséptico, sendo o leite obrigatoriamente homogeneizado, exceto quando desnatado. Os microrganismos são destruídos pelo calor quando suas proteínas coagulam e as enzimas requeridas para seu metabolismo são inativadas. O tratamento pode ser classificado como direto ou indireto de acordo com o equipamento utilizado no processo, havendo, no primeiro caso, injeção de vapor seguida da retirada do mesmo ou injeção do leite (spray) em uma atmosfera de vapor. No segundo caso existe uma barreira entre o leite e condutor de calor, que geralmente é de aço inoxidável, não havendo portanto contato físico e o meio de aquecimento. Em ambos os sistemas, parte da

transferência de calor será regenerada, o que representa uma considerável economia no uso de energia para o aquecimento. Portanto mesmo assim chamado sistema “direto”, a maior parte da troca de calor é indireta, e somente nos últimos estágios do aquecimento até a temperatura de esterilização, o aquecimento é feito pelo método direto. (MEHTA, 1980).

As principais etapas dos processos UHT podem ser relacionadas, com as diferenças existentes entre os fluxogramas, conforme o esquema a seguir:

Processos UHT	
indireto	direto
tanque de balanço	tanque de balanço
pré-aquecimento	pré-aquecimento
bomba de alta pressão	bomba
homogeneizador	aquecimento UHT
aquecimento UHT	esfriamento por expansão
recuperação térmica	bomba asséptica
resfriamento final	homogeneizador asséptico
	resfriamento final
envase asséptico	envase asséptico

Fonte: `Schulz (1994)

A grande vantagem do sistema de aquecimento direto é o rápido aquecimento e resfriamento, o que, sem dúvida, reduz a possibilidade de haver mudanças físicas e químicas que poderiam ocorrer durante o tratamento UHT, no entanto, torna-se importante a qualidade do vapor. Já no sistema de aquecimento indireto o vapor ou água quente circulam entre as paredes do trocador de calor. Da mesma forma, o resfriamento do leite é indireto pela utilização de vários meios refrigerantes. Os aparelhos utilizados em ambos sistemas, possuem as características de serem compactos, inteiramente automáticos, de baixo custo de operação e com circuito fechado de limpeza e esterilização. (SOUZA, 1975).

3.2. Alterações decorrentes do processamento UHT.

Do ponto de vista nutricional o leite após tratamento térmico elevado, sofre algumas alterações apenas em seu conteúdo vitamínico. Com a utilização do sistema UHT, essas perdas também foram minimizadas como pode-se observar pelos dados mostrados na tabela 3.

Tabela 3. Perdas vitamínicas em leite de vaca esterilizado pelo processo clássico e pelo processo UHT

vitamina	leite de vaca (por 100 ml)	esterilização clássica (perda %)	UHT (perda %)
tiamina	45µg	30	10
riboflavina	180µg	ns	ns
a.nicotínico	80µg	ns	ns
vitamina B ₆	40µg	20	10
vitamina B ₁₂	0.3µg	<90	10
ac. pantotenico	350µg	ns	ns
biotina	2.0µg	ns	ns
ac. fólico	5.0µg	50	15
vitamina C	2.0µg	90	25
vitamina A	30µg	ns	ns
vitamina D	22µg	ns	ns
vitamina E	17µg	ns	ns

ns - não significativo

esterilização - 115^oC por 30min.

Fonte: Schulz, 1994

Já, do ponto de vista químico, alterações significativas podem ocorrer com os principais componentes do leite como proteínas e açúcar. A gordura sofre poucas alterações com o tratamento UHT, uma vez que o leite é obrigatoriamente homogeneizado. O que se observa são eventuais acúmulos de gordura na superfície

do leite durante um armazenamento prolongado. Não há uma maneira segura de diferenciar as alterações que são decorrentes apenas do processo térmico daquelas provenientes do tempo de prateleira, porque a maior parte delas irão se instalar durante a vida útil ou período de estocagem do leite UHT (WALSTRA & JENNESS, 1987).

O tratamento UHT causa um aumento da viscosidade do leite. Durante os primeiros dias de estocagem essa viscosidade diminui, permanecendo constante por um período relativamente longo e, depois, rapidamente aumenta até à gelificação, sinalizando o final do tempo de prateleira . Isso pode acontecer após um mês, mas geralmente ocorre após 3 meses. A estabilidade das proteínas ao etanol, a coagulação pela renina e a sensibilidade aos íons cálcio decrescem durante a estocagem (HILL, 1988).

DALGLAEISH (1992), através de cálculos matemáticos, mostrou que a micela de caseína possui uma tendência à sedimentação durante a armazenagem por vários meses, produzindo uma camada de material sedimentado que é mais pronunciada em leites concentrados, sendo o efeito de difusão insuficiente para compensar essa tendência. O resultado dos cálculos mostraram que a formação de sedimento pode ser um efeito puramente físico, que é inevitável quando o leite permanece em repouso por extensos períodos, sendo agravado pela concentração antes da armazenagem.

Um outro problema que pode ocorrer durante a armazenagem foi relacionado por ZIN EL-DIN et alii (1991), e consiste na polimerização e degradação da caseína. O leite foi mantido a 5 e 30^oC durante 150 dias e, os resultados , segundo os autores, sugerem que a caseína é polimerizada gradualmente, originando dímeros, trímeros ou polímeros, confirmados por cromatografia de alta eficiência - gel filtração. Os resultados obtidos mostraram formação de dímeros e trímeros, sendo, no entanto, maior a formação de polímeros, quando comparada com a formação de trímeros. O efeito foi maior à temperatura de 30^oC. De acordo com as conclusões relatadas, a polimerização e degradação da caseína podem ocorrer pela ação de enzimas proteolíticas ou como efeito resultante da reação de Maillard.

O calor induz reação de condensação entre o aldeído livre da lactose e o grupo amino livre dos aminoácidos do leite, principalmente lisina, provocando efeitos visíveis durante o processamento (escurecimento), ou no armazenamento prolongado de leite UHT. É a reação de Maillard. Vários intermediários são formados durante a reação, cujas concentrações determinam a severidade do tratamento pelo calor durante o processamento e, as condições de temperatura, durante o estoque de leite processado UHT (ADHIKARI & SINGHAL, 1991).

A interação da proteína e lactose, que ocorre com a reação de Maillard, pode ter participação na gelificação por envelhecimento de leites UHT concentrados. VENKATACHALAM et alii (1993) utilizaram amostras com teores variados de lactose e sacarose e, verificaram que todas as amostras gelificaram ao serem estocadas a 4 e 20°C após 21 semanas. As amostras mantidas a 35°C não formaram gel, reações intermicelar proteína-proteína promoveram uma proteção contra o envelhecimento, antes que ocorresse a reação carboidrato-proteína da reação de Maillard. A gelificação que ocorre nesses concentrados pode ser explicada, em um estágio inicial, por um aumento de reatividade na superfície das micelas de caseína pelo acúmulo de proteínas dissociadas. Esse acúmulo pode ser acelerado pela proteólise da caseína dentro das micelas. O segundo estágio ocorre com a agregação dessas partículas coloidais ativadas que permanecem na superfície da micela, de forma diferente do que ocorre na superfície original quando da coagulação do leite por renina ou ácido.

O aquecimento prolongado a altas temperaturas, promove alguma proteólise da caseína. LAW et alii (1994) evidenciaram como o calor pode induzir mudanças nas proteínas do soro e na caseína. O calor acima de 60°C aumenta a conformação globular e promove a associação das proteínas do soro com a caseína, através de interações dissulfeto ou hidrofóbicas. Nesse estudo foi mostrado que as proteínas do soro se desnaturaram após 5 minutos a 110°C e, acima dessas temperaturas, houve mudanças da caseína induzidas pela desnaturação daquelas proteínas solúveis.

As micelas de caseína são mais resistentes a alterações estruturais, enquanto as proteínas solúveis, especialmente a β -lactoglobulina, sofrem modificações que podem estar associadas a problemas de sedimentação e sabor de leites UHT. Há formação de complexo caseína-proteínas do soro, quando a concentração de cálcio iônico diminui, significativamente, depois do processamento UHT (HANSEN & MELO, 1977).

O aquecimento a 80°C aumenta a velocidade de hidrólise da fração β -cn pela tripsina e, também, protege uma parte da κ -cn, provavelmente como resultado da interação com as proteínas do soro. A α S-cn e, principalmente, a β -cn hidrolizadas por tripsina imobilizada, aumentam significativamente após o aquecimento. LEAVER & THOMSOM (1993) sugerem que o aquecimento pode causar um rearranjo da estrutura micelar que não é reversível com o resfriamento.

A interação da caseína com íons cálcio e sais de cálcio (fosfato de cálcio coloidal) é necessária para a formação e manutenção das micelas de caseína. A solubilidade das caseínas, na presença de cálcio, diminui com o aumento da temperatura e pH. Na presença de fosfato inorgânico e outros íons dos sais do leite, como os citratos, a interação do cálcio com a caseína é mais complexa. Tais interações tem papel chave para a estrutura e estabilidade natural da micela do leite. (SWAISGOOD, 1993a).

Para SHARMA et alii (1994), a hidrólise da κ -caseína, quando relacionada com a concentração do leite, pH e temperatura, mostra uma relação maior apenas com a concentração, decrescendo com o aumento dessa, confirmando que o tempo de agregação e de coagulação estão diretamente relacionados com a extensão da hidrólise da fração κ -caseína.

O estudo de GMP glicosilado e livre de carboidrato foi conduzido por FERRON-BAUMY et alii (1992), analisando leite cru coagulado por renina e leite UHT (140°C por 10 seg). O tratamento UHT diminuiu em 40% o conteúdo final da forma glicosilada, comparado ao valor determinado no leite cru. Os resultados mostraram que a κ -caseína livre de carboidrato constituía 52% de toda a κ -cn.

existente. Somente a forma glicosilada pareceu ser influenciada pela β -lactoglobulina quando o leite foi tratado pelo processo UHT.

A proteólise durante a armazenagem de leite UHT parece estar relacionada com o processo de aquecimento (direto ou indireto) e com o teor de matéria graxa. De acordo com LOPEZ-FANDINO et alli (1993), a degradação da caseína está diretamente relacionada com o teor de matéria graxa do leite, existindo maior atividade proteolítica no leite desnatado durante a armazenagem Houve um aumento tanto na atividade da protease nativa (plasmina) quanto daquela de origem bacteriana. Com relação ao processo de aquecimento, os autores observaram que houve menos proteólise nas amostras tratadas com UHT indireto do que naquelas tratadas com o sistema direto.

O processo IBT (inativação a baixa temperatura) tem sido usado para o controle de gelificação que ocorre durante armazenagem em leite esterilizado UHT. É um tratamento térmico de 55°C por 60 minutos, realizado depois do processamento UHT, para inativar proteases termorresistentes. KOCAK & ZADOW (1985) aplicaram o tratamento IBT antes da esterilização, por 5, 10 e 60 minutos, observando uma redução de proteólise na faixa de 12-27%, 8-78% e 18-81%, respectivamente. Altos níveis de inibição de proteólise não foram, necessariamente, associados com o aumento do tempo de prateleira. Os mesmos autores observaram que o IBT, depois do tratamento UHT, com períodos de aquecimento de 10-60 minutos, resultou em altos níveis de inibição de proteólise. A vida de prateleira dobrou nas amostras tratadas por 60 minutos. Para as amostras tratadas por poucos minutos o aumento da vida útil não foi significativo, embora os níveis de inibição de proteólise tenham sido semelhantes ao observado com IBT-60 minutos.

Nessa mesma linha, ZADOW (1991) observou que o tratamento IBT em leite cru com altas contagens microbianas pode ter êxito no aumento da vida de prateleira. O autor utilizou hexametáfosfato de sódio com IBT para obter o resultado citado. A adição de hexametáfosfato, sozinho, teve efeito na prevenção da gelificação prevenindo a agregação das micelas de caseína, mas não tendo papel

efetivo nas mudanças químicas provocadas por enzimas. Nesse caso, somente o tratamento IBT foi efetivo.

O controle da gelificação pelo envelhecimento pode ser feito pelo uso de aditivos. KOKAK & ZADOW (1985a) investigaram essa adição relacionando-a com as propriedades do leite UHT durante a armazenagem. A adição de citrato de sódio e EDTA (0.1 - 0.3%) acelerou a gelificação. A adição de hexametáfosfato de sódio (0.05-0.1%) estendeu a vida útil do leite. Ambos foram adicionados no leite cru armazenado sob refrigeração. O cloreto de cálcio teve sua efetividade relacionada com pH. O ajuste do pH do leite cru contendo CaCl_2 para 6.75, antes do tratamento, deu bons resultados, impedindo a gelificação, mas houve desenvolvimento de sedimento. Os aditivos estudados não tiveram efeito marcante na extensão ou velocidade de proteólise nas amostras de leite UHTarmazenadas. A hipótese proposta foi de que o mecanismo de gelificação possui dois estágios: o primeiro envolve alguma proteólise das proteínas do leite e, o segundo estágio envolve mudanças físico-químicas induzidas pela armazenagem, que afetam a agregação ou desestabilizam as micelas de caseína. Os aditivos agiriam nesse segundo estágio.

Houve um decréscimo significativo na tensão do gel de proteínas hidrossolúveis, obtidos por diálise, quando se usou quelantes de cálcio, mostrando, pelos resultados obtidos por KUHN & FOEGEDING (1991), que um mínimo de cálcio ou complexos de cálcio são importantes na gelificação das proteínas do soro.

MITTAL et alii (1990) utilizaram hexametáfosfato de sódio e não observaram, durante estocagem prolongada a 5 e 30°C, nenhum efeito na separação de gordura ou na sedimentação das amostras analisadas. O hexametáfosfato protegeu contra a gelificação durante mais de 75 semanas quando o produto foi estocado a 30°C, enquanto as amostras mantidas a 5°C gelificaram em 56 semanas.

A eficácia dos polifosfatos, como aditivos de leite UHT também foi verificada por KOKAK & ZADOW (1985 b), que não encontraram diferenças entre as formas adicionadas e observaram uma proteólise similar para as amostras, inclusive

nos controles. Os autores ressaltaram a necessidade de caracterizar a composição desses polifosfatos antes de se fazer uma indicação para o uso comercial.

McMAHON et alii (1991), trabalhando com leite UHT concentrado três vezes (redução de volume) por ultrafiltração, adicionaram fosfato de sódio e citrato de sódio. Essa forma de processamento é de interesse para a indústria de laticínios, pela facilidade de manuseio devido ao volume reduzido, mas é limitada pela geleificação que ocorre durante o estoque, com os mesmos mecanismos daquela que pode ocorrer com o leite fluido. No leite com aditivos a formação de gel por adição de renina foi prejudicada e, por esse motivo, os autores sugerem que não se faça a adição no leite concentrado, quando este for utilizado na fabricação de queijos.

4. Enzimas proteolíticas

Em 1979, HUMBERT & ALAIS publicaram uma extensa revisão sobre o sistema de proteases no leite. Dois aspectos foram ressaltados; a existência de atividade proteolítica no leite, através do isolamento e purificação das enzimas e estudo de suas propriedades e, em um segundo aspecto, o papel das proteinases em produtos derivados do leite e em tecnologia geral. Em suas conclusões, os autores enfatizam a persistência de atividade proteolítica depois do tratamento UHT, relacionando tanto a enzima de psicrotróficos quanto a proteinase alcalina, que necessita ainda ser extensivamente estudada.

No ano seguinte, LAW (1979) publicou uma importante revisão sobre enzimas de psicrotróficos, seu efeito no leite e nos produtos de leite. O autor relacionou os grupos de microrganismos, o mecanismo de ação de suas enzimas, sua especificidade e os efeitos dessas enzimas no leite. Relacionou ainda, a resistência térmica, os fatores que afetam a produção e os métodos de detecção dessas enzimas.

As enzimas proteolíticas podem ter aplicação potencial em laticínios, como o largo uso de renina na fabricação de queijos. Podem ainda produzir

hidrolisados de caseína, peptídeos fisiologicamente ativos como os resultantes da hidrólise da β -cn e, também, modificar a funcionalidade das proteínas por hidrólise limitada, para utilização na indústria de alimentos (FOX, 1993).

Quando se trata de leite esterilizado pelo processo UHT, as proteases assumem importância pelo seu papel na conservação desse leite, durante o período em que ele permanece armazenado. Tem-se a ação de enzimas produzidas por microrganismos psicrótrópicos e de enzimas provenientes do próprio leite, como a plasmina e seu precursor plasminogênio.

4.1. Enzimas proteolíticas de origem microbiana.

Existem evidências de que há um modelo de indução-repressão para regular a produção extracelular de proteinases por bactérias Gram-negativas, que são induzidas por peptídeos e por alguns aminoácidos (ácido glutâmico e glutamina para *Pseudomonas*). As proteinases são reprimidas por formas facilmente metabolizadas de carbono como o citrato, que não parecem ser mediadas por AMPc (adenosina monofosfato ciclíca) nas espécies de *Pseudomonas*. O controle também é feito por certos aminoácidos. A produção de proteinases pode ser afetada por nutrientes minerais do meio que tem efeito, indiretamente, no metabolismo celular, como o cobalto e o zinco. (FAIRBAIRN & LAW, 1986).

O ambiente também influencia na produção de proteinases; a temperatura ótima para crescimento de *Pseudomonas sp* é 20°C a pH neutro, porém a produção de proteinases, frequentemente, aumenta com a diminuição da temperatura. O oxigênio dissolvido e o pH também têm efeito na produção. Essas enzimas são sintetizadas e secretadas através da membrana pelo ligamento de um péptido-sinal ao N-terminal do fim do polipeptídeo. Várias espécies de *Pseudomonas*, quando presentes em número de 10⁶ufc/ml no leite cru, produzem metaloproteases neutras, extracelulares e termoresistentes, acarretando sérios problemas após o processamento, tanto para o leite fluido como para seus derivados (FAIRBAIRN & LAW, 1986).

Os psicotróficos, de maneira geral, produzem enzimas que não são completamente inativadas pelo tratamento UHT. A contagem desse grupo representa menos do que 10% da flora inicial do leite cru, entretanto esses microrganismos crescem rapidamente e, constituem o grupo dominante, durante a permanência do leite cru sob refrigeração. O gênero mais comum, encontrado no leite são *Pseudomonas sp.*, particularmente *P. fluorescens*. Outros microrganismos psicotróficos incluem *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter* e *Aeromonas*. As proteases produzidas pelos psicotróficos podem, mesmo à baixas concentrações, hidrolisar as proteínas do leite causando sabor amargo e gelificação na armazenagem de leite UHT. *Pseudomonas* e *Acinetobacter* a partir de níveis de 10^7 ufc / ml , no leite cru, podem produzir protease suficiente para degradar níveis detectáveis de caseína (SHAH, 1994).

MOTTAR (1981) verificou a influência dessas enzimas nas modificações do leite UHT armazenado. Das amostras analisadas, 97% continham proteases termorresistentes que não foram completamente inativadas depois do tratamento UHT. A qualidade bacteriológica do leite cru, mais particularmente a cifra de psicotróficos, determina a natureza e a quantidade dessas enzimas termorresistentes. Consequentemente, somente leite de boa qualidade microbiológica deve ser usado para a manufatura de leite UHT.

Algumas espécies de *Micrococcus* podem produzir enzimas proteolíticas extracelulares. Algumas delas degradam α -caseína. A temperatura ótima para crescimento de *Micrococcus* GF e produção de proteinase extracelular é de 30°C. Este gênero constitui a maior fração da população termodúrica do leite. A inibição de atividade enzimática pela adição de EDTA, indica que são metaloproteases. As enzimas produzidas por micrococos, no leite cru, têm importância somente na maturação de queijos, não constituindo maiores problemas em produtos esterilizados, como leite UHT, porque são termolábeis (valor Z = 7.58) (BHOWMIK & MARTH, 1990).

Já os microrganismos psicotróficos , como *Bacillus sp.*, por produzirem esporos resistentes ao calor, podem causar problemas organolépticos no leite

UHT, interferindo em sua qualidade durante a armazenagem (22°C - 37°C), principalmente pelo desenvolvimento de rancificação, uma vez que produzem, também, lipases termorresistentes (ADHIKARI & SINGHAL, 1992).

KOHLMANN et alii (1991c) testaram culturas de psicrotróficos com habilidade para produção de proteases, crescendo sob refrigeração. Destas duas culturas *P. fluorescens* e *P. fragi* produziram proteases extracelulares. No entanto, *P. fluorescens* produziu, também, uma enzima intracelular com atividade proteolítica maior do que a enzima extracelular até 20 horas de incubação. A atividade da enzima intracelular permaneceu constante até que a atividade extracelular (periplasmática) a ultrapassou, o que ocorreu após 6 dias de incubação. Ambas culturas produziram enzimas cuja atividades foram inibidas por EDTA, quelante de metais, indicando serem metaloproteases.

Quantidades significativas de D-alanina, D-ácido aspártico e D-ácido glutâmico livres, podem ser encontradas no leite cru de vaca . Essa quantidade não aumenta com a pasteurização, esterilização ou tratamento UHT. No entanto , o conteúdo de D-alanina em amostras de leite cru aumenta durante o estoque a 4°C, isto sugere que D-Ala pode ser considerado como um indicador de contaminação microbiana no leite. As presenças de D-Ala, D-Asp e D-Glu, detectadas em hidrolisados de proteínas do leite, podem ser atribuídas à condições não adequadas durante a hidrólise (GANDOLFI et alii, 1992).

Outras metodologias para medir atividade proteolítica foram relacionadas por MOTTAR (1987) : medida de liberação de tirosina, métodos colorimétricos com substratos específicos (azocaseína), métodos fluorescentes (fluorescamina), espectrométricos (TNBS, ninidrina), medida das modificações de N, método de difusão radial, radioativos e imunoensaios (ELISA).

KOHLMANN et alii (1991b) caracterizaram uma protease extracelular de *Pseudomonas fluorescens* M3/6, que foi purificada usando fracionamento com sulfato de amônia, cromatografia com troca iônica e filtração em gel. A protease isolada possuía atividade em substrato de azocaseína, α , β e κ -caseínas e em um

substrato para plasmina (S - 2251), mas não apresentou atividade de plasminogênio-ativador. A adição de EDTA (1mM) reduzia a atividade em 60%, e uma concentração de 10mM inibia totalmente a enzima. Protease de *P. fluorescens* tem atividade sobre as caseínas, preferindo κ a α e β -caseínas.

Uma outra cepa de *P. fluorescens*, INIA 724, foi utilizada por UCEDA et alii (1993) em leite de ovelha, afim de averiguar se a hidrólise ocorre como no leite de vaca. Os autores observaram uma quebra preferencial da β -cn quando o leite de ovelha foi inoculado com esta cepa e deixado por 6 dias a 4°C (24.12%) ou a 8°C (29.07%). No leite controle, sem inoculação do microrganismo, α -S-cn foi mais rapidamente degradada a 4°C (17.47%) e a 8°C (23.33%) do que a β -cn.

Em outro estudo realizado por GOBBETTI & CORSETTI (1995) foi constatado que *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 produz uma aminopeptidase com atividade associada a célula. Essa enzima com uma estrutura monomérica tinha um PM de 50.000. A atividade ótima da enzima ocorreu a pH 7.5 e a 45°C, sendo fortemente ativada por Co^{2+} e completamente inibida por EDTA, Os resultados foram obtidos utilizando péptides sintéticos como substrato. A especificidade revelada por esta enzima, levou à conclusão que: se existe a possibilidade de *Pseudomonas sp* produzir proteinases responsáveis pela presença de péptides amargos e, a possibilidade de alguns microrganismos de clivar esses péptides, então, a aminopeptidase produzida por *P. fluorescens* ATCC 948 pode ser utilizada, por sua particularidade de remoção de amargor, em leites com altos níveis de contaminação por *Pseudomonas sp*.

Nos últimos anos, o sistema péptide-hidrolase das bactérias lácticas utilizadas como fermento láctico tem sido extensivamente caracterizado. Aminopeptidases intracelulares de *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*, *Lactobacillus casei subsp casei*, *Lactobacillus sp* tem sido purificadas e caracterizadas. A principal diferença entre as cepas que produzem ou não sabor amargo está na presença de aminopeptidase intracelular, que é fundamental para o 'flavor' (RAJAGOPAL & SANDINE, 1990; BROOME & HICKEY, 1991 ; KOJIC et alii, 1991).

O efeito da aminopeptidase produzida por *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 também foi estudado por GOBBETTI et alii (1995), sobre peptídeos sintéticos amargos e, sobre uma endoprotease produzida por *Bacillus amyloliquefaciens*, responsável pelo aparecimento de péptides amargos em leite UHT. A aminopeptidase estudada, manteve 44% de sua atividade máxima na temperatura de 20°C que, de acordo com os autores, é a temperatura média de armazenagem de leite UHT, podendo ser, então, um mecanismo de controle desses peptídeos quando presentes no leite.

COLLINS et alii (1993) investigaram a influência do crescimento de psicotróficos no leite cru na aceitabilidade e durabilidade do leite UHT desnatado durante armazenagem. As amostras foram armazenadas por 120 dias a 20, 30 e 40°C. O número de psicotróficos no leite cru foi altamente correlacionado com a extensão de proteólise ($r=0.9476$). Correlações entre a extensão de proteólise e pontuação de amargor no leite foi alta a 30°C ($r = 0.916$) e a 40°C ($r = 0.896$), mas não a 20°C ($r = -0.233$). Essa investigação sugeriu que o tempo e a temperatura de armazenagem tiveram uma maior influência na aceitação sensorial e na vida de prateleira do leite desnatado UHT do que a contagem de psicotróficos no leite cru.

O crescimento de psicotróficos durante a refrigeração do leite cru, produzindo proteinases termoresistentes resultam em hidrólise da caseína depois do tratamento térmico do leite. Nessas condições, peptídeos semelhantes ao glicomacropéptido podem estar presentes e interferir nos métodos de detecção de soro de queijo. Durante o armazenamento de leite cru nos tanques de refrigeração até 48 horas, não se detectou aparecimento de GMP. Quando esse período aumentou para 4 dias a 7°C e o número de psicotróficos foi superior a 10^6 ufc/ml, a proteólise começou a ser detectada na forma de GMP. Foi comprovada uma proteólise mais intensa em leite desnatado do que no integral, isto provavelmente pela presença de pequenos péptides que induziram a formação de proteases. Os leites UHT, analisados, sofreram extensiva proteólise durante a armazenagem, medida em termos do aumento de GMP ou análogos. Já, os leites esterilizados em garrafas sofrem processos menores de proteólises durante sua vida útil. Os autores sugerem o uso de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) fase inversa, em

vez de CLAE-Coluna de filtração por gel para detecção de soro de queijo em leite, para evitar interferências devido à proteólise (PENAGOS et alii, 1993).

4.2. Plasmina (EC 3.4.21.7)

O leite normal contém cerca de trinta enzimas nativas, uma parte ligada à fase-soro, parte associada à micela de caseína, à membrana do glóbulo de gordura ou à partículas do microssoma. A protease alcalina isolada do leite e a plasmina isolada do sangue bovino têm as mesmas características, de estabilidade térmica, de sensibilidade a vários inibidores, mesmo peso molecular, mesma especificidade sobre as caseínas, indicando uma identidade entre elas. A protease alcalina do leite é uma serina-proteinase com atividade semelhante à tripsina, ataca as ligações peptídicas no carbono terminal do lado dos resíduos Arg- Lys, sendo que a hidrólise Lys-X é mais rápida do que a de Arg-X. A enzima é inibida por tripsina-inibidores, com temperatura ideal de ação a 37°C, podendo promover proteólise durante estocagem de leite UHT (GRUFFERTY & FOX, 1988).

Plasmina (EC 3.4.21.7), a principal enzima proteolítica presente no leite, é uma enzima do sangue que passa para o leite. Sua atividade resulta na produção de γ -caseína e proteose-peptonas derivadas da β -caseína. As proteínas mais sensíveis são as caseínas β e α_{s2} , seguida pela α_{s1} , porém a κ -cn é relativamente resistente e as proteínas do soro (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina), não são afetadas. Seu valor é baixo no leite normal, e parte da enzima existe como proenzima plasminogênio. A adição de uroquinase, que converte plasminogênio em plasmina, aumenta a atividade proteolítica nativa do leite, indicando que o leite também contém plasminogênio. A raça, o número de lactações, o estágio de lactação e a estação do ano, têm sido apontados como possíveis responsáveis pela variação de plasmina no leite. Desses fatores citados, o número de lactação tem a maior influência na atividade da plasmina, que aumenta durante toda a lactação. A atividade da enzima não é influenciada pela alimentação, pH, proteína ou gordura. O estágio de lactação e estações do ano são fatores que influenciam principalmente o plasminogênio (BASTIAN et alii, 1991a).

A purificação da proteinase alcalina do leite bovino e a purificação de plasminogênio ou plasmina do sangue bovino foram realizadas por HUMBERT et alii (1991) por um novo método de purificação, confirmando a semelhança existente entre as proteinases do sangue e do leite.

As concentrações de plasmina e plasminogênio no leite de vacas da região de Montbeliard (França) foram determinadas. No volume analisado, a atividade de plasmina foi mínima em setembro ($0.15\mu\text{g./ml}$ de leite) e máxima em junho ($0.32\mu\text{g./ml}$); a concentração anual foi $0.23\mu\text{g./ml}$. O conteúdo de plasminogênio variou em torno de $1.28\mu\text{g./ml}$ de leite, com decréscimo acentuado em setembro ($0.83\mu\text{g./ml}$) e o máximo em outubro ($1.59\mu\text{g./ml}$). As amostras de leite com alta proporção de fragmentos $\gamma\text{-cn}$, não foram aquelas com alto conteúdo de plasmina e sim as com alto teor de plasminogênio. (BENSLIMANE et alii, 1990).

A lactação é um processo fisiológico caracterizado pela secreção de grandes quantidades de proteína, carboidrato e lipídios. Para manter a produção, a glândula mamária aumenta de tamanho e se diferencia. Ambos processos requerem extensa remodelação de tecido que começa com uma proteólise cuidadosamente controlada da matriz extracelular e adesão de proteínas célula-célula. A plasmina é uma serina protease que tem sido implicada na remodelação de tecido, associada com o declínio da fase de lactação e involução mamária. (TURNER & HUYNH, 1991).

A distribuição de plasmina e plasminogênio no leite bovino foi averiguada por POLITIS et alii (1992). As análises mostraram a presença de várias formas de plasminogênio no leite bovino. As predominantes, identificadas por eletroforese, eram proteínas com peso molecular de 88.000, 152.000 e 160.000. Depois da eletroforese, a determinação pelo método ELISA, mostrou que 82% do plasminogênio estava associado à caseína. Pequenas quantidades de plasminogênio estavam associadas ao soro, à fração de creme e aos glóbulos de gordura. Plasmina ativa estava presente nas mesmas frações do leite nas quais o plasminogênio foi detectado: caseína, soro e creme.

Os ativadores de plasminogênio (AP) foram estudados em frações diferentes de leite produzido por vacas holandesas. A reação em cascata que leva à ativação do plasminogênio é regulada por complexas interações moleculares entre os ativadores (AP, uroquinase, tecido-ativador) e inibidores específicos de ativação (API-1 e API-2). O leite cru foi centrifugado para obter o desnatado e o "pellet" de células somáticas. Os ativadores foram principalmente localizados na fração de caseína, sendo 42 vezes maior do que no soro e em associação com as células somáticas. (WHITE et alii, 1995)

DEHARVENG & NIELSEN (1991), detectaram 4 ativadores nativos de plasminogênio no leite bovino. Dois deles foram parcialmente purificados após serem dissociados da caseína e, pela caracterização efetuada, pareciam ser plasminogênio ativador tipo-uroquinase.

Os ativadores de plasminogênio são serina-proteínases que convertem a proenzima plasminogênio, abundantes nos fluídos do corpo, em plasmina ativa. Existe efeito das caseínas individuais (frações) na velocidade de ativação de plasminogênio pelos ativadores tipo-uroquinase bovina e tipo-tecido ativador. Todas as caseínas (alfa, beta e kappa) acentuaram a atividade de ambos tipos de ativador de plasminogênio. (POLITIS et alii, 1995).

LU & NIELSEN (1993), testaram a inativação pelo calor de ativadores naturais de plasminogênio no leite bovino. Deduziram a equação de Arrhenius de inativação pelo calor e calcularam a velocidade de inativação na faixa de 60 a 140°C. O tempo de redução decimal (valor D) foi de 109 minutos a 70°C e 32 segundos a 140°C. Isso indicou que ativadores nativos de plasminogênio não são afetados pela pasteurização e, em grande extensão, não são inativados pelas condições do processo UHT utilizado em laticínios.

As fontes de ativadores, responsáveis pela conversão de plasminogênio em plasmina no leite não foram totalmente estabelecidas. Microrganismos psicrotóxicos, comumente encontrados em leite cru e pasteurizado, produzem quantidades significativas de enzimas (acima de 10^6 ufc/ml). Uma enzima

proteolítica de bactérias psicrotróficas pode ser uma fonte de ativador de plasminogênio (PA) no leite. Leites mastíticos tem elevado teor de PA e, as bactérias responsáveis pela infecção podem estar produzindo enzimas atuantes como ativador de plasminogênio. (VERDI & BARBANO, 1991).

Ao pesquisar inibição da atividade de proteinase em leites mastíticos, FANG & SANDHOLM (1995) estudaram a atividade antiproteolítica de inibidores de proteinases selecionados nesses leites e a atividade de uroquinase em leites normais. O perfil de inibição dos leites mastíticos e dos leites ativados com uroquinase foram comparados com o perfil de proteinases purificadas, revelando diferenças entre eles, que podem significar a presença de tipos mistos do sistema de proteinase em leites mastíticos. Os autores sugerem utilização de drogas que se mostraram promissoras, com consideráveis possibilidades de aplicações, para controlar o efeito proteolítico em cascata que advém do úbere inflamado. São drogas que merecem, ainda, estudos "in vivo" quanto a sua ação farmacológica.

O efeito do aquecimento e de alguns tratamentos químicos na proteólise de leite desnatado, causado pelo principal sistema de proteinase, plasmina, foi investigado por IGARASHI (1990). O grau de proteólise foi expresso pelo aumento do conteúdo de γ -cn no leite desnatado. As condições de pasteurização não tiveram efeito aparente no teor de proteólise. Adição de ácido ascórbico (0.2mg/100ml) ou H_2O_2 (1.5mg/100ml) ao leite não aquecido, aumentou a proteólise em 38 e 28%, respectivamente. Quantidades maiores desses compostos reduziram este aumento. Com a exposição à luz por tempo superior a três horas, houve um aumento constante da proteólise (33%). Esses resultados sugeriram que condições oxidativas levaram o leite desnatado a desenvolver proteólise por inativação de inibidor(es), que são operantes no sistema plasmina do leite.

Pode-se adicionar plasmina na fabricação de queijos. Sua atividade aumenta com o aumento da temperatura de cozimento da massa, dependendo dela durante a manufatura. Essa atividade, no entanto, deve ser controlada porque, embora a proteólise seja desejada em alguns tipos de queijos, a adição de plasmina pode interferir na qualidade do queijo, uma vez que acelera a maturação. A adição

de uroquinase e iodato de potássio foi feita para melhorar a qualidade de queijos elaborados com ultrafiltração. Foram adicionados juntos e separados, antes da fabricação. O iodato inibiu o crescimento do "starter", mas não influenciou a atividade de plasmina e a maturação. A ativação do plasminogênio pode ajudar na maturação de alguns tipos de queijos com ultrafiltração. (BASTIAN et alii, 1991c; FARKYE & FOX, 1990; FARKYE & LANDKAMMER, 1992).

O iogurte é fabricado com leite que, freqüentemente, pode sofrer degradação proteica por proteases nativas ou bacterianas. Em estudo realizados por GASSEM & FRANK (1991) foram adicionados extrato de protease bacteriana em algumas amostras e plasmina purificada, antes da elaboração do iogurte. Os resultados indicaram que a proteólise do leite resultou em iogurtes com diferenças substanciais nas suas propriedades físicas, e que os efeitos das proteases de psicotróficos e da plasmina, nas características do iogurte também diferiram entre si.

MADKOR & FOX (1991) examinaram a atividade proteolítica da plasmina em leite e caseína de búfala. A atividade foi primariamente associada com a fração de caseína, mostrando grandes variações entre as preparações analisadas. Na caseína coagulada por renina, a ação de plasmina foi mais intensa do que na caseína obtida por centrifugação ou precipitação ácida. Houve pouca atividade sobre a caseína das amostras tratadas com 3-15% de NaCl, mas a incubação da solução de caseína com 1-15% de NaCl, causou proteólise em todas as amostras. A atividade da plasmina no leite de búfala indicou que a enzima esteve associada, primariamente, com a caseína, com as frações beta e alfa. Depois de 60 horas a β -cn foi quase completamente hidrolizada, à semelhança do que ocorre com a caseína bovina.

A utilização de plasmina imobilizada sobre extrato de β -caseína foi estudada. A cinética da reação revelou perda perceptível de atividade pela enzima imobilizada. A eletroforese indicou ter havido pouca influência na formação dos resíduos e no C-terminal dos péptides resultantes da β -caseína hidrolizada. O uso da enzima imobilizada para a hidrólise de β -cn pode permitir a obtenção de

fragmentos puros, livres de poluição pela enzima e de inibidores, sendo, desta forma, mais facilmente utilizado para preparação de anticorpos poli e monoclonais. (BENALI et alii, 1994).

O substrato sintético H-D-valyl-L-leucyl-L-lysyl-4-nitroanilide (S-2251), foi utilizado para verificar atividade de plasmina, através de variações de absorbância a 405nm. A interferência da caseína foi verificada neste ensaio. A plasmina, pela alta afinidade pelos resíduos de lisina, cliva, preferencialmente, ligações Lys-X. Por ser a caseína um substrato natural para plasmina no leite, ela compete pelos sítios ativos durante análise com substrato sintético. A adição de substrato suficiente ou decréscimo na concentração de caseína removeram a interferência. Substrato com 0.4mM de concentração associado com 5mg/ml de caseína removeram a inibição. (BASTIAN et alii, 1991b).

KOHLMANN et alii (1991a) verificaram os efeitos da adição de baixas concentrações de plasmina em leite processado UHT. A relação entre proteólise e gelificação foi estudada após adição asséptica de plasmina em uma concentração de 0.15mg/l. O leite utilizado foi adquirido no comércio, já processados (134.4°C por 14.2seg, injeção direta de vapor) e embalados. As amostras foram injetadas com plasmina uma semana depois do processamento e foram mantidas à temperatura ambiente (23°C). Durante 6 meses foram examinadas mudanças na aparência, pH, viscosidade aparente, formação de gel, atividade enzimática e quebra da caseína. As amostras do controle não formaram gel durante o experimento, porém aquelas que receberam plasmina formaram gel depois de 90 dias. Essa geleificação foi acompanhada por aumento na viscosidade aparente. A atividade da plasmina foi detectada utilizando S-2251 e a quebra da caseína por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), mostrando que houve hidrólise preferencial, da enzima, por β -caseína e α -caseína antes da κ -caseína. Essa evidência deu suporte à relação entre a atividade de baixos níveis de plasmina e a gelificação que ocorre em leite UHT.

FARKYE et alii (1991), verificaram, através de eletroforetogramas obtidos, que a proteólise ocorria em queijo mussarela por ação residual de plasmina.

Houve hidrólise de α_s -caseína, evidenciada pela presença de α_{s1-1} péptides, e decréscimo da intensidade da banda correspondente à β -caseína com concomitante aumento na região da γ -caseína.

5. Considerações sobre métodos de monitoração de atividade proteolítica

Para monitorar a atividade proteolítica existem métodos que permitem o fracionamento da proteína, que são aqueles métodos de extração e precipitação. CHRISTENSEN et alii (1991) relacionaram vários métodos de separação de compostos nitrogenados em queijos, através dos quais, resultam frações heterogêneas contendo proteínas, peptídeos e aminoácidos. O quadro abaixo resume esses métodos de fracionamento.

Tabela 4. Composição das frações nitrogenadas solúvel obtida por diferentes técnicas de precipitação

Fracionamento químico	Componente nitrogenado na fração solúvel
Água Ácido CaCl ₂ NaCl	Proteínas, peptídeos aminoácidos
Cloroformio-metanol	Peptídeos hidrofóbicos, aminoácidos
Ácido tricloroacético (TCA) Etanol Ácido sulfosalicílico (SSA)	Peptídeos, aminoácidos
Ácido fosfotungstico (PTA)	Peptídeos muito pequenos aminoácidos

Fonte: Christensen et alii (1991)

Desses fracionamentos e em função da composição das diferentes frações, vários são os métodos utilizados para averiguação de proteólise. O quadro seguinte mostra alguns métodos de estimativa de proteólise em queijos.

Tabela 5. Métodos para estimativa de proteólise em queijos

Métodos	Compostos medidos
Kjeldhal	Nitrogênio
Absorbância a 280nm	
Hull, Folin, reagente fenol	Triptofano e tirosina
Amido-preto	Proteínas/
OrangeG	peptídeos são precipitados
Orange ácida 12	
Titulação com formol	
Titulação	
TNBS, absorbância	Grupos amina livres
Ninidrina, absorbância	
OAP (o-ftaldialdeído), absorbância	
Fluorescamina, fluorimetria	

Fonte: Ardö & Meisel (1991).

A análise eletroforética de proteínas é uma técnica bem conhecida. Infelizmente, somente peptídeos de grande tamanho podem ser visualizados adequadamente com esta técnica, o que limita a estimativa de pequenos produtos derivados da proteólise da caseína. Os quatro métodos primários de eletroforese diferem pela natureza de seu meio de suporte: gel de amido (sistema vertical e horizontal), gel de poliacrilamida, de agarose e gel de celulose-acetato. As siglas para cada tipo são, na sequência mencionada, as seguintes: SGE, PAGE, AGE e CAGE. (MURPHY et alii, 1990).

As vantagens de se usar o sistema SGE vertical incluem o fenômeno conhecido como eletrodecantação, as proteínas migram no gel mas as enzimas de alto peso molecular tendem a permanecer no fundo, fazendo com que a parte superior do gel seja inadequada para separação dessas proteínas. (MURPHY et alii, 1990).

O gel de poliacrilamida (PAGE) é formado por polimerização catalítica de monômeros de acrilamida e bisacrilamida. A separação das proteínas é feita por tamanho e peso. O tamanho dos poros do gel pode ser controlado por alterações na concentração de acrilamida e bisacrilamida, tornando esse método bastante acurado na separação de partículas pelo peso molecular. (MURPHY et alii, 1990)

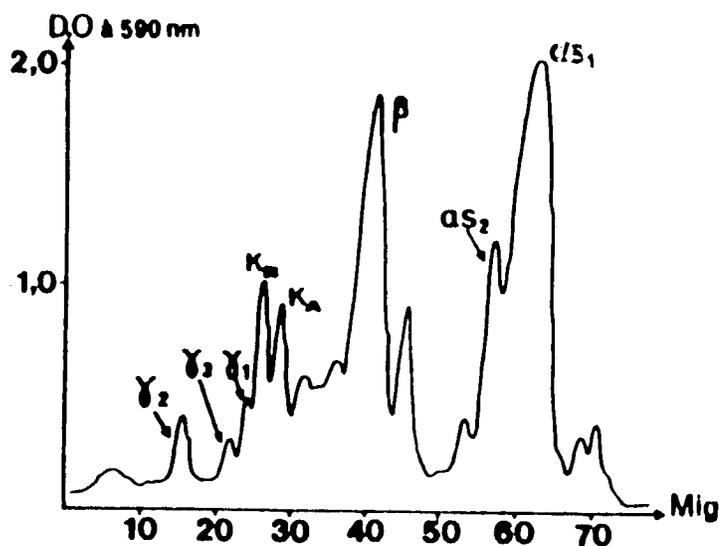
O sistema CAGE possibilita boa repetibilidade dos experimentos, a maior vantagem é que a eletroforese pode ser feita com quantidades pequenas de homogêneos de tecido. O gel de agar ou agarose é preparado como o de amido. É utilizado em condições onde a osmolaridade interfere na separação da proteína. (MURPHY et alii, 1990).

KIM & JIMENEZ-FLORES (1994) consideraram o PAGE um método vantajoso para comparação das principais proteínas de mamíferos, pela rápida e simultânea separação em até 20 frações. Esse fracionamento permitiu o uso de procedimentos analíticos adicionais para a comparação eficiente das propriedades químicas e físicas de proteínas. Foram comparadas proteínas de vários mamíferos, de forma efetiva, pela separação gráfica simultânea.

A proteólise em queijos foi verificada por ADDEO et alii (1995), através de imunodeteção, utilizando anticorpos policlonais de coelho adicionados ao gel após a realização de PAGE. Os anticorpos eram contra β e αS_1 - caseína, tornando mais sensível e específico o método tradicional de eletroforese.

A densitometria, após a realização de PAGE, permite uma melhor visualização da separação das frações de proteína, podendo quantificá-las. As

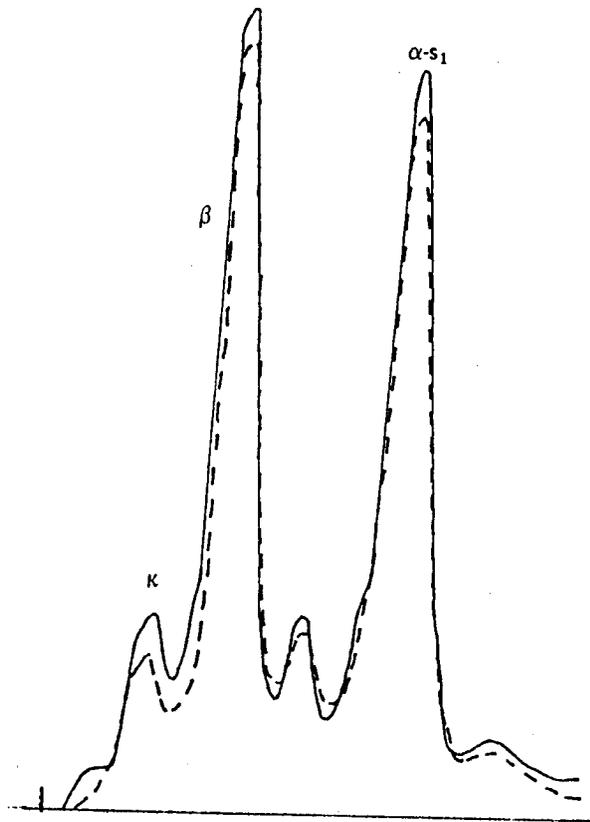
figuras a seguir (4 e 5), mostram resultados obtidos da caseína após eletroforese em gel de poliacrilamida.



Fonte: Collin et alii (1991)

Figura 4. Separação eletroforética PAGE da caseína total. Amostras obtidas a pH 4.6, gel corado com Coomassie R250. Densitograma a 590nm

Análises de caseína-macropéptido têm sido realizadas por cromatografia (exclusão por tamanho, fase-reversa, troca iônica), mais comumente depois de precipitação com TCA (ácido tricloroacético). Na maioria desses métodos somente um pico é visível representando o GMP não glicosilado ou o GMP junto com outras formas. Por eletroforese capilar, usando tampão fosfato e borato a pH 6-9, o GMP isolado aparece como um pico principal e um ou mais picos menores, significando vantagens para o estudo da cinética de coagulação (OTTE et alii, 1995).



Fonte: Hansen & Melo (1977)

Figura 5. Comparação de densitometria de caseína total obtida de leite cru e de leite esterilizado UHT. (— leite cru; ----- leite UHT)

O ácido N-acetilneuramínico (NANA ou ácido siálico), que faz parte do GMP, foi determinado por FUKUDA (1994) em leite e soro, com adaptação do método descrito por YAO et alii (1989), utilizando como reagente a ninidrina ácida, obtendo economia de tempo e possibilidades de estudo de interferências, por ser um teste espectrofotométrico rápido e simples na faixa de radiação visível.

PRATA (1991) utilizando o mesmo princípio básico de aplicação de diálise proposto por MISTRY & KOSIKOWSKI (1983) para medida de atividade proteolítica no leite, protocolou metodologia que utiliza absorção na região ultravioleta do espectro. A ligação peptídica, unidade estrutural da proteína, é a responsável por 70-80% da absorção nessa faixa. A quase totalidade das proteínas

purificadas são incolores quando em solução, portanto não absorvem na região visível do espectro. Todos os métodos sugeridos nesta região necessitam de reações preliminares que levem ao desenvolvimento de alguma cor, situando-se aí, de acordo com o mesmo pesquisador, os principais inconvenientes das adaptações de tais métodos para estimação da atividade proteolítica.

PRATA & OLIVEIRA (1991a) observaram que a utilização de membrana de celulose para realização de diálise em leite, em substituição a membrana importada, não provocou diferenças significativas entre os limites de retenção ou exclusão das duas membranas de celulose quando avaliadas pelo método de Hull. Constataram que a membrana nacional é mais grosseira na sua constituição, demandando maiores cuidados durante a preparação e requerendo trabalhar-se com triplicatas para resguardar o aproveitamento das duplicatas dos resultados.

PRATA & OLIVEIRA (1991b) utilizaram, para diluição das amostras, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) que é um detergente que apresenta algumas propriedades importantes: nas concentrações necessárias, sua absorção nessa região do espectro é pequena, atua sobre possíveis resquícios de gordura eliminando interferências e dissocia a proteína em sub-unidades, desenrolando completamente cada cadeia polipeptídica para formar um complexo alongado em bastonete.

O leite possui cor dominante, que dificulta as análises espectrofotométricas. Uma forma clássica para obtenção de filtrados transparentes seria a precipitação com ácido tricloroacético (TCA). Tal procedimento possibilita a análise apenas na região visível do espectro, porque o TCA, assim como uma série de outros compostos, absorve fortemente na região dos 200-230 nm. O problema foi resolvido aplicando o princípio de diálise contra água para obtenção dos fragmentos liberados das proteínas, pela ação de proteases, permitindo sua análise sem os inconvenientes anteriormente aventados (PRATA, 1991c).

Um dos métodos mais aceitáveis para estimativa da proteólise em leite e derivados baseia-se na determinação de aminoácidos aromáticos liberados, quer seja pela medida de absorção a 280nm ou pelo desenvolvimento de reação e determinação colorimétrica. Os maiores componentes da caseína inicialmente sofrem uma ação limitada das enzimas, resultando em fragmentos apenas parcialmente solúveis em TCA, além do fato de nem todos esses produtos conterem aminoácidos aromáticos.

O método da ninidrina utiliza a reação com os grupamentos α - NH₂, promovendo aparecimento de cor, não só com os aminoácidos, mas também com peptídeos, proteínas e outras classes de substâncias que possuem grupos amino livres. Pelo método da ninidrina, na monitoração de evolução proteolítica de produtos lácteos, pequenas variações podem ser detectadas, enquanto que para o método de Hull seriam necessárias grandes variações na fração dialisada. (PRATA & OLIVEIRA, 1991a).

A utilização do reagente Cd-ninidrina para acompanhar a proteólise durante a maturação de queijos foi conduzida por FOLKERTSMA & FOX (1992). De acordo com esses autores, a utilização de extratos obtidos pela extração em TCA não são indicados para o método, porque apresentaram diferenças significativas no desenvolvimento de cor durante o experimento, quando comparados com amostras controle.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE) e a cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC) têm sido utilizadas para análises de frações nitrogenadas. Essa fração tem grande interesse em laticínios pelos seus aspectos nutricionais, biológicos e tecnológicos. Métodos rápidos e específicos têm sido desenvolvidos em resposta às altas taxas de produção, são métodos versáteis, de alta resolução, adaptáveis aos procedimentos de automação (GONZALEZ-LLANO et alii, 1990).

LOPEZ-FANDIÑO et alii (1993), utilizaram HPLC de fase-reversa para estudar proteólise em leite UHT. Segundo esses autores, a técnica PAGE era

insuficiente para detectar peptídeos de baixa massa molecular e insuficiente para ser adaptada a processos automatizados. A pesquisa desenvolvida descreve o uso de RP-HPLC ou FPLC na investigação de proteólise durante armazenagem de leite UHT, comparando cromatogramas de amostras de leite com cromatogramas de digestão de caseína por plasmina e por enzimas produzidas por psicotróficos.

A comparação dos métodos eletroforético e cromatográfico foi realizada por COLLIN et alii (1991). A correlação entre os resultados obtidos foi de 0.80 para fração γ_1 , 0.77 para β -caseína, 0.74 para fração γ_2 e 0.65 para α S-caseína. Correlação muito pequena foi obtida para a fração γ_3 e κ -caseína. O estudo das relações entre as diferentes caseínas, no leite, mostrou boa correlação entre as três frações γ , diferentemente do que ocorria em queijos.

Após a introdução da filtração por membranas, a utilização de produtos com alterações nas proporções de caseína-proteínas solúveis, tem-se desenvolvido bastante, porque esses concentrados podem ser utilizados para várias finalidades, como ingredientes altamente funcionais. Vários métodos tem sido utilizados para determinar a proporção dessas proteínas em leite e produtos derivados. MEISEL (1995), tendo por base que as proteínas tem um espectro de absorção característico na região ultravioleta, utilizou um método espectrofotométrico. A quantificação foi baseada na absorção UV dos aminoácidos triptofano e tirosina, com caracterização máxima e mínima entre 270 e 300nm.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Matéria prima

1.1. Leite “longa-vida”(UHT).

O leite utilizado foi adquirido no comércio com aproximadamente 30 dias de fabricação. Foram utilizadas diferentes marcas com teores de gordura variáveis: desnatado, semi-desnatado e integral, mas sempre pertencendo à mesma partida. Para facilitar as análises, foram adquiridos em blocos de três, de marcas diferentes, cada um constando de uma caixa com 10-12 embalagens. O armazenamento foi por 5 meses à temperatura ambiente. As análises foram feitas com intervalo médio de 30 dias entre elas, correspondendo à primeira fase do experimento.

Na segunda fase foram utilizados leites do comércio, de 3 marcas diferentes, constituindo 3 blocos compostos por 12 embalagens, todas de uma mesma partida, com aproximadamente 30 dias de fabricação. As análises foram efetuadas a cada 30 dias, durante 5 meses à temperatura ambiente.

A última fase foi constituída por 91 amostras de leite, todas de um mesmo lote de fabricação, de mesma marca e mesmo teor de gordura (desnatado), também adquiridas no comércio. As amostras foram separadas em 7 blocos com 7 tratamentos diferentes. Cada bloco continha 13 amostras, que foram analisadas a cada 15 dias, durante 180 dias de armazenamento à temperatura ambiente, no período de novembro a abril. O tempo zero (T_0) foi estipulado como sendo 30 dias, porque esse foi o tempo real de fabricação do leite, ao se iniciar a pesquisa. Dessa forma, os 180 dias de experimento, foram distribuídos de 30 a 210 dias. Tomou-se o cuidado de se manter a mais pelo menos 6 amostras de cada tratamento para eventuais perdas.

As amostras de leite, durante as análises, foram constituídas por uma embalagem inteira, homogeneizadas ao abrir e descartadas após utilização, em todas as fases do experimento. Para a primeira e segunda fases, a aquisição dos

produtos foi feita obedecendo a uma data máxima de fabricação de 30 dias, sendo esse considerado o tempo zero (0), quando não estiver especificado.

1.2. Leite cru

As amostras de leite cru foram obtidas de produtores de leite tipo B, cadastrados pela Cooperativa de Produtores da Região de Campinas. As análises microbiológicas foram efetuadas no leite com intervalo de dez dias entre elas. Foram escolhidos dez produtores, obedecendo a ordem de chegada do leite ao laticínio. O leite de cada produtor foi analisado três vezes.

Tal procedimento foi repetido com os produtores de leite tipo B da região de Botucatu, sendo cadastrados cinco produtores que tiveram seus leites analisados cinco vezes, com intervalo de uma semana entre cada análise.

1.3. Tratamentos efetuados na matéria prima (UHT).

O leite UHT utilizado durante a terceira fase do experimento, recebeu 7 tratamentos diferentes, uma semana antes de se iniciarem as análises, com 30 dias de fabricação. O bloco controle, sem nenhuma adição, recebeu a sigla de **tratamento 0** (zero). O esquema adotado foi o seguinte:

Tratamento 1. Adição de plasmina 0.256mg por litro. Dissolveu-se 16mg de plasmina (Sigma) e completou-se o volume para 100ml com solução salina estéril.

Tratamento 2. Adição de plasmina 0.256 mg/l + citrato de sodio 0.025%. Da solução esterilizada de citrato adicionou-se 1 ml por litro para se obter a concentração de 0.025% na amostra.

Tratamento 3. Adição de 2 ml de caldo inativado de *Pseudomonas*. O caldo foi preparado após cultivos sucessivos de *Pseudomonas fluorescens* ATCC-13525 em agar inclinado, lavados com solução salina (0.85%) estéril e coletados em frascos esterilizados. O controle da massa celular bacteriana do caldo foi feito através de

leitura da densidade ótica e plaqueamento com leituras a 24 e 48 horas. O nível obtido de 4.1×10^9 ufc/ml foi, então, centrifugado e tratado em banho de glicerina para esterilização, confirmada por plaqueamento. Desse caldo, foram inoculados 2ml por embalagem de leite, que corresponderiam a uma contagem de 8.0×10^6 ufc/ml.

Tratamento 4. Adição de Pseudomonas (2ml de caldo com 8.0×10^6 ufc/ml inativados) mais 1ml de citrato de sodio.

Tratamento 5. Adição de plasmina mais caldo de pseudomonas, sendo metade da concentração adicionada em T1 e T3, ou seja, 0.128mg de plasmina e 1.0ml do caldo de pseudomonas por litro de leite.

Tratamento 6. Corresponhia ao T5 mais adição de 1ml de citrato de sodio (0.025%).

As inoculações foram feitas em câmara de fluxo laminar, utilizando seringas descartáveis. A oclusão dos orifícios foi feita com adesivo vedante, 100% borracha de silicone - Silastic 732RTU-DownCorning (KOHLMANN et alii, 1991a; KOHLMANN et alii, 1991b; SHAH, 1994).

2. Atividade proteolítica.

A atividade proteolítica foi determinada nas amostras de leite esterilizado "longa vida".

2.1 Diálise

Foram adquiridas membranas de celulose industrial, nacionais, utilizadas como envoltório de alimentos embutidos, com diâmetro achatado de aproximadamente 28mm. Para a preparação dos sacos de diálise, os rolos foram cortados em segmentos de 25 cm de comprimento, exaustivamente lavados e fervidos em água destilada deionizada e estocados em refrigerador, renovando-se o estoque a cada 15 dias.

Após a colocação de 10ml da amostra, oclusão e fechamento com barbante, os sacos de diálise eram cuidadosamente lavados em água deionizada corrente e colocados em tubos de ensaios, recebendo a seguir 20ml de água destilada para ocorrência da diálise, efetuada a 37^o C por 2 horas. Terminada a incubação, procedia-se a estimação da proteólise no dialisado, de acordo com os métodos seguintes: ultravioleta e ninidrina.

2.2. Método ultravioleta.

A cada 500 µl do dialisado das amostras, em duplicatas, adicionou-se 4,5 ml de solução de dodecil sulfato de sódio a 0,5%, levando-se à incubação a 20^oC por 60 minutos ao abrigo da luz. Após esse período foram realizadas as leituras de absorbância a 220 e 210nm, contra branco da amostra constituído de água destilada e dodecil sulfato de sódio (PRATA, 1991).

2.3. Método da ninidrina

A cada 200µl do dialisado das amostras, em duplicatas adicionou-se 800 µl de tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0 e 1ml da solução de ninidrina, aquecendo a 100^oC durante 15 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 8ml de etanol 60%, procedendo-se, em seguida, à leitura de absorbância a 570nm contra branco da amostra (MOORE, 1968).

2.4. Método da ninidrina ácida.

O leite foi desproteínizado com TCA a 24% em quantidades iguais ao leite, afim de obter-se uma concentração de 12% na solução final. Tomou-se 10ml do filtrado que, após centrifugações com ácido fosfotungstíco 20% e etanol (para eliminar resíduos de lactose) e desprezar o sobrenadante, resultou em "pellets". A esse resíduo seco adicionou-se ácido acético glacial, ninidrina ácida (ninidrina+ ácido clorídrico + ácido acético glacial) e aqueceu-se em banho-maria fervente por 10 minutos. Após resfriamento foram feitas leituras espectrofotométrica a 470nm (FUKUDA, 1994).

2.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE).

As amostras utilizadas para eletroforese (PAGE) foram obtidas durante a última fase do experimento, sendo retiradas de cada tratamento (0 a 6), em três épocas: tempo inicial (30dias), 120 dias e 210 dias. Constavam de 10ml de leite, precipitados por ácido acético glacial até pH 4.6, seguidos por centrifugação comum e ressuspensão em água deionizada por três vezes. Após, foram congeladas e então analisadas.

A técnica utilizada foi a descrita por HAMES & RICKWOOD (1990). Foi utilizada uréia na preparação do gel de separação e de empilhamento e a corrida eletroforética foi efetuada por 5 horas, mantendo-se uma corrente de 200V. Para revelação das bandas utilizou-se corante Comassie R250 por uma noite, seguido por uma descoloração em solução descorante de Comassie, composta por água, metanol e ácido acético (5:4:1), até a revelação das bandas. A leitura das bandas, após revelação, foi feita em Densitômetro CELM DS - 75.

3. Acidez Dornic.

Determinada nas amostras de leite UHT, segundo técnica descrita pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1976).

4. Provas de estabilidade do leite UHT

4.1. Ao calor.

As amostras foram aquecidas, em chama, até ebulição para verificar possíveis alterações na aparência durante o aquecimento.

4.2 Ao álcool.

As amostras foram misturadas, em partes iguais, com álcool 74%, buscando alterações visuais.

5. Análises microbiológicas.

As análises microbiológicas foram realizadas no leite cru, segundo HARRIGAN & Mc CANCE (1976) com relação a amostragem, diluições e técnicas de plaqueamento. As amostras foram coletadas assepticamente em frascos esterilizados, na plataforma de recepção dos laticínios e transportadas, sob refrigeração, até o laboratório para serem analisadas.

5.1. Psicotróficos

A contagem de microrganismos psicotróficos foi feita de acordo com STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF DAIRY PRODUCTS (1972), onde o meio de cultura utilizado foi o "Plate Count Agar" (PCA), à temperatura de 7°C e tempo de 10 dias de incubação. As diluições foram feitas em água peptonada 0.1% até o valor de 10⁻⁶.

5.2. Psicotróficos proteolíticos

Os microrganismos desse grupo foram contados em meio PCA, acrescido de 10% de leite desnatado esterilizado. O tempo e temperatura de incubação foram os mesmos utilizados para o item anterior (MOTTAR, 1981). Foram consideradas as colônias com formação de halo de proteólise.

5.3. Pseudomonas sp.

O meio seletivo utilizado foi o PCA acrescido de peptona e NaCl, mais uma solução de trifetil tetrazolio clorídrico a 5%. As placas foram incubadas a 22°C por 24 horas (BRANDT & LEDFORD, 1981). As leituras foram confirmadas após 48 horas.

6. Análise estatística.

As análises estatísticas foram realizadas através de programas computadorizados, empregando-se as análises que mais se adequassem à cada situação, tais como: médias, desvios-padrão, coeficientes de variação e ANOVA - Análise de Variância, com teste de comparação de médias pelo Tukey, todas embasadas em GOMES (1984), aplicadas à fase número 3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Monitoração da proteólise no leite UHT comercial.

Todos os resultados que estão relacionados nas tabelas e gráficos, apresentados a seguir, constituem a média de duplicatas. O parâmetro utilizado para detectar a atividade proteolítica foi a variação na medida de absorbância, variando apenas os comprimentos de onda de acordo com o método utilizado. Com os resultados obtidos na primeira fase, foi possível verificar o nível proteolítico dos leites UHT comerciais, de marcas e teores de gordura diferentes durante um período de estocagem prolongado. Esses resultados são apresentados nas tabelas 6, 7 e 8 e figuras 6 e 7.

Utilizou-se, nessa fase, leituras na região ultravioleta do espectro, a 210 e 220nm, tendo por base que as ligações peptídicas absorveriam no UV quando houvesse fragmentos de proteínas no dialisado e, como consequência, quanto maior a atividade enzimática (proteólise), maior incremento seria observado na absorbância obtida. Utilizou-se, também, leituras na região visível do espectro a 570nm para o método da ninidrina, afim de detectar as mesmas variações que seriam utilizadas para comparações.

Vários tipos de leite, quanto a marcas e teor de gordura, foram utilizados. A ausência de valores que se observa (3 primeiras amostras) a 30 e 60 dias nas tabelas 6, 7 e 8, foi porque essa leitura foi adicionada somente após esse período. A ausência de valores, nas mesmas tabelas, após 180 dias foi decorrente do período estabelecido para o armazenamento, que teve como principal objetivo englobar os prazos de validade.

Os valores da tabela 6 se relacionam com as medidas de absorbância a 210nm. A tabela 7 relaciona os valores obtidos para leituras de absorbância a 220nm e foram semelhantes àqueles obtidos por PRATA (1991a), que deram origem aos testes iniciais desse projeto.

Tabela 6. Evolução da atividade proteolítica em leite UHT armazenado a temperatura ambiente (A 210nm)

amostras	tempo (dias)					
	30	60	90	120	150	180
semidesn.	----	----	0.8565	0.9680	1.0267	0.9490
desnatado	----	----	0.7204	1.0426	1.0162	0.9794
integral	----	----	0.7719	0.9089	0.9923	1.0213
integral	0.6260	0.7202	0.8122	0.8844	0.6183	----
desnatado	0.7645	0.9453	0.7326	1.1548	0.7809	----
desnatado	1.0190	1.0446	0.9327	1.0333	0.8282	----
semidesn.	0.8589	0.9297	0.9503	1.0167	1.1582	----
desnatado	0.9969	1.0190	1.0780	0.9646	1.2618	----
integral	0.8086	0.8255	0.9077	0.9771	0.8130	----
integral	0.7628	0.9775	0.7694	0.7806	0.8277	----
média	0.8338	0.8974	0.8531	0.9731	0.9331	0.9832
s*	0.1385	0.1199	0.1139	0.1014	0.1943	0.0363
cv**	16.62%	13.37%	13.35%	10.42%	20.89%	3.69%

* - desvio-padrão

** - coeficiente de variação

Tabela 7. Evolução da atividade proteolítica em leite UHT armazenado a temperatura ambiente (A 220nm)

amostras	tempo (dias)					
	30	60	90	120	150	180
semidesn.	----	0.5436	0.5146	0.6027	0.6389	0.5774
desnatado	----	0.5212	0.4263	0.6506	0.6390	0.6056
Integral	----	0.5191	0.4854	0.5835	0.6444	0.6610
integral	0.3813	0.4356	0.4984	0.5503	0.3685	----
desnatado	0.4482	0.5540	0.4270	0.7014	0.4504	----
desnatado	0.6304	0.6266	0.5524	0.6275	0.4868	----
semidesn.	0.5229	0.5621	0.5782	0.6136	0.6351	----
desnatado	0.6112	0.6167	0.6568	0.5818	0.7273	----
Integral	0.5057	0.5169	0.5704	0.6102	0.4201	----
integral	0.4280	0.4343	0.4289	0.4263	0.4802	----
média	0.4954	0.5330	0.5138	0.5948	0.5491	0.6147
s*	0.1077	0.0641	0.0765	0.0721	0.1211	0.0425
cv**	21.74%	12.03%	14.89%	12.13%	22.06%	6.92%

* - desvio-padrão

** - coeficiente de variação

As amostras analisadas apresentaram medidas de atividade proteolítica com valores máximos a 120 dias, seguidas de decréscimo aos 150 dias de armazenagem à temperatura ambiente (fig.6). O coeficiente de variação (cv) foi ligeiramente superior quando se fez leitura a 220nm, comparado com as variações a 210nm, embora o comportamento das curvas obtidas tenha sido semelhante (fig.6).

O decréscimo que ocorreu a 150 dias pode ser explicado pela perda de sensibilidade do método UV, uma vez que pode ocorrer polimerização da caseína durante a armazenagem (EL-DIN & KAKO, 1991), dificultando a passagem dos fragmentos durante a diálise. O decréscimo das leituras aos 150 dias pode ser explicado, também, por ter havido diminuição de ligações peptídicas, considerando

que os fragmentos resultantes da proteólise estejam presentes na forma de aminoácidos. Por esse motivo foi incluído o método da ninidrina (A 570nm) que indica, fundamentalmente, a presença de aminoácidos pela reação que ocorre com o grupamento NH_3 .

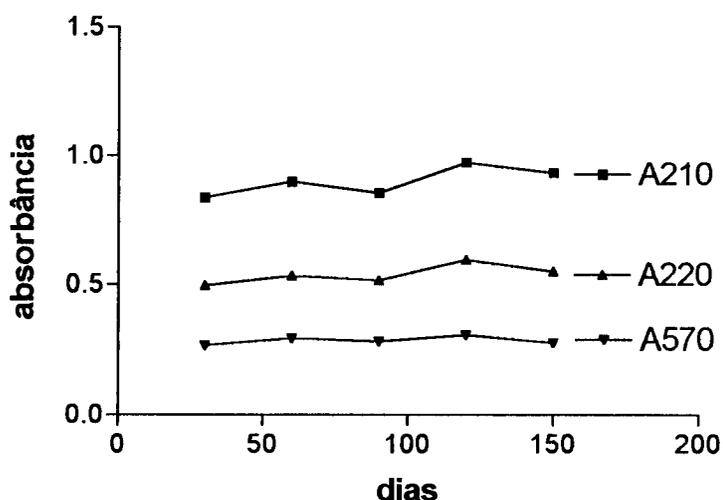


Figura 6. Média dos valores obtidos para os métodos utilizados na avaliação da atividade proteolítica de leite UHT.

Embora as variações na absorbância tenham sido semelhantes, o que se pode observar, pela tabela 8 e figura 6, é que esses valores são inferiores quando comparados aos obtidos pelo método UV. No entanto, o coeficiente de variação foi mais elevado com utilização do método da ninidrina (570nm).

O comportamento de amostras individuais de leite UHT desnatado e integral pode ser observado pela figura 7, que evidencia a existência de diferenças entre as marcas comerciais utilizadas no experimento, com relação ao teor de gordura das amostras. As amostras de leite semidesnatado não foram utilizadas na elaboração dessa figura por serem apenas duas marcas diferentes. Quando se comparam as médias (fig.7) o comportamento das amostras de leite UHT desnatado e integral se diferenciam. As curvas obtidas foram semelhantes para os dois comprimentos de onda: desnatado a 220nm e 570nm e integral a 220nm e 570nm. A observação de que houve maior atividade proteolítica no leite UHT desnatado do que no integral, durante a armazenagem, está de acordo com os resultados obtidos

por LOPEZ-FANDINO et alii (1993), que sugerem haver uma proteção contra proteólise, exercida pela gordura.

Tabela 8. Evolução de atividade proteolítica em leite UHT armazenado a temperatura ambiente (A 570nm)

amostras	Tempo (dias)					
	30	60	90	120	150	180
semidesnat.	----	0.2480	0.2360	0.3426	0.3100	0.3928
desnatado	----	0.4146	0.2438	0.2318	0.3120	0.2855
integral	----	0.3224	0.2501	0.2471	0.2255	0.2687
integral	0.3039	0.2130	0.3524	0.3182	0.1880	----
desnatado	0.3132	0.2520	0.3907	0.3087	0.2151	----
desnatado	0.2557	0.2420	0.3895	0.3527	0.1626	----
semidesnat.	0.2867	0.3301	0.2560	0.3671	0.4105	----
desnatado	0.2470	0.3500	0.2840	0.3840	0.5063	----
integral	0.2270	0.2734	0.1955	0.2489	0.2768	----
integral	0.2460	0.2974	0.2220	0.2699	0.1742	----
média	0.2685	0.2943	0.2820	0.3071	0.2781	0.3156
s*	0.0327	0.0609	0.0705	0.0548	0.1109	0.0673
cv**	12.20%	20.69%	24.99%	17.84%	39.89%	21.32%

* - desvio-padrão

** - coeficiente de variação

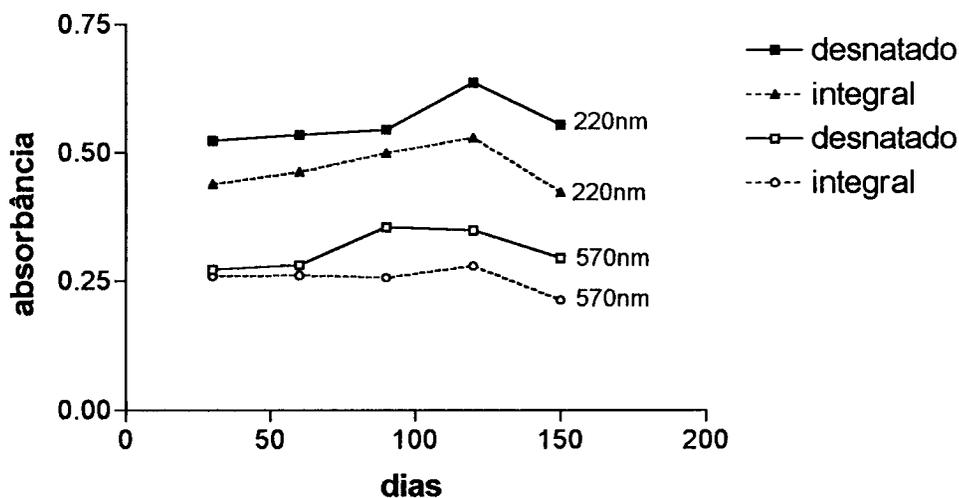


Figura 7. Comparação das médias obtidas durante armazenamento de vários tipos de leite UHT em dois comprimentos de ondas. (220 e 570nm).

Os níveis iniciais de proteólise foram elevados (tabelas 6, 7 e 8) significando que, possivelmente, já havia ocorrido alguma modificação nas proteínas do leite, decorrentes, talvez, do tratamento térmico do processo UHT, de uma possível ação residual de proteases microbianas, ou da plasmina com possível liberação de fragmentos iniciais da β -cn. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por PRATA (1991a) que obteve valores médios de 0.48 de absorbância (220nm), para leite UHT armazenado sob condições semelhantes, no tempo de 30 dias, e valores médios de 0.31 para amostras de leite cru.

De acordo com LAW et alii (1994), o calor acima de 60^oC aumenta a conformação globular e promove a associação das proteínas do soro com a caseína. À temperaturas acima de 110^oC ocorrem mudanças da caseína, induzidas pela desnaturação das proteínas solúveis. Há formação de complexo caseína-proteínas do soro quando a concentração de cálcio iônico diminui, significativamente, depois do processamento UHT.

Ainda, de acordo com os dados de absorbância das tabelas 6, 7 e 8, pode-se verificar um ligeiro aumento na atividade proteolítica, tanto a 210, 220 e 570nm em função do tempo. Isso pode ser, provavelmente, em função de uma intensificação da proteólise decorrente da sobrevivência térmica de possíveis

enzimas presentes que, no entanto, em função da possível polimerização aventada por ZIN EL-DIN (1991), não liberou fragmentos menores que possam ser dializados e, conseqüentemente, avaliados pelos métodos aplicados.

Portanto, diferentemente da sugestão de MISTRY & KOSIKOWSKI (1983), também confirmada por PRATA (1991), de que a diálise é um método alternativo de fracionamento para posterior avaliação da atividade proteolítica em queijos, não foi confirmada para o presente caso, utilizada para leite UHT. Muito possivelmente as razões estariam ligadas às diferenças da proteólise nesses dois sistemas. Enquanto em queijos, de modo geral a proteólise é progressiva, levando a uma quebra cada vez mais acentuada das moléculas protéicas, o que contribui para intensificar a quantidade de pequenas moléculas cada vez mais fáceis de serem dialisadas, no leite UHT isso não ocorreria, ao menos não com a mesma intensidade dentro dos prazos estudados, agravado pela possibilidade da polimerização.

Em função dos resultados obtidos na primeira fase e dessas razões hipotéticas, optou-se por realizar uma nova série de experimentos com leite UHT comercial, utilizando procedimentos variados de obtenção das frações nitrogenadas (solúvel e pellets) e analisá-los por diferentes métodos (UV 210 e 220, visível 570 e 470). Optou-se por manter os procedimentos usados anteriormente, ou seja, a diálise e os métodos UV e visível, para se obter dados comparativos para a escolha do ou dos métodos que se mostrassem mais adequados à situação estudada e que melhor correspondessem às alterações que estivessem ocorrendo, como também, que, possivelmente, confirmassem as conclusões hipotéticas do experimento anterior.

A tabela 9, além de relacionar os vários métodos utilizados na segunda fase da pesquisa, mostra as variações obtidas para acidez e aparência geral. Os números 1, 2 e 3 significam marcas diferentes utilizadas para as amostras. Pode-se notar que houve declínio dos valores de acidez durante o armazenamento, que pode estar relacionado com o incremento na proteólise, se considerarmos que a hidrólise

da proteína liberou fragmentos básicos. A aparência geral das amostras foi normal durante todo o experimento.

Tabela 9. Evolução de proteólise. Comparação de metodologia

amostras	tempo (dias)					
	15	45	75	105	150	
A ₂₂₀	1	0.5414	0.3850	0.3849	0.4638	0.3394
	2	0.4709	0.3730	0.5068	0.5124	0.5435
	3	0.3547	0.3877	0.4258	0.4333	0.3803
A ₂₁₀	1	0.9232	0.6926	0.6642	0.8184	0.6291
	2	0.7609	0.6897	0.8602	0.8711	0.9691
	3	0.6574	0.6763	0.7567	0.7685	0.7253
A ₄₇₀	1	0.1740	0.2006	0.3187	0.4163	0.3979
	2	0.2260	0.3055	0.3716	0.3609	0.6777
	3	0.2711	0.1135	0.2798	0.2967	0.3767
A ₅₇₀ D	1	0.2698	0.2685	0.2754	0.3136	0.2126
	2	0.3441	0.2948	0.4011	0.3864	0.2847
	3	0.1889	0.3164	0.2866	0.3341	0.2416
A ₅₇₀ TCA	1	1.3430	1.6431	1.6997	1.5686	1.1549
	2	1.2560	1.8742	1.6505	1.6777	1.3010
	3	1.3325	1.4190	1.4232	1.3989	1.0000
A ₅₇₀ pellet	1	0.1151	0.6807	1.0000	1.0245	1.0000
	2	0.2758	0.7585	1.1549	1.4201	1.5228
	3	0.3190	0.5624	.09586	0.8995	0.9208
acidez °D	1	20	22	21	22	18
	2	20	20	20	21	19
	3	20	20	20	21	19
aparên cia	1	sm*	sm*	sm*	sm*	sm*
	2	sm*	sm*	sm*	sm*	sm*
	3	sm*	sm*	sm*	sm*	sm*

* - sem modificações visuais

Os testes para verificar a estabilidade ao calor e ao álcool foram efetuados em todas as amostras analisadas até essa fase, não havendo modificações visuais em nenhuma delas.

As convenções utilizadas serão renomeadas, para melhor acompanhamento da discussão: A₂₂₀ e A₂₁₀ são siglas referentes ao método ultravioleta, A₄₇₀ ao método da ninidrina ácida, A₅₇₀D referente ao método da

ninidrina com diálise, A_{570} TCA ao método ninidrina com precipitação por TCA e A_{570} "pellet" referente ao método ninidrina após obtenção do "pellet".

A figura 8 mostra a comparação dos resultados obtidos com os diferentes métodos. A_{210} , A_{220} e 570D confirmando os resultados obtidos anteriormente, durante a primeira fase, ou seja, pode se observar uma flutuação desses resultados decorrente, possivelmente, da diálise.

Os valores médios obtidos (fig.8), com utilização de fração solúvel, confirmam os resultados de FOLKERTSMA & FOX (1992) de que o reagente ninidrina, não pode ser utilizado diretamente em amostras extraídas em TCA, porque esse ácido vai interferir nos resultados, uma vez que os valores foram bem elevados (570T). Já, as médias, observadas na mesma figura, quando se utilizou o "pellet" apresentaram um comportamento ascendente, com certa uniformidade, embora, pode-se notar, uma ligeira interferência causada por resíduos de TCA. É importante salientar que o método A_{570} (D, TCA e "pellet") está diretamente relacionado com a proteína total, ou seja, estão sendo computadas todas as frações da caseína.

Pela mesma figura, pode-se observar um comportamento ascendente quando se utilizou o método da ninidrina ácida (A_{470}) proposto por FUKUDA (1994), nas amostras de leite UHT. Tal método evidencia as variações do glicomacropéptido por ação enzimática na ligação Phe₁₀₅ - Met₁₀₆ da κ -caseína, monitorando as alterações dessa fração que possam estar ocorrendo, é exclusivo para κ -caseína. Observou-se e comprovou-se, por esse método, alterações precoces ocorrendo na κ -caseína no leite UHT, que se tornam importantes, devendo ser confirmadas, pois a κ -caseína é importante na manutenção da estrutura micelar e no equilíbrio do sistema.

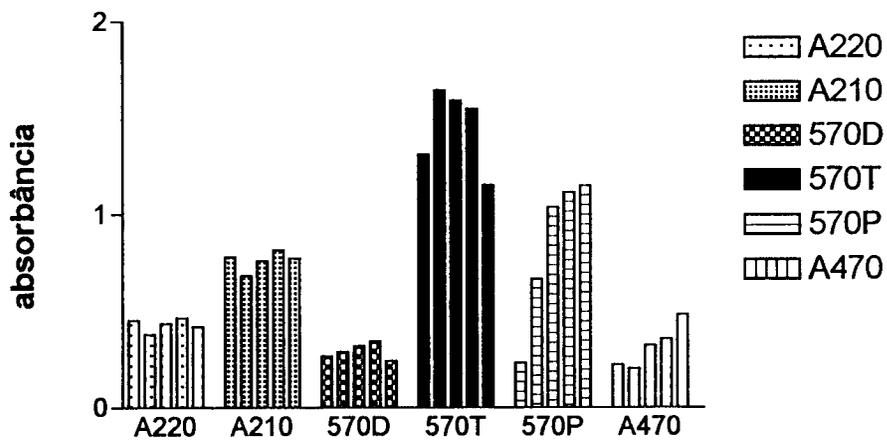


Figura 8. Evolução da proteólise. Comparação de metodologia (média dos valores obtidos)

Com esses resultados obtidos, analisando a sequência de aminoácidos da κ -caseína, e o sítio de hidrólise da renina e da plasmina (Lys -X, preferencialmente Lys-Lys), citados por WALSTRA & JENNESS (1987), optou-se por utilizar o método da ninidrina ácida (A 470) na última fase do experimento, em busca de alguma evidência de que a ligação Lys₁₁₁ - Lys₁₁₂ da κ -caseína também estaria sendo afetada, possivelmente pela plasmina, durante o armazenamento.

A decisão de se efetuar, também, análises com a utilização de ninidrina comum (570P), foi pela observação do comportamento das amostras na figura 8, que mostrou melhores resultados quando se utilizou "pellet" do que apenas com extração por TCA (nitrogênio solúvel). Desta forma, na etapa seguinte, esses métodos foram eleitos para monitorar possíveis alterações de κ -caseína (ninidrina ácida) e da α e β -caseínas (ninidrina comum + "pellet").

2. Avaliação microbiológica do leite cru refrigerado.

Nessa fase do experimento, o reconhecimento das condições microbiológicas do leite cru foi realizado, porque é importante para a conservação do leite UHT, principalmente quando obtido de leites mantidos sob refrigeração desde a fazenda, pela possível seleção de psicrotróficos. Trata-se de um pequeno reconhecimento, pois não foram encontrados dados coerentes em nosso meio. Os

artigos de pesquisa citam uma realidade que, na maioria das vezes, não é a nossa. O leite cru utilizado para esterilização UHT nem sempre provem de propriedades consideradas como produtoras de tipo B, em alguns casos se utiliza também leite tipo C. No entanto, foram escolhidas, exatamente, amostras de produtores de leite B, no sentido de se acrescentar alguns parâmetros para discussão do que pode estar acontecendo no leite UHT, obtido em nossas condições. As tabelas seguintes, de 10 a 17, ilustram esse reconhecimento.

Pelos valores da tabela 10, pode-se ter um panorama da situação microbiológica do leite cru dos produtores utilizados na amostragem. Através dessa contagem total é que o laticínio classifica o leite de seus produtores cadastrados como tipo B. Todos os valores encontram-se dentro dos limites aceitáveis pela cooperativa regida pela Inspeção Federal. Entretanto, deve-se ressaltar que a Indústria utiliza temperatura de 35°C para incubar as placas e que, a essa temperatura, geralmente ocorre uma sub-estimação quando comparada com a de 32°C, definida pelo STANDARD METHODS OF DAIRY PRODUCTS. Os leites analisados estiveram com valores próximos àqueles encontrados por KOCAK & ZADOW (1985) que consideravam leite cru de boa qualidade para processamento UHT uma contagem padrão (PCA) de 1.3×10^4 , de até 7.3×10^3 para psicrotróficos e de até 1.7×10^3 ufc/ml para psicrotróficos proteolíticos.

Tabela 10. Contagem total* de leite cru (ufc/ml), fornecida pela Indústria, para produtores cadastrados como fornecedores do tipo B.

produtores	repetições		
	1	2	3
1	$3,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$
2	$7,5 \times 10^4$	$1,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$
3	$8,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$
4	$1,5 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$
5	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
6	$2,5 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$
7	$1,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
8	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$
9	$2,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$
10	$5,7 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$

* Média dos valores obtidos com 24 e 48h de incubação

Pela tabela 11 pode-se observar que os psicotróficos, em suas contagens, estiveram em torno de 9.9×10^3 e $< 10^3$ ufc/ml para os produtores analisados. Somente o produtor 3 e o 8 é que superaram essas cifras (1.2×10^4 e 5.4×10^4 , respectivamente). Os valores observados são inferiores àqueles que podem causar problemas após o tratamento de esterilização (UHT), que seria de 10^6 ufc/ml (MOTTAR, 1981). Após 2 dias a 4°C , o nível de psicotróficos/ml encontrado por PICARD et alii (1994) foi $< 10^7$ ufc/ml.

Entretanto, convém salientar que esses resultados espelham a realidade do leite tipo B, obrigatoriamente mantido sob refrigeração antes do

processamento e que, apesar disso, não apresentou contagens de microrganismos psicrotróficos capazes de causar alterações posteriores.

**Tabela11. Microrganismos psicrotróficos em leite cru (ufc/ml)
obtido de produtores cadastrados como tipo B****

produtores	repetições			média
	1	2	3	
1	$9,0 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$4,3 \times 10^2$	$3,9 \times 10^3$
2	$2,5 \times 10^3$	$4,2 \times 10^2$	$2,7 \times 10^4$	$9,9 \times 10^3$
3	$6,0 \times 10^3$	$7,9 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
4	$< 10^3$ *	$1,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
5	$< 10^3$ *	$< 10^3$ *	$0,3 \times 10^2$	----
6	$3,5 \times 10^3$	$9,9 \times 10^2$	$7,4 \times 10^2$	$1,7 \times 10^3$
7	$1,5 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$
8	$< 10^3$ *	$1,0 \times 10^5$	$8,3 \times 10^3$	$5,4 \times 10^4$
9	$1,2 \times 10^3$	$5,9 \times 10^2$	$2,5 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$
10	$9,5 \times 10^3$	P	$5,8 \times 10^2$	$5,0 \times 10^3$

* número estimado P parcela perdida

** valores obtidos na região de Campinas

Tabela 12. Psicrotróficos proteolíticos (ufc/ml) em leite cru obtido de produtores cadastrados como tipo B**

produtores	repetições			média
	1	2	3	
1	< 10 ³ *	< 10 *	0.7x10 ²	----
2	< 10 ³ *	0.2x10 ²	1,1x10 ³	0.6x10 ²
3	1,0x10 ³	3,4x10 ²	0.9x10 ²	4,7x10 ²
4	< 10 ³ *	7,4x10 ²	< 10 *	----
5	< 10 ³ *	< 10 *	< 10 *	----
6	1,0x10 ³	0.3x10 ²	0.6x10 ²	3,6x10 ²
7	< 10 *	2,2x10 ²	0.1x10 ²	1,2x10 ²
8	< 10 *	2,1x10 ⁴	3,5x10 ²	1,0x10 ⁴
9	< 10 *	0.1x10 ²	0.3x10 ²	0.2x10 ²
10	1,0x10 ³	P	0.2x10 ²	5,1x10 ²

* número estimado

P parcela perdida

** valores obtidos na região de Campinas

Os psicrotróficos proteolíticos (tab.12) estiveram presentes em valores inferiores a 10³ ufc/ml entre os produtores, com exceção do número 8 que superou essa cifra (1.0x10⁴ ufc/ml).

Para obter valores de psicrotróficos entre 7.7x10⁴ e 8.5x10⁶ ufc/ml foi preciso que o leite cru permanecesse 10 dias sob refrigeração (COLLINS et alii, 1993). Nas condições aqui estudadas o leite cru não atinge um período superior a 48 horas antes do processamento. Isso pode ocorrer somente nos entrepostos, quando se considera o período utilizado para o transporte.

Considerando que o leite utilizado para processo UHT pode estar sujeito a uma flora variada, incluindo possíveis psicrotróficos e muitos proteolíticos, e sujeito também à presença e ação da plasmina e plasminogênio, e que, na indústria pode permanecer em tanques ou silos refrigerados por tempo variado antes do

processamento, torna-se difícil a aplicação das conclusões observadas a essa situação específica.

Tabela 13. Valores médios das contagens microbianas (ufc/ml) obtidas de leite cru refrigerado e suas relações percentuais.

produtores	contagem total	contagem psicrot.	contagem psicr. prot.	CP/CT %	CPP/CP %	CPP/CT %
	CT**	CP**	CPP**			
1	133.30	3.90	0.07	2.90	1.80	0.05
2	196.70	10.00	0.10	5.07	0.60	0.05
3	140.00	13.00	0.50	9.25	3.62	0.33
4	53.30	1.70	0.60	1.99	54.71	1.09
5	36.70	0.30	0.01*	0.08	2.94*	0.03*
6	40.00	1.80	0.40	4.35	20.68	0.90
7	23.30	1.20	0.10	5.36	9.60	0.51
8	20.00	54.10	10.70	100.00	19.70	53.35
9	40.00	5.00	0.02	12.57	0.39	0.05
10	143.30	5.00	0.50	3.21	10.12	0.35
X	82.70	9.50	1.30			
s	63.80	16.20	3.30			

* número estimado

** multiplicados por 10^3

A tabela 13 mostra os valores médios obtidos após todas as contagens microbianas e suas relações percentuais. Pode-se observar que os produtores que apresentaram maior contagem total ($2 > 10 > 3 > 1 > 4 > 6$ e $9 > 5 > 7 > 8$), não corresponderam às maiores contagens de psicrotróficos e de psicrotróficos proteolíticos.

Com relação à porcentagem CP/CT, o produtor 8 excedeu o valor em 170%, o que pode indicar erro na contagem global, porque esta deve conter as outras duas contagens. Possivelmente esse seja um dos efeitos da temperatura de 35°C para incubação citado anteriormente. O mesmo produtor apresentou o maior

valor para CPP, podendo ser considerado o de maior potencial para desenvolver proteólise dentre os produtores analisados.

O produtor 3, pela mesma tabela, apresentou cifra elevada de psicrotróficos ($1,3 \times 10^3$ ufc/ml), correspondendo a 9.25% da contagem total, porém a relação CPP/CP foi de 3.62%. Pela análise da coluna CPP/CP%, pode-se colocar em ordem decrescente os produtores que poderão acarretar problemas de proteólise: número 4 com maior valor (54.71%), seguido pelo 6 (20.68%), pelo 8 (19.70%), 10 (10.12%), 7 (9.60%), 3 (3.62%) e pelo 1, 5, 2 e 9 com 1.80, 2.94, 0.60 e 0.39%, respectivamente.

Esse bloco de produtores foi analisado durante o período de inverno (junho), quando as condições de crescimento do grupo psicrotrófico são mais favorecidas, por ser uma época onde a temperatura ambiente é mais favorável.

As tabelas 14, 15, 16 e 17 referem-se a novo bloco de produtores que tiveram o seu leite analisado durante o mês de Dezembro. A usina de beneficiamento possuía apenas 5 produtores catalogados como fornecedores de leite tipo B, que foram analisados com relação à contagem total, psicrotróficos proteolíticos e *Pseudomonas sp.*

A contagem total, conforme pode ser observado pela tabela 14, permaneceu dentro dos limites permitidos para o leite B, com as mesmas ressalvas feitas anteriormente. Todos os valores foram inferiores a 5×10^5 ufc/ml, apenas os produtores 3 e 5 apresentaram cifras menos elevadas (1.8×10^5 e 2×10^5 ufc/ml).

Tabela 14. Contagem total de leite cru refrigerado * (ufc/ml) obtido de produtores cadastrados como tipo B**

produtores	repetições					média
	1	2	3	4	5	
1	1,5x10 ⁵	6,8x10 ⁵	1,4x10 ⁵	5,0x10 ⁵	7,4x10 ⁵	4,4x10 ⁵
2	4,6x10 ⁵	6,2x10 ⁵	2,3x10 ⁵	7,2x10 ⁵	2,5x10 ⁵	4,6x10 ⁵
3	1,9x10 ⁵	2,0x10 ⁴	7,0x10 ⁴	6,0x10 ⁴	5,6x10 ⁵	1,8x10 ⁵
4	4,0x10 ⁵	7,3x10 ⁵	3,4x10 ⁵	1,4x10 ⁵	1,4x10 ⁵	3,5x10 ⁵
5	2,1x10 ⁵	9,0x10 ⁴	1,4x10 ⁵	2,6x10 ⁵	2,6x10 ⁵	2,0x10 ⁵

* valores fornecidos pela Usina

** região de Botucatu

Tabela 15. Microrganismos psicotróficos proteolíticos (ufc/ml) em leite cru obtido de produtores cadastrados como tipo B**

produtores	repetições					média
	1	2	3	4	5	
1	3,1x10 ⁴	2,9x10 ⁴	1,7x10 ²	9,0x10 ²	1,2x10 ²	4,4x10 ⁵
2	4,1x10 ⁴	2,7x10 ⁴	2,0x10 ³	4,0x10 ³	1,7x10 ²	4,6x10 ⁵
3	9,0x10 ³	3,8x10 ⁴	0,4x10 ²	1,2x10 ³	0,6x10 ²	1,8x10 ⁵
4	2,7x10 ³	1,5x10 ³	1,4x10 ²	3,0x10 ²	1,5x10 ²	3,5x10 ⁵
5	6,8x10 ³	6,0x10 ²	< 10 *	1,9x10 ³	0,1x10 ²	2,0x10 ⁵

* número estimado

** região de Botucatu

Os psicotróficos proteolíticos (tab.15), apresentaram valores inferiores a 10⁶ ufc/ml, que é considerado como limite, conforme KOHLMANN et alii (1991c), podendo, a partir dessas cifras, causar problemas posteriores em leite UHT, durante o armazenamento.

Os produtores 1 e 2 apresentaram as maiores contagens desse grupo e, também apresentaram cifras elevadas de contagem total, conforme pode ser visto na tabela 10. Os resultados obtidos por GANDOLFI et alii (1992), para contagem total de leite cru estavam entre 1×10^5 e 3×10^5 /ml. Valores esses menores do que os obtidos neste experimento. O leite dessa segunda região mostrou qualidade microbiológica inferior à primeira região analisada, possivelmente pela época escolhida para análise.

Os valores obtidos para *Pseudomonas sp* encontram-se relacionados na tabela 16. A média observada para os 5 produtores foi elevada, aproximando-se dos valores médios encontrados para a contagem total. Uma amostra desse material isolado das placas foi identificado, sendo classificado como *Pseudomonas fluorescens*. Nesse material havia também outro microrganismo que foi isolado e classificado como *Enterobacteria cloacae*, que possivelmente, interferiu nos valores obtidos em meio específico para pseudomonas.

Tabela 16. Pseudomonas sp. (ufc/ml) em leite cru obtido de produtores cadastrados como tipo B.*

produtores	repetições					média
	1	2	3	4	5	
1	$1,7 \times 10^4$	$5,4 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$
2	$3,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$
3	$1,6 \times 10^3$	$1,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^2$	$4,3 \times 10^4$
4	$1,5 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$	$< 10^2$	$6,8 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$
5	$1,3 \times 10^4$	$4,2 \times 10^3$	$8,3 \times 10^2$	$< 10^2$	$3,8 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$

* região de Botucatu

Os produtores analisados durante o mês de dezembro apresentaram valores maiores para contagem total e para psicrotróficos proteolíticos. A porcentagem de pseudomonas em relação à contagem total foi superior à relação psicrotróficos proteolíticos / contagem total, para todas as amostras utilizadas

chegando a alcançar os valores de 33 e 24% para os produtores 2 e 3, respectivamente, conforme tabela 17.

Tabela 17 . Valores médios (ufc/ml) das contagens microbianas obtidas de leite cru de produtores tipo B, e suas relações percentuais.

produtores	cont. total*	psicrot prot.*	pseud.*	PP/CT %	P/CT %
1	440	12	23	2.7	5.2
2	460	15	150	3.3	33.0
3	180	9.6	43	5.3	24.0
4	350	0.9	15	0.3	4.3
5	200	1.8	12	0.9	6.0

* multiplicados por 10³

3. Monitoração da proteólise em leite UHT desnatado comercial após os tratamentos.

Conforme foi salientado, anteriormente, essa fase do experimento foi delineada porque pouco se conhece, em nossas condições, sobre o tempo de prateleira do leite UHT, Embora, também, exista o problema causado pela geleificação que pode ocorrer pelo envelhecimento, poucas informações foram obtidas, relacionadas com o armazenamento de leite UHT no Brasil.

Definidas as condições anteriores, procurou-se, através de uma série de experimentos com 7 tratamentos, caracterizar a evolução proteolítica em amostras de leite UHT comercial, de mesma marca, característica e partida, durante a estocagem por 210 dias à temperatura ambiente.

Os dados das tabelas 18, 19 e 20 estão relacionados com a última fase do experimento, quando se utilizou 7 tratamentos sobre leite UHT desnatado (

controle, adição de plasmina, plasmina+citrato, pseudomonas, pseudomonas+citrato, plasmina+pseudomonas e plasmina+pseudomonas+citrato). Para efeito de discussão dos resultados serão utilizadas apenas as figuras correspondentes a essas tabelas, ou seja, as figuras 9, 10, 11, 12, 13 e 14.

Tabela 18. Evolução de proteólise nos tratamentos de leite UHT desnatado pelo método da ninidrina ácida (A470).

	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210
T0	0.202	0.228	0.254	0.319	0.147	0.316	0.477	0.375	0.520	0.486	0.575	0.572	0.747
T1	0.273	0.291	0.335	0.459	0.317	0.583	0.886	0.554	0.703	0.669	0.905	1.280	0.958
T2	0.301	0.204	0.327	0.350	0.300	0.440	0.840	0.507	0.557	0.594	0.594	0.615	0.874
T3	0.393	0.283	0.602	0.553	0.563	0.572	1.751	1.116	1.078	1.263	1.499	1.777	1.831
T4	0.303	0.352	0.517	0.515	0.521	0.545	1.557	1.106	1.102	1.393	1.332	1.560	1.495
T5	0.300	0.381	0.529	0.438	0.367	0.354	0.811	0.834	0.510	1.069	1.167	0.599	0.575
T6	0.276	0.358	0.539	0.594	0.296	0.542	1.146	0.775	0.898	0.922	1.069	1.124	1.104
Média	0.295	0.276	0.366	0.461	0.359	0.480	1.068	0.752	0.764	0.914	1.020	1.075	1.075

A acidez não apresentou grandes variações (Tab.20), porém pode-se observar um aumento nos valores. Durante o decorrer do experimento apenas duas amostras apresentaram acidez elevada ($>36^{\circ}\text{D}$), sendo imediatamente descartadas. KOCAK & ZADOW (1985) e KOHLMANN et alii (1991a) não encontraram relação entre pH e início de gelificação. Nesse caso os autores observaram uma decréscimo nos valores de pH, que foram semelhantes aos resultados aqui observados para acidez.

Tabela 19. Evolução de proteólise nos tratamentos de leite UHT desnatado pelo método da ninidrina normal (A570)

	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210
T0	0.903	0.802	0.890	1.251	0.707	.0918	0.751	1.090	3.838	1.308	1.816	1.981	2.656
T1	1.733	1.106	1.756	2.039	3.592	2.402	5.292	>5.5	>5.5	>5.5	>5.5	>5.5	>5.5
T2	1.792	1.238	1.258	1.365	3.532	2.084	>5.5	2.696	>5.5	3.504	4.372	2.018	4.652
T3	1.486	1.012	1.566	2.021	2.296	2.986	>5.5	2.378	>5.5	3.522	3.885	3.636	3.854
T4	1.422	1.745	1.245	1.768	2.140	2.896	2.794	2.546	>5.5	2.523	3.567	3.756	3.390
T5	1.654	1.345	1.344	1.909	2.280	1.758	1.360	2.204	>5.5	3.135	2.910	2.070	1.478
T6	1.146	1.322	1.362	1.570	2.512	2.502	2.424	1.858	>5.5	2.364	2.967	2.282	2.654
Média	1.449	1.228	1.346	1.703	2.532	2.220	2.524	2.129	-	2.726	3.258	2.623	3.114

Tabela 20. Evolução da acidez (° D) dos tratamentos de leite UHT desnatado

	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210
T0	16	18	20	21	20	20	20	20	21	19	19	20	19
T1	12	22	17	22	20	20	22	22	23	21	18	20	20
T2	16	20	18	18	18	18	18	21	19	20	18	18	19
T3	11	22	18	18	18	18	16	18	20	21	19	18	19
T4	16	20	18	20	20	19	18	15	17	18	19	19	20
T5	17	21	17	20	18	20	14	18	18	18	20	19	19
T6	16	17	17	20	18	19	18	16	20	19	20	20	20
Média	15	20	18	20	19	19	18	18	20	19	19	19	19

A adição de plasmina (T1), conforme pode ser observado pela figura 9, originou uma curva semelhante à que ocorreu no leite normal (controle). Aos 120 dias havia um depósito visível que foi se acentuando até que houve uma gelificação total aos 150 dias de armazenamento. Os resultados foram semelhantes aos obtidos

por KOHLMANN et alii (1991a), que observaram modificações aos 56 dias de armazenamento, com aparecimento de duas camadas distintas (gel no fundo e líquido na superfície) com 100 dias. Esses pesquisadores também utilizaram leites tratados com injeção indireta de vapor, por ser a forma que produz leite UHT mais susceptível à gelificação.

No T1, após os 150 dias, também se observou uma clarificação, que normalmente ocorre por ação de plasmina. A fase líquida superior tornou-se límpida e ligeiramente amarelada. A adição de citrato de sódio manteve o comportamento da curva mais próximo da normal (T0), não havendo gelificação durante todo o experimento, apenas um ligeiro depósito foi notado a partir de 135 dias. A adição de citrato protegeu o leite frente à ação de plasmina. Uma possível explicação pode estar relacionada com modificações ocorrendo com o pH do leite. De acordo com WALSTRA & JENNESS (1987), a queda do pH determina primeiro a dissolução do fosfato de cálcio coloidal e uma diminuição na volumosidade da micela, chegando a promover, também, alguma dissolução dessas micelas.

A evolução da acidez, apresentada pela tabela 20, pode confirmar esse mecanismo de proteção do citrato de sódio à ação da plasmina. Podemos observar que os valores obtidos para acidez no tratamento com plasmina foram superiores àqueles obtidos para o tratamento com plasmina+citrato de sódio (T1 e T2, respectivamente), ou seja, possivelmente, o citrato manteve o controle da gelificação ao proporcionar essa proteção frente a acidez .

Esse resultado difere do encontrado por KOCAK & ZADOW (1985), que obtiveram com adição de 0.3% de citrato um aumento na viscosidade a partir de 90 dias. Eles obtiveram uma curva para leite+citrato inferior à do controle até 100 dias, pela análise de proteólise. Essa curva se tornou ascendente a partir de 90 dias, superando o controle em 110 dias. A adição de citrato acelerou a gelificação que ocorre em leite UHT, durante o seu envelhecimento.

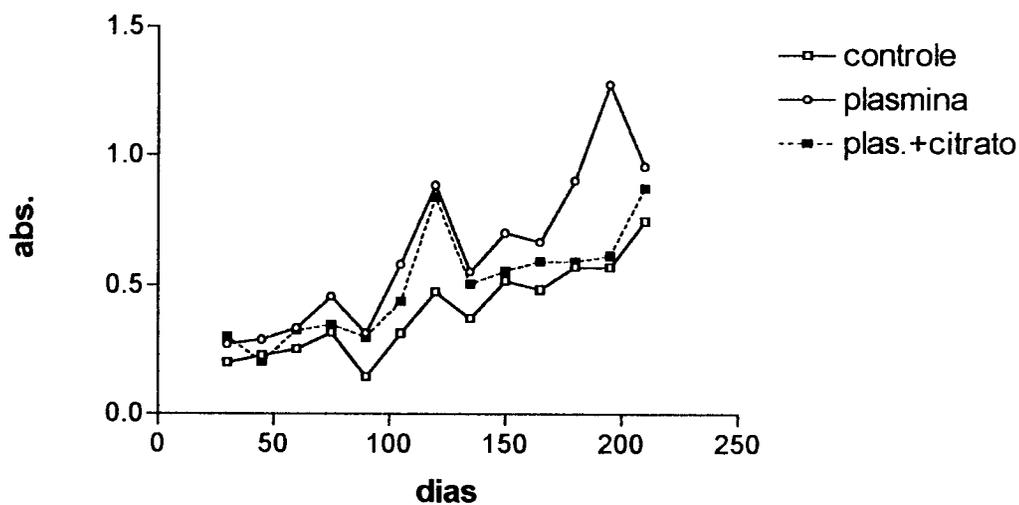


Figura 9. Evolução de proteólise em leite UHT desnatado. Comparação dos tratamentos 0, 1 e 2. (A_{470nm})

O citrato deveria ter sido adicionado ao leite normal durante o experimento, para possibilitar uma melhor comparação de sua efetividade como protetor. O mecanismo de ação do citrato é que ele reduz a concentração de Ca iônico do soro, fazendo com que o fosfato de cálcio coloidal das micelas se solubilize para manter o equilíbrio de cálcio. Desta forma há uma desintegração parcial da micela. McMAHON et alii (1991), conseguiram prevenir geleificação pela adição de 0.1% citrato trisódico.

Vale ressaltar que o método específico, da ninidrina ácida, realmente detectou alterações ocorrendo na fração κ -caseína pela ação de plasmina e, também, alterações no controle durante o armazenamento (fig.9).

A figura 10, compara o efeito da adição de enzima de pseudomonas e o efeito de citrato como protetor. O que se observou foi que o método da ninidrina ácida realmente mostrou um aumento nos valores de absorbância a partir de 120 dias, indicando aumento do glicomacropéptido. Não houve mudanças visuais em T3 (com enzima) e em T4 (enzima+citrato), apenas um ligeiro depósito foi se formando a partir de 105 dias. Apesar de valores elevados de absorbância (superiores a 1), não houve geleificação do leite durante o armazenamento. A adição de citrato não modificou o comportamento da curva obtida com o tratamento 3.

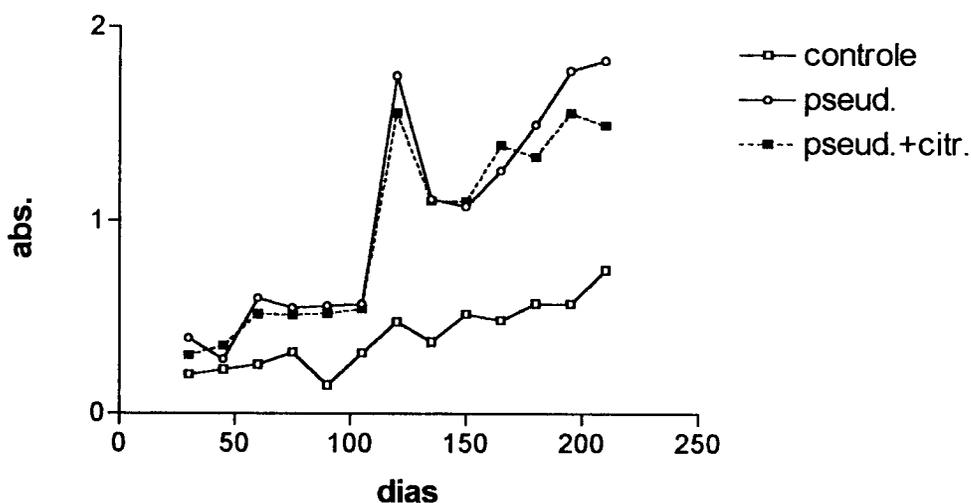


Figura 10. Evolução de proteólise em leite UHT desnatado. Comparação dos tratamentos 0, 3 e 4. (A_{470nm})

Quando se adicionou enzimas de *Pseudomonas*, uma atividade proteolítica mais intensa ocorreu, então o método se revelou com maior sensibilidade, o que pode ser observado quando se compara as figuras 9 e 10. A ação dessa enzima sobre a κ -caseína é bem estabelecida (SHAH, 1994). A figura 10 mostra, com evidencia, que a monitoração da proteólise pelo método da ninidrina ácida, foi promissora, revelando as modificações da fração κ -caseína.

Enzimas de *Pseudomonas fluorescens* são metaloproteases, requerem Ca^{+2} e Zn^{+2} para sua atividade e estabilidade. Possivelmente a concentração de citrato adicionada não foi suficiente para interferir no mecanismo que envolve o cálcio iônico, ou o tempo de armazenamento não foi suficiente para que ocorresse coagulação. Não houve a relação com modificações de acidez, conforme pode ser observado pela tabela 20. O tratamento com adição de citrato de sódio (T4) apresentou, até, valores superiores de acidez quando comparado com o tratamento 3 (adição de extrato de *Pseudomonas*).

De qualquer forma são indícios de que os problemas do leite UHT, ao envelhecer, não são decorrentes de enzimas microbianas, simplesmente, embora o método evidencie uma evolução proteolítica sobre a κ -caseína de forma mais

acentuada do que a anterior (plasmina), com grandes diferenças sobre o leite controle.

A figura 11, mostra as curvas elaboradas a partir dos tratamentos 5 (pseud.+plasmina) e 6 (pseud+plas+citrato). Pode-se observar que o T5 teve dois picos nos valores de absorbância, aos 120 e 165 dias de armazenamento, enquanto o comportamento da curva para a amostra com citrato se manteve semelhante ao da fig.10. KOHLMANN et alii (1991) encontraram uma enzima extracelular de *P. fluorescens* com atividade semelhante à plasmina em substrato S-2251, que pode contribuir para o efeito da plasmina no leite. A aparência das amostras dos tratamentos 5 e 6 foi igual à do controle, sem nenhuma modificação visual nem presença de sedimentos durante todo o decorrer do experimento.

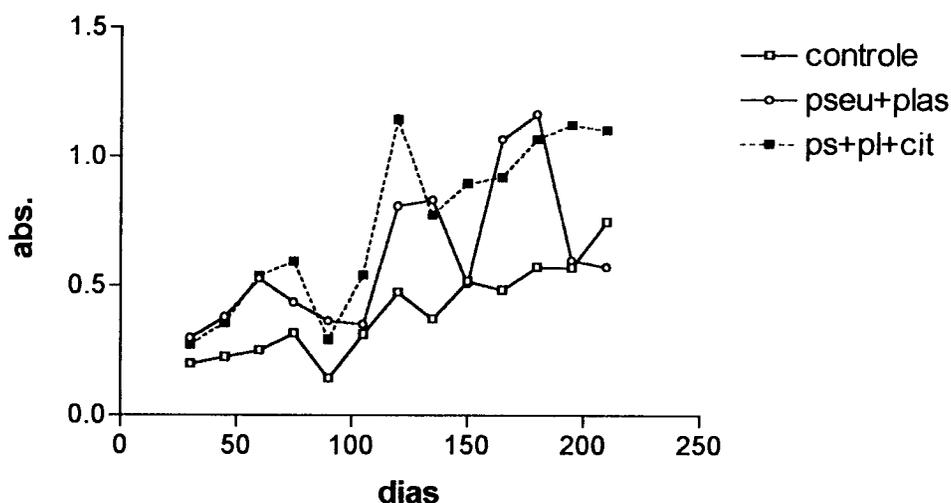


Figura 11. Evolução de proteólise em leite UHT desnatado. Comparação dos tratamentos 0, 5 e 6. (A_{470nm})

As figuras 12, 13 e 14 relacionam os valores de absorbância obtidos com leituras em comprimento de onda de 570nm, pelo método da ninidrina. O objetivo ao utilizar esse comprimento de onda, foi monitorar as modificações que estariam ocorrendo em todas as frações de caseína (α , β e κ), indistintamente, diferindo do método anterior (ninidrina ácida).

O protocolo utilizado para esse método necessita ser refeito, pois os valores obtidos foram sempre muito elevados, dificultando as leituras. Pela tabela 19 pode-se observar que, apesar das várias diluições efetuadas, não foi possível analisar as amostras em diferentes períodos, dificultando a análise dos resultados, principalmente no que se refere ao tratamento com plasmina. A utilização de ninidrina normal apresentou valores superiores porque enquanto a ninidrina ácida se relaciona, fundamentalmente, com GMP, a comum está relacionada com a proteína total.

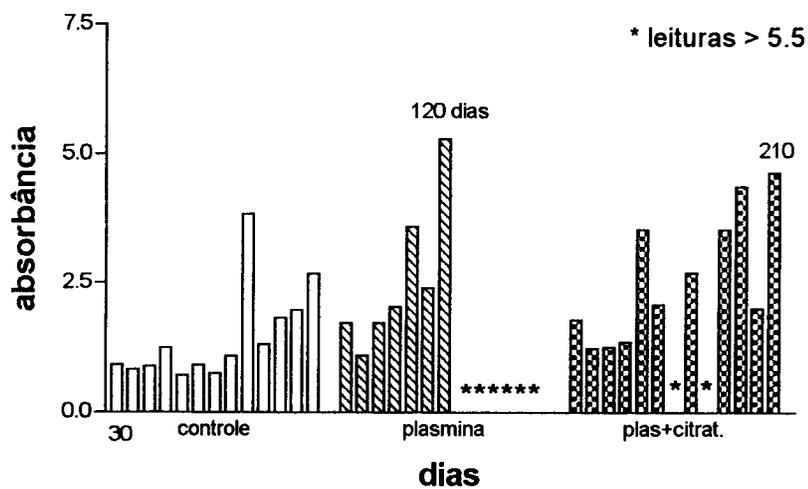


Figura 12. Comparação dos tratamentos 0, 1 e 2 em leite UHT desnatado. (A_{570nm})

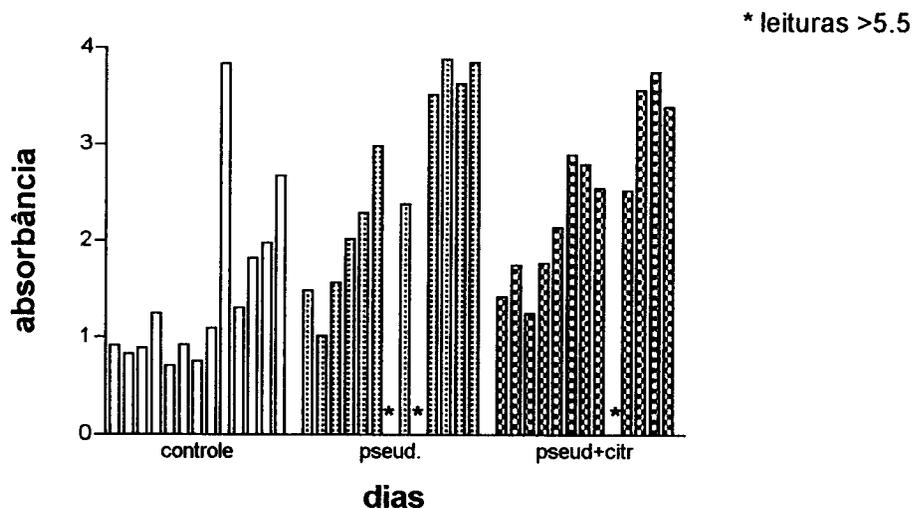


Figura 13. Comparação dos tratamentos 0, 3 e 4 em leite UHT desnatado. (A_{570nm})

Conforme pode ser observado pela análise das figuras 12 e 13, alguns picos de proteólise foram obtidos. Para o normal, leite controle, isso ocorreu aos 150 dias, para o T1, plasmina, ocorreu a partir de 120 dias, quando não foi possível mais analisá-lo. A adição de citrato, melhorou as condições de leitura, com ocorrência de picos de absorbância aos 120 e 150 dias. No tratamento com enzimas de pseudomonas os picos também ocorreram aos 120 e 150 dias. A adição de citrato promoveu o aparecimento de pico de leitura aos 150 dias de armazenagem.

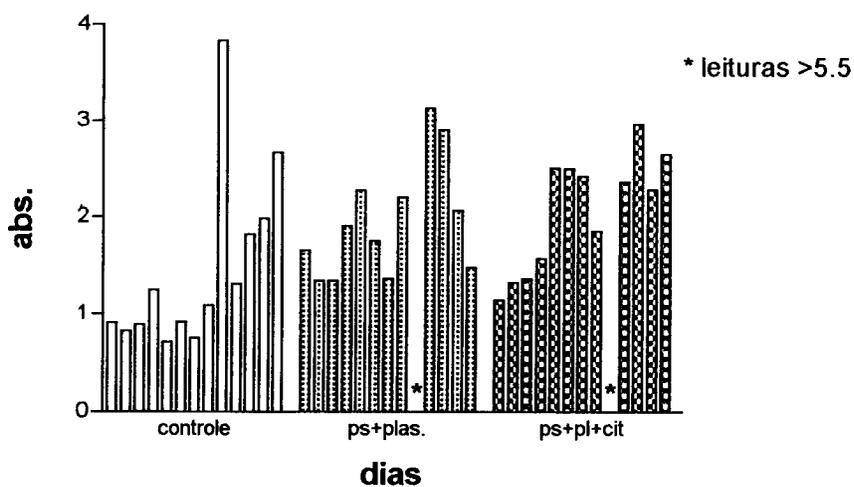


Figura 14. Comparação dos tratamentos 0, 5 e 6 em leite UHT desnatado. (A_{570nm})

A figura 14, que também monitora atividade proteolítica pela utilização de ninidrina normal, mostra um comportamento semelhante às duas anteriores. O pico máximo de leitura, quando se adicionou plasmina e pseudomonas, foi observado aos 150 dias. A adição de citrato normalizou o comportamento da curva, mas o pico máximo observado continuou sendo aos 150 dias de armazenagem.

4. Comparação de médias pelo teste de Tukey.

Para o teste de comparação de médias foram utilizados os valores obtidos na última fase do experimento, que estão relacionados nas tabelas 18 e 19. Foram realizados testes de comparação entre as médias de todos os tratamentos para os dois métodos: ninidrina ácida e normal.

Houve diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, apenas entre as médias de T0 comparadas com T3 e T4 e, entre as médias de T2 quando comparadas com T3 e T4, para ninidrina ácida. Não houve diferença significativa entre todas as médias dos tratamentos com a utilização de ninidrina normal.

Para facilitar o acompanhamento da análise estatística, a seguir define-se, novamente, os tratamentos efetuados no leite UHT utilizado:

T0 - normal, sem adições. T1 - adição de plasmina. T2 - adição de plasmina+citrato

T3 - adição de extrato de pseudomonas. T4 - adição de pseudomonas+citrato

T5 - adição de plasmina+pseudomonas e,

T6 - adição de plasmina+pseudomonas+citrato

A comparação das médias entre tratamentos foi realizada entre: T0XT1, T0XT3, T0XT5, T1XT2, T1XT3, T3XT4, T5XT6, para os dois métodos de monitorização de proteólise. Os resultados foram os seguintes:

	ninid. ácida	ninid. normal
T0XT1	S	S
T0XT3	S	S
T0XT5	S	NS
T1XT2	NS	NS
T1XT3	S	NS
T3XT4	NS	NS
T5XT6	NS	NS

S - significativo NS - não significativo

Conforme o resumo acima, pode-se observar que houve diferença significativa entre as médias, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, quando se comparou o controle com os tratamentos: adição de plasmina, pseudomonas e adição de plasmina+pseudomonas. A comparação entre os tratamentos com plasmina e com adição de pseudomonas também foi significativa, quando se utilizou ninidrina ácida. Não houve diferença significativa entre as médias, quando se adicionou o citrato de sódio.

Estes resultados estão semelhantes aos das figuras 9, 10 e 11, com exceção da adição de citrato+plasmina e de citrato+plasmina+pseudomonas, que apresentaram curvas diferentes quando comparados com T1 e T5, respectivamente.

Para ninidrina normal, houve diferença significativa entre as médias, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, somente quando se comparou o leite normal (controle) com os tratamentos com adição de plasmina e com extrato de pseudomonas.

A correlação linear entre os dois métodos foi baixa ($r=0.48$), o que era esperado, uma vez que estão avaliando condições diferentes. A ninidrina ácida,

somente κ -caseína e a ninidrina normal todas as frações (grupo amina livres), conforme ARDÖ & MEISEL (1991).

Outro aspecto de interesse foi analisar o método ninidrina ácida (A470), correlacionando controle x plasmina e controle x pseudomonas. A correlação linear entre o controle e plasmina foi razoável ($r=0.77$), indicando que o método que avalia GMP correlacionou-se de forma razoável com a atividade de plasmina, confirmando o observado na discussão da figura 9, que houve evolução proteolítica sobre a κ -caseína.

Já a correlação entre o controle e o tratamento com extrato de pseudomonas foi ligeiramente superior ($r=0.81$), indicando que o método da ninidrina ácida (GMP), correlacionou-se de forma ligeiramente superior com atividade de enzimas de pseudomonas, o que evidencia a ação sobre a κ -caseína conforme já discutido na figura 10.

5. Separação eletroforética PAGE da caseína inteira

A utilização de separação eletroforética (PAGE) foi realizada, a fim de tentar ilustrar as possíveis alterações que estariam ocorrendo nas diferentes frações de caseína. Seria uma tentativa de ilustrar as modificações, de cada fração, após os tratamentos, e uma possível confirmação do que foi detectado pelos métodos utilizados.

Os resultados obtidos pela separação eletroforética da caseína total, estão relacionados nas figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21. Esses resultados serão apresentados e discutidos pelos seus respectivos densitogramas. Os valores dentro das figuras, sob os respectivos picos, exprimem a porcentagem que eles representam sobre a superfície total.

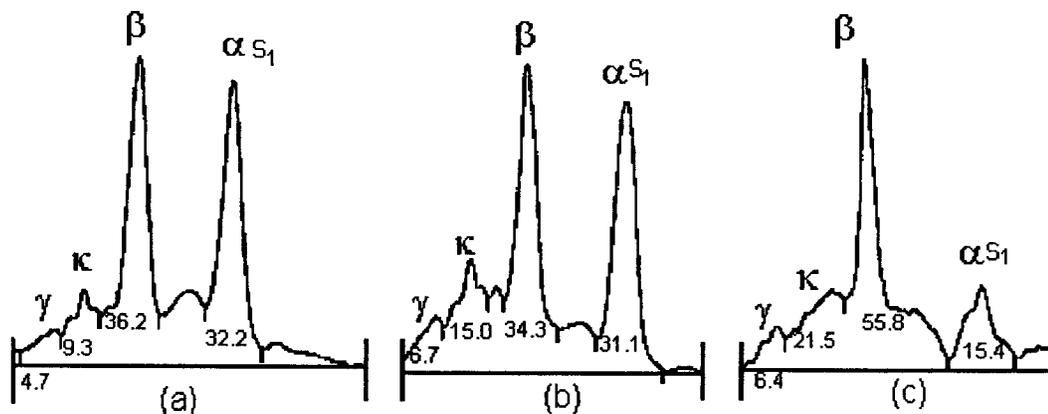


Figura 15. Separação eletroforética PAGE de caseína total. Densitograma do leite UHT desnatado controle, obtidos a 30 dias (a), 120 (b) e a 210 dias (c), mantido à temperatura ambiente.

As análises foram iniciadas após uma semana dos tratamentos. Isso fez com que, mesmo o tempo zero de amostragem, tivesse a possibilidade de sofrer alguma alteração inicial.

Pode-se observar, pela figura 15, que as frações de caseína do leite controle sofreram alterações durante o período de estocagem. A αS_1 -cn foi mais degradada do que a β -cn e, mesmo se for considerada a possibilidade de, também, ter havido migração de fragmentos de αS_1 em direção à β -cn. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por UCEDA et alii (1993), com leite de ovelha.

As alterações nas frações podem ser explicadas pela presença residual de proteinases, da mesma forma que obteve LOPEZ-FANDINO et alii (1993), quando encontrou, em leite desnatado, aumento tanto de proteinase microbiana quanto de plasmina. No presente caso, aparentemente não houve ação de plasmina até 210 dias, visualizada por modificações na β -cn. O processamento direto também favorece o aparecimento de proteólise.

Os valores iniciais de γ -cn (4.7) e κ -cn (9.3) foram semelhantes aos obtidos por COLLIN et alii (1991) para as mesmas frações : 4.52 e 9.28 % para γ e

κ -cn, respectivamente. A eletroforese subestima o pico κ -cn e superestima a β -cn, devido à incompatibilidade de parte de κ -cn glicosilada com a β -cn. O corante de Coomassie é mal fixado pelas glicoproteínas, mesmo assim, foi possível detectar um aumento na fração κ (9.3, 15.0 e 21.5%), sugerindo ação de enzimas com preferência por essa fração, comprovando o que havia sido constatado pelo método da ninidrina ácida.

LU & NIELSON (1993), constataram que os ativadores naturais de plasminogênio não são afetados pelo processo UHT. Pelo densitograma acima, pode-se verificar que, aparentemente, não houve ação de plasmina, pela porcentagem praticamente constante de resíduos γ (4.7, 6.7 e 6.4), talvez porque o tempo tenha sido insuficiente para a ativação do plasminogênio, que por ventura, poderia haver nesse leite.

A figura 16, mostra os densitogramas obtidos após adição de plasmina. Houve uma intensa modificação na fração β , inicialmente, conforme pode ser observado em b, com o aparecimento de dois picos γ -cn com valores de 13.7 e 20.5% e com redução de β -cn de 26.3 para 10.7%. Modificação em αS_1 -cn, pode ser observada em c (valores reduzidos de 31.0-30.8 para 24.8%), indicando da mesma forma que obtida por KOHLMANN et alii (1991), que a plasmina degrada primeiro β -cn, depois α -cn.

Houve uma redução de 64.8% para β -cn e de 20% para a αS_1 -cn . FARKYE et alii (1991) obtiveram decréscimo de 40.2% para β -cn e 26.4% para αS_1 -cn, estudando proteólise em queijo mussarela após 14 dias de armazenamento.

Não foi possível verificar alterações na κ -cn através do densitograma obtido, porém ficou claro que o comportamento semelhante obtido pelas curvas comparativas do leite com e sem adição de plasmina (fig.9), não se repetiu após a eletroforese, isto é, pela figura 9, analisando as respectivas curvas, podia-se afirmar que as modificações que ocorriam no controle foram muito semelhantes às aquelas ocorridas no leite com plasmina pela. Já, observando os densitogramas, figs15 e 16,

pode-se notar que ocorreram diferenças marcantes, nas frações, entre os dois tratamentos.

O objetivo de evidenciar a evolução de proteólise sobre a κ -cn, constatada pelo método da ninidrina ácida, ficou prejudicado. Isso porque, nessa região do densitograma, parece ter havido uma somatória dos fragmentos γ resultantes da β -cn com a fração κ . No entanto, com o método da ninidrina, embora bastante prejudicado pelas diluições, houve semelhança constatada pelos densitogramas, isto é, houve modificações em todas as frações.

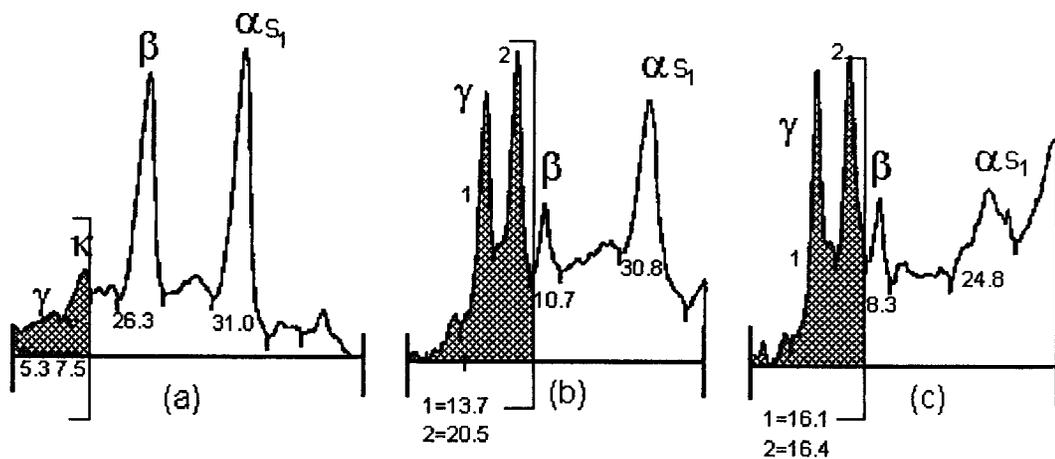


Figura 16. Separação eletroforética PAGE de caseína total. Densitograma do leite UHT desnatado com plasmina, obtido a 30 (a), 120 (b) e 210 (c) dias, mantido à temperatura ambiente.

A figura 17 mostra o efeito da adição de citrato de sódio, como protetor. Pode-se observar que houve menor redução da β -cn, quando comparada a figura anterior. Essa fração teve ligeira redução aos 120 dias (29.7 para 22.6) e, aos 210 dias, aparentemente, continuou com a mesma proporção, embora tenha havido um aumento considerável na porcentagem (42.4). Isto pode ter ocorrido porque houve uma soma com o valor do pico existente entre a β e α S-cn.

As regiões escuras das figuras, a e b, mostram a existência de 3 picos diferentes com valores menores do que o observado para o tratamento com

plasmina, sem citrato. A αS_1 -cn permaneceu praticamente igual à figura anterior, apenas uma pequena redução pode ser observada aos 210 dias (20.9%).

Não houve gelificação com esse tratamento, embora tenha havido proteólise, o que está de acordo com KOHLMANN et alii (1991), que afirmam ser necessário que haja alguma proteólise parcial da caseína, antes que esta, fisicamente modificada, se associe para formar um gel.

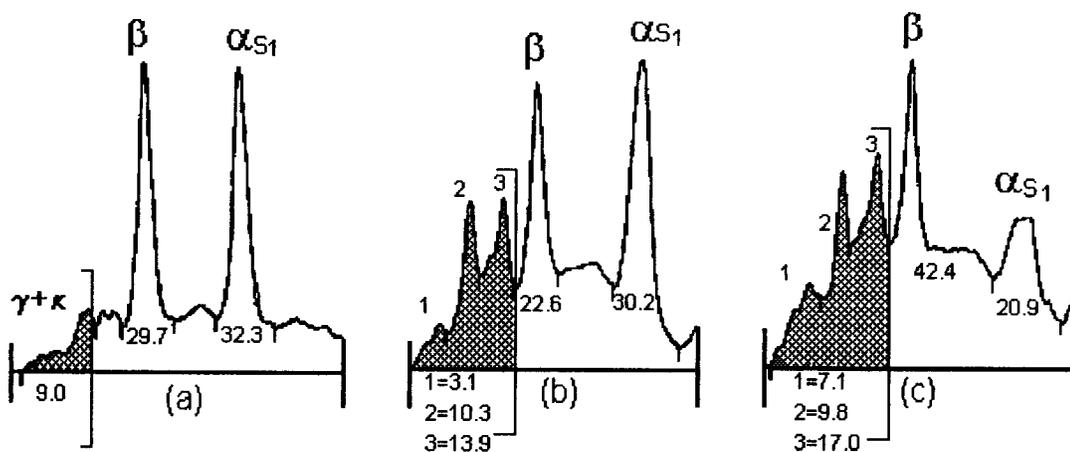


Figura 17. Separação eletroforética PAGE de caseína total. Densitograma do leite UHT desnatado com plasmina e citrato de sódio, obtido a 30 (a), 120 (b) e 210 (c) dias, mantido à temperatura ambiente.

O citrato aparentemente estabilizou a estrutura da micela de caseína. Houve manutenção do pico da β -cn quando se compara as figuras 16 e 17. De acordo com KOCAK & ZADOW (1985), próximo a geleificação, a agregação da caseína desestabilizada pode ser aumentada envolvendo a participação de íons citrato, que aumenta as ligações cálcio-fosfato coloidal.

Modificações na fração κ -cn não foram identificadas porque, nessa região no densitograma, sempre ocorreu somatória de fragmentos, impossibilitando a obtenção de conclusões claras. Talvez, fosse necessário, obter somente a fração κ para monitorá-la frente a ação da plasmina. É possível que o pico 1 da figura 17, letras b e c, represente a κ -cn, se considerarmos que os picos mais próximos da β -

cn representem os fragmentos γ . Nesse caso houve alteração na fração κ , provocada pela plasmina.

A figura 18, mostra o densitograma obtido após a adição do extrato de *Pseudomonas fluorescens*. Enquanto a β -cn, praticamente, se manteve (38.2, 31.7 e 42.2%), a α S₁-cn teve uma redução de 32.9% ao final dos 210 dias. A região da κ -cn também sofreu modificação, com um aumento de sua área superficial de 6.0 para 20.1%. Os resultados são concordantes com KOHLMANN et alii (1991), que utilizou outra cepa de *Pseudomonas fluorescens*, a M3/6.

Esses resultados estão de acordo com o observado pelo método da ninidrina ácida (A_{470} nm), confirmando a sensibilidade do método na detecção de modificações da κ -caseína.

A eletroforese PAGE, mostrou que a atividade proteolítica, ao nível das frações de caseína, foi semelhante entre o controle (fig15) e o tratamento com pseudomonas (fig18), conforme pode ser observado pela parte c dos respectivos densitogramas. O controle teve uma redução mais acentuada de α S₁-cn do que o referido tratamento, podendo sugerir que houve ação residual de enzima microbiana no leite normal (T0).

Praticamente não houve alterações no densitograma, quando se adicionou citrato de sódio, indicando pouco efeito deste como protetor. A produção de proteinases microbianas é reprimida por formas facilmente metabolizadas de carbono, como os citratos, segundo FAIRBAIRN & LAW (1986). Nesse caso nada ocorreu, porque adicionou-se um extrato livre de células viáveis do microrganismo que já havia produzido a enzima.

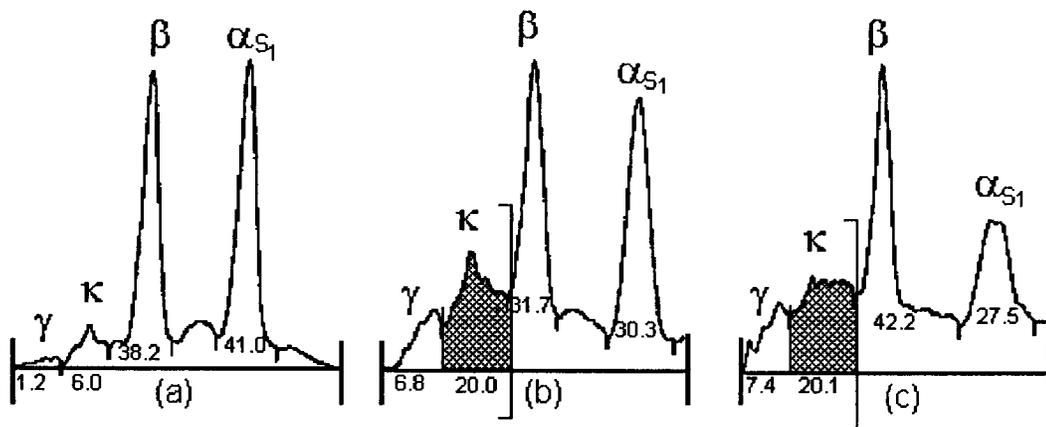


Figura 18. Separação eletroforética PAGE de caseína total. Densitograma do leite UHT desnatado com extrato de *Pseudomonas fluorescens*, obtido a 30 (a), 120 (b) e 210 (c) dias, mantido à temperatura ambiente.

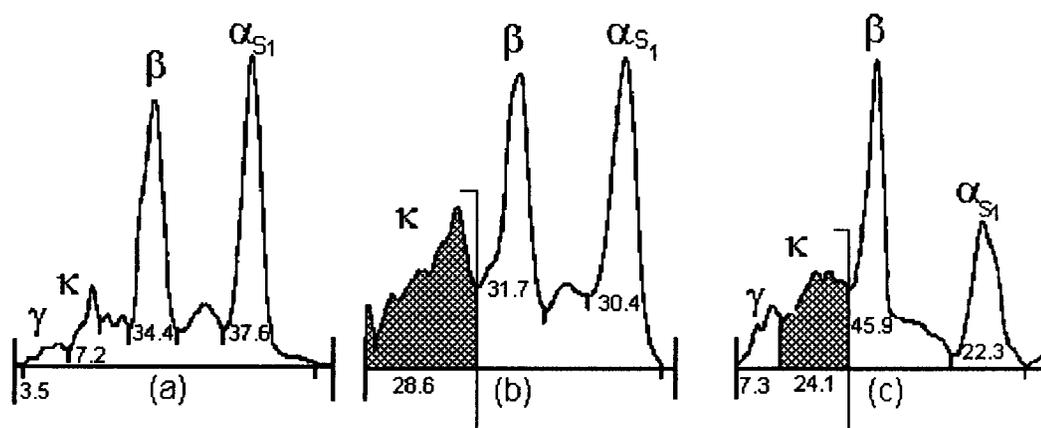


Figura 19. Separação eletroforética PAGE de caseína total. Densitograma do leite UHT desnatado com extrato de *Pseudomonas fluorescens* + citrato de sódio, obtido a 30 (a), 120 (b) e a 210 (c) dias, mantido à temperatura ambiente.

A adição de plasmina + pseudomonas (fig.20), fez com que se obtivesse densitogramas semelhantes ao tratamento com adição de pseudomonas. A plasmina não teve efeito sobre a β -cn, e, possivelmente, o efeito observado na α_{S1} -cn foi decorrente da ação de pseudomonas. O efeito observado não foi uma somatória da ação das duas enzimas, possivelmente a concentração de plasmina

não foi suficiente para promover alterações. O citrato de sódio teve pouco efeito quando adicionado à mistura de plasmina + pseudomonas (fig.21), mantendo o densitograma com as mesmas características do tratamento anterior.

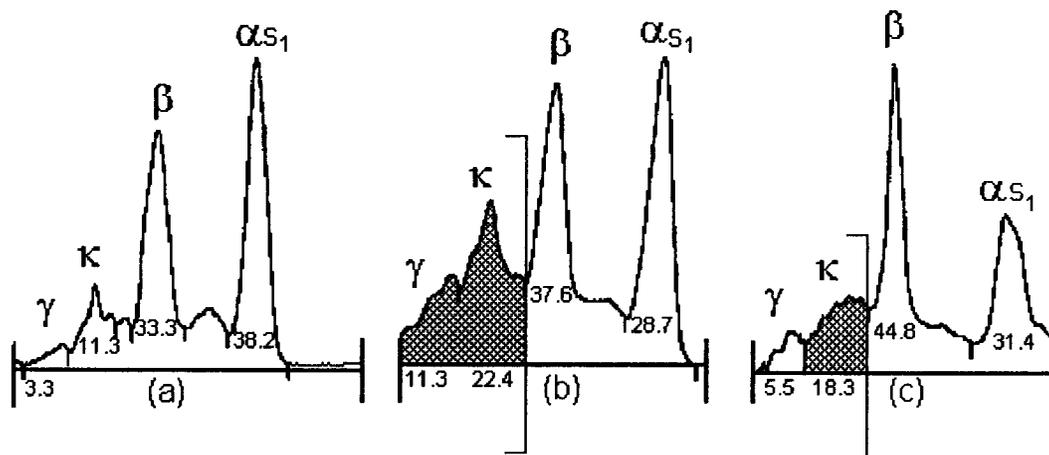


Figura 20. Separação eletroforética PAGE de caseína total. Densitograma do leite UHT desnatado com plasmina + extrato de *Pseudomonas fluorescens*, obtido a 30 (a), 120 (b) e 210 (c) dias, mantido à temperatura ambiente

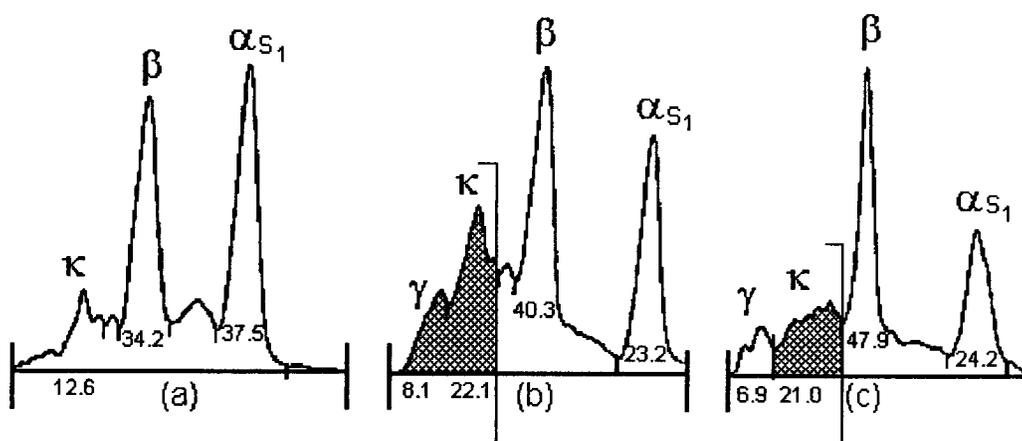


Figura 21. Separação eletroforética de caseína total. Densitograma do leite UHT desnatado com plasmina + extrato de *Pseudomonas fluorescens* + citrato de sodio, obtido a 30 (a), 120 (b) e a 210 (c) dias, mantido à temperatura ambiente.

A ilustração obtida pela realização da eletroforese contribuiu para o reconhecimento de modificações nas frações de caseína. Através dessa técnica, embora não tenha sido bem individualizada as modificações da κ -cn, foi possível visualizar alterações importantes que já haviam sido detectadas pelos métodos da ninidrina ácida e da ninidrina comum.

CONCLUSÕES

Os vários experimentos configurados no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1. Os níveis iniciais de proteólise do leite UHT comercializado foram elevados, significando que, já havia ocorrido alguma modificação nas proteínas do leite, decorrentes do tratamento térmico do processo UHT ou de ação enzimática somada ao tratamento térmico, com possível liberação de fragmentos iniciais.

2. Pode-se verificar um aumento na atividade proteolítica durante o armazenamento do leite UHT comercial a temperatura ambiente, tanto a 210, 220 e 570 nm., provavelmente, em função de uma intensificação da proteólise decorrente da sobrevivência térmica de enzimas presentes..

3. Embora a diálise seja um método alternativo de fracionamento para avaliação da atividade proteolítica em queijos, não foi confirmada para leite UHT. As razões estariam ligadas às diferenças da proteólise nesses dois sistemas. Em queijos a proteólise é progressiva, o que contribui para intensificar a quantidade de pequenas moléculas, cada vez mais fáceis de serem dialisadas. No leite UHT isso não ocorreu, ao menos, não com a mesma intensidade dentro dos prazos estudados, agravado pela possibilidade de ocorrência de polimerização.

4. As médias dos resultados obtidos mostraram que as frações de caseína, monitoradas pelo método ninidrina+"pellet", apresentaram um comportamento ascendente durante o armazenamento do leite UHT comercial, com uma ligeira interferência causada por resíduos de TCA.

5. O método da ninidrina ácida proposto para monitorar alterações na κ -caseína mostrou-se eficiente, sendo confirmadas alterações precoces nessa fração, evidenciadas pelas médias dos resultados obtidos durante o armazenamento do leite UHT comercial

6. As análises de qualidade microbiológica do leite cru refrigerado, apresentaram valores menores para as contagens efetuadas durante o período de

junho. Já, os leites analisados durante o período de dezembro apresentaram cifras mais elevadas. Embora os resultados tenham sido satisfatórios, não puderam ser aplicados diretamente ao leite para processamento UHT, porque eram destinados à processamento de tipo B.

7. A evolução proteolítica caracterizada nas amostras de leite UHT, após os tratamentos, mostrou que a adição de citrato de sódio 0,025% protegeu o leite de se geleificar pela ação de plasmina. Confirmou a eficácia do método da ninidrina ácida em detectar alterações na κ -caseína, evidenciada nos tratamentos com plasmina e com extrato de pseudomonas.

8. A análise estatística dos resultados obtidos após os tratamentos, empregando o método da ninidrina ácida, confirmou que houve diferença significativa entre as médias, pelo teste de Tukey (0.05 %) , quando se comparou o leite controle com os tratamentos com adição de plasmina, com extrato de pseudomonas e com adição de plasmina+pseudomonas. A análise mostrou uma correlação linear razoável ($r=0.77$) entre o controle e plasmina e uma correlação ligeiramente superior (0.81) entre o controle e o tratamento com extrato de pseudomonas. Essas indicações confirmaram que houve evolução proteolítica sobre a κ -caseína.

9. A eletroforese da caseína inteira (PAGE) ilustrou modificações significativas nas frações de caseína do leite controle e uma intensa modificação na fração β -caseína antes da α s-caseína quando se adicionou plasmina no leite UHT. Com a adição de citrato de sódio houve uma menor redução da β -caseína e, embora não tenha havido geleificação, houve proteólise evidenciada pelos densitogramas.

10. As modificações observadas nas frações da caseína, quando se adicionou extrato de pseudomonas, confirmou a sensibilidade do método da ninidrina ácida na detecção de alterações da κ -caseína . A ilustração obtida pela realização da eletroforese contribuiu para o reconhecimento de modificações nas frações de caseína. Através dessa técnica, embora não tenha sido bem individualizada as modificações da κ -cn, foi possível visualizar alterações

importantes que já haviam sido detectadas pelos métodos da ninidrina ácida e da ninidrina comum.

REFERÊNCIAS

- 1 - ADDEO, F.; GARRO, G.; INTORCIA, N.; PELLEGRINO, L.; RESMINI, P.;
CHIANESE, L. Gel electrophoresis and immunoblotting for the detection of
casein proteolysis in cheese. Journal of Dairy Research 62 : 297-309, 1995.
- 2 - ADHIKARI, A.K.; SINGHAL, O.P. Effect of heat resistant micro-organisms on the
fatty acid profile and the organoleptic quality of UHT milk during storage.
Indian J. Dairy Science. 45 (5) : 272-7, 1992.
- 3 - ARDO, Y.; MEISEL, H. Methods for direct measurement of peptide bond
cleavage in cheese. Bull. I.D.F. 261 : 10-13, 1991.
- 4 - BASTIAN, E.D.; BROWN, R.J.; ERNSTROM, C.A. Plasmin activity and milk
coagulation. J.Dairy.Sci. 74 (11) : 3677-85, 1991a.
- 5 - BASTIAN, E.D.; BROWN, R.J.; ERNSTROM, C.A. Casein interference in bovine
plasmin assays using a synthetic substrate. J.Dairy.Sci. 74 (12) : 4119-24,
1991b.
- 6 - BASTIAN, E.D.; HANSEN, K.G.; BROWN, R.J. Activation of plasmin with
urokinase in ultrafiltered milk for cheese manufacture. J.Dairy.Sci. 74 : 3669-
76, 1991c.
- 7 - BENALI, M.; GUILBAND, E.; MONTAGNE, P.; HUMBERT, G.; CUILLIERE, M.L.;
DUHEILLE, J.; FAURE, G.; LINDEN, G. Proteolysis of bovine β -casein by
plasmin-sepharose conjugate. Lait 74 : 333-41, 1994.
- 8 - BENSLIMANE, S.; DONIN-BERGERET, M.J.; BERDAGUE, J.L.; GAUDEMER, Y.
Variation with season and lactation of plasmin and plasminogen
concentrations in Montbeliard cow's milk. Journal of Dairy Research 57 :
423-45, 1990.
- 9 - BHOWMIK, T.; MARTH, E.H. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in
cheese ripening: a review. J.Dairy.Sci. 73 (4) : 859-66, 1990.

- 10 - BITRI, L.; ROLLAND, M.P.; BESANÇON, P. Immunological detection of bovine caseinomacropeptide in ovine and caprine dairy products. Milchwissenschaft 48 (7) : 367-70, 1993.
- 11 - BRANDT, M.J.; LEDFORD, R.A. Influence of milk geration on growth of psychrotrophic pseudomonas. Journal of Food Protection 45 (2) : 132-4, 1982.
- 12 - BRIAND, L.; CHOBERT, J.M.; HAERTLE, T. Tryptic hydrolysis of sterified β -casein and β -lactoglobulin. Milchwissenschaft 49 (7) : 367-71, 1994.
- 13 - BROOME, M.C.; HICKEY, M.W. Peptidase activity of non-starter lactobacilli. Australian J.Dairy.Technology 46 (1) : 19-23, 1991a.
- 14 - BROOME, M.C.; HICKEY, M.W. Proteinase activity of non-starter lactobacilli. The Australian J. Dairy Technology 46 (1) : 12-8, 1991b.
- 15 - BROWN, R.J. Milk coagulation and protein desnaturation. In: WONG, N.P. (Editor). Fundamentals of dairy chemistry. Nova lorque: Van Nostrand Reinhold Company, p.583-607, 1988.
- 16 - CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. Proteinas alimentarias: bioquimica, propiedades funcionales, valor nutricional, modificaciones quimicas. Zaragoza: Ed. Acribia, p.179-216, 1989.
- 17 - CHRISTENSEN, T.M.I.E.; BECH, A.; WERNER, H. Methods for crude fractionation (extraction and precipitation) of nitrogen components in cheese. Bull. I.D.F. 261 : 4-9, 1991.
- 18 - COLLIN, J.C.; KOKELAAR, A.; ROLLET-REPECAUD, O.; DELACROIX- BUCHET, A. Dosage des caseines du lait de vache par eletrophorese et par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (HPLC): comparasion des résultats. Lait 71 (3) : 339-50, 1991.

- 19 - COLLINS, S.J.; BESTER, B.H.; MCGILL, A.E.J. Influence of psychrotrophic bacterial growth in raw milk on the sensory acceptance of UHT skim milk. Journal of Food Protection 56 (5) : 418-58, 1993.
- 20 - DALGLEISH, D.G. Sedimentation of casein micelles during the storage of ultra high temperature milk products - a calculation. J.Dairy.Sci. 75 : 371-9, 1992.
- 21 - DEHARVENG, G.; NIELSEN, S.S. Partial purification and characterization of native plasminogen activators from bovine milk. J.Dairy.Sci. 74 (7) : 2060-72, 1991.
- 22 - FAIRBAIRN, D.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. J.Dairy.Research 53 : 139-77, 1986.
- 23 - FANG, W.; SANDHOLM, M. Inhibition of the proteinase activity in mastitic milk. Journal of Dairy Research 62 : 61-8, 1995.
- 24 - FARKYE, N.Y.; FOX, P.F. Observations on plasmin activity in cheese. Journal of Dairy Research 57 : 413-8, 1990.
- 25 - FARKYE, N.Y.; KIELY, L.J.; ALLSHOUSE, R.D.; KINDSTEDT, P.S. Proteolysis in mozzarella cheese during refrigerated storage. J.Dairy.Sci. 74 (5) : 1433-8, 1991.
- 26 - FARKYE, N.Y.; LANDKAMMER, C.F. Milk plasmin activity influence on cheddar cheese quality during ripening. Journal of Food Science 57 (3) : 622-39, 1992.

- 27 - FARREL Jr, H.M. Physical equilibria: proteins. In: WONG, N.P. (Editor). Fundamentals of dairy chemistry. Nova Iorque: Van Nostrand Reinhold Company, p.461-510, 1988.
- 28 - FERRANTI, P.; MALORNI, A.; NITTI, G.; LAEZZA, P.; PIZZANO, R.; ADDEO, F. Primary structure of ovine α_{S1} - caseins: localization of phosphorylation sites and characterization of genetic variants A, C and D. Journal of Dairy Research 62 : 281-96, 1995.
- 29 - FERRON-BAUMY, C.; MOLLÉ, D.; GARRIC, G.; MAUBOIS, J.L. Characterization of caseinomacropptides released from renneted raw and UHT treated milks. Lait 71 (2) : 156-73, 1992.
- 30 - FOLKERTSMA, B.; FOX, P.F. Use of CD-ninhydrin reagent to assess proteolysis in cheese during ripening. J.Dairy.Research. 59 : 217-24, 1992.
- 31 - FOX, P.F. Exogenous enzymes in dairy technology: a review. Journal of Food Biochemistry 17 : 173-99, 1993.
- 32 - FUKUDA, S.P. Estudo de metodologia quantitativa para determinação espectrofotométrica de ácido siálico em leite. Campinas: UNICAMP, 1992, 142p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.
- 33 - GANDOLFI, I.; PALLA, G.; DELPRATO, L.; MARCHELLI, R.; SALVADORI, C.; D-amino acids in milk related to heat treatments and bacterial activity. Journal of Food Science. 57 (2) : 377-9, 1992.
- 34 - GARCIA, F.G.D.; FOX, P.F. Extracellular proteinases from *Micrococcus* G.F: I- Isolation and characterization. Lait 71 : 371-382, 1991.
- 35 - GASSEM, M.A.; FRANK, J.F. Physical properties of yogurt made from milk treated with proteolytic enzymes. J.Dairy.Sci. 74 (5) : 1503-11, 1991.

- 36 - GOBBETTI, M.; CORSETTI, A. Purification and characterization of intracellular aminopeptidase from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948. J.Dairy.Sci. 78 (1) : 44-54, 1995.
- 37 - GOBBETTI, M.; COSSIGNANI, L.; SIMONETTI, M.S.; DAMIANI, P. Effect of the aminopeptidase from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 on synthetic bitter peptides, bitter hydrolysate of UHT milk proteins and on ripening of Italian Caciotta type cheese. Lait 75 : 169-79, 1995.
- 38 - GOMES, F.P. A estatística moderna na pesquisa agropecuária. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p. 9-44, 1984.
- 39 - GONZALES-LLANO, D.; POLO, C.; RAMOS, M. Update on HPLC and FPLC analysis of nitrogen compounds in dairy products. Lait 70 (3) : 255-77, 1990.
- 40 - HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. 2a. ed; Oxford University Press, 30-38, 1990.
- 41 - HANSEN, A.P.; MELO, T.S. Effect of ultra high temperature steam injection upon constituents of skim milk. J.Dairy.Sci. 60 (9) : 1368-73, 1977.
- 42 - HARRIGAN, W.F.; McCANCE, M.E. Laboratory methods in food and dairy microbiology. London: Academic Press Inc., 1976. 452p.
- 43 - HILL, A.R. Quality of ultra high temperature processed milk. Food Technology. : 92-7, 1988.
- 44 - HUMBERT, G.; ALAIS, C. Review of the progress of dairy science: The milk proteinase system. J.Dairy.Research 46 : 559-71, 1979.

- 45 - HUMBERT, G.; BERBAR, A.; GODBICON, G.; DEAUT, J.Y.; LINDEN, G.
Purification of bovine milk alkaline protease and comparison with purified bovine blood plasminogen or plasmin. Lait 70 (3) : 191-203, 1991.
- 46 - IGARASHI, Y. Enhancement of proteolysis in bovine skim milk by heat and chemical treatments. Journal of Dairy Research 57 : 541-548, 1991.
- 47 - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Inst. Adolfo Lutz. São Paulo, 2^a ed., 1976. 371p.
- 48 - KIM, H.H.; JIMENEZ-FLORES, R. Comparison of milk proteins using preparative isoelectric focusing followed by polyacrylamide gel electrophoresis. J.Dairy.Sci. 77 : 2177-90, 1994.
- 49 - KOCAK, H.R.; ZADOW, J.G. Controlling age gelation of UHT milk additives. The Australian Journal of Dairy Technology 41 : 58-64, 1985b.
- 50 - KOCAK, H.R.; ZADOW, J.G. The effect of low-temperature-inactivation treatment on age gelation of UHT whole milk. The Australian Journal of Dairy Technology 41 : 53-7, 1985a.
- 51 - KOCAK, H.R.; ZADOW, J.G. Polyphosphate variability in the control of age gelation in UHT milk. The Australian Journal of Dairy Technology 41 : 65-8, 1985.
- 52 - KOHLMANN, K.L., NIELSEN, S.S.; LADISCH, M.R. Effects of a low concentration of added plasmin on ultra high temperature processed milk. J.Dairy.Sci. 74 : 1151-6, 1991a.
- 53 - KOHLMANN, K.L.; NIELSEN, S.S.; LADISCH, M.R. Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M 3/6. J.Dairy.Sci. 74 (12) : 4125-36, 1991b.

- 54 - KOHLMANN, K.L.; NIELSEN, S.S.; STENSON, L.R.; LADISCH, M.R.
Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. J.Dairy.Sci. 74
(10) : 3275-83, 1991c.
- 55 - KOJIC, M.; FIRA, D.; BANINA, A.; TOPISIRO, V.C.L. Characterization of the
cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. Applied and
Environmental microbiology 57 (6) : 1753-1757, 1991.
- 56 - KUHN, R.P.; FOEGEDING, E.A. Factors influencing whey protein gel rheology:
dialysis and calcium chelation. J.Food.Sci. 56 (3) : 789-91, 1991.
- 57 - KUMOSINSKI, E.M.; BROWN, E.M.; FARREL Jr, H.M. Three-dimensional
molecular modeling of bovine caseins: α_{S1} -casein. J.Dairy.Sci. 74 (9) :
2889-95, 1991.
- 58 - KUMOSINSKI, T.F.; BROWN, E.M.; FARREL Jr, H.M. Three-dimensional
molecular modeling of bovine caseins: an energy-minimized β -casein
structure. J.Dairy.Sci. 76 (4) : 931-45, 1993.
- 59 - LAW, A.J.R.; HORNE, D.S.; BANKS, J.M.; LEAVER, J. Heat induced changes
in the whey proteins and caseins. Milchwissenschaft 49 (3) : 125-9, 1994.
- 60 - LAW, B. Reviews of progress of dairy science: Enzymes of psychrotrophic
bacteria and their effects on milk and milk products. J.Dairy.Research 46 :
573-88, 1979.
- 61 - LEAVER, J.; TOMSON, G. Influence of heating and cooling on the trypsinolysis
of caseins in bovine milk. Milchwissenschaft 48 (7) : 378-82, 1993.
- 62 - LOPEZ-FANDIÑO, R.; OLANO, A.; SAN JOSÉ, C.; RAMOS, M. Application of
reversed-phase HPLC to the study of proteolysis in UHT milk. Journal of
Dairy Research 60 : 111-6, 1993.

- 63 - LOPEZ-FANDIÑO, R.; ORLANO, A.; CORZO, N.; RAMOS, M. Proteolysis during storage of UHT milk: differences between whole and skim milk. J.Dairy.Sci. 60 (3) : 339-47, 1993.
- 64 - LU, D.D.; NIELSEN, S. Heat inactivation of native plasminogen activators in bovine milk. Journal of Food Science. 58 (5) : 1010-6, 1993.
- 65 - MADKOR, S.A.; FOX, P.F. Plasmin activity in buffalo milk. Food Chemistry. 39: 139-56, 1991.
- 66 - MARTIN, B.; COULON, J.B. Facteurs de production du lait et caractéristiques des fromages. I. Influence des facteurs de production sur l'aptitude à la coagulation des laits de Troupeaux. Lait 75 : 61-80, 1995.
- 67 - McMAHON, D.J.; SAVELLO, P.; BROWN, J.; KALAB, M. Effects of phosphate and citrate on the gelation properties of casein micellar in renneted ultra high temperature (UHT) sterilized concentrated milk. Food Structure 10 : 27-36, 1991.
- 68 - MEISEL, H. Application of fourth derivative spectroscopy to quantification of whey protein and casein in total milk protein. Milchwissenschaft 50 (5) : 247-51, 1995.
- 69 - METHA, R.S. Milk processed at ultra high temperature. A review. Journal of Food Protection 43 (3) : 212-25, 1980
- 70 - MISTRY, V.V.; KOSIKONSKI, F.V. Application of dialysis to measure protease activity in milk. J.Dairy.Sci. 66 (4) : 687-93, 1983.
- 71 - MITTAL, S.B.; HOURIGAN, J.A.; SADOW, J.G. Effect of added sodium hexametaphosphate on certain technological aspects of UHT recombined milk. The Australian Journal of Dairy Technology 45 (1) : 1-4. 1990.

- 72 - MOORE, S; Aminoacid analysis: aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. J.Biol. Chemistry 243 : 6281, 1968.
- 73 - MOTTAR, J. Methods for the determination of the activity of indigenous and bacterial proteinases in milk products : a review. Bull of IDF 209 : 3-41. 1987.
- 74 - MOTTAR, J. Heat resistant enzymes in UHT milk and influence on sensoric changes during incooled storage. Milchwissenschaft 36 (2) : 87-91, 1981.
- 75 - MURPHY, R.W.; SITES, J.W.; BUTH, D.G.; HAUFLER, C.H. Proteins I: Isoenzyme electrophoresis. In: HILLIS, P.M.; MORITZ, G. Molecular systematics. Massachusetts. Sinauer Associates Inc. Publishers, p.45-51, 1990.
- 76 - OTTE, J.; MIDTGAARD, L.; QVIST, K.B. Analysis of caseinomacropeptide (s) by free solution capillary electrophoresis. Milchwissenschaft 50 (2) : 75-79, 1995.
- 77 - PAULSSON, M.; ELOFSSON, U. Thermal denaturation and gelation of β -lactoglobulin and lactoferrin. Milchwissenschaft 49 (10) : 547-51, 1994.
- 78 - PENAGOS, A.M.; PLASENCIA, R.E.; ALVAREZ, J.A.G.; LOPERENA, M.A.R. Influencia de la proteolisis de la leche en los metodos de deteccion de suero de queseria. Alimentaria 20 : 47-9, 1993.
- 79 - PICARD, C.; PLARD, I.; GAICA, D.R.; COLLIN, J.C. Detection of proteolysis in raw milk storage at low temperature by an inhibition ELISA. Journal of Dairy Research 61 : 395-404, 1994.
- 80 - POLITIS, I.; BARBANO, D.M.; GOREWIT, R.C. Distribution of plasminogen and plasmin in fractions of bovine milk. J.Dairy.Sci. 75 : 1402-10, 1992.

- 81 - POLITIS, I.; WHITE, J.H.; ZAVIZION, B.; GOLDBERG, J.J.; GUO, M.R.; KINDSTEDT, P. Effect of individual caseins on plasminogen activation by bovine urokinase-type and tissue-type plasminogen activators. J.Dairy.Sci. 78 (3) : 484-90, 1995.
- 82 - POULIOT, M.; POULIOT, Y.; BRITTEN, M.; MAUBOIS, J.L.; FAUQUANT, J. Study of the dissociation of β -casein from native phosphocaseinate. Lait 74 (5) : 325-32, 1994.
- 83 - PRATA, L.F. Espéctrometria de absorção na região ultravioleta para detecção de atividade proteolítica em leite e derivados. Campinas: UNICAMP, 1991, 114p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.
- 84 - PRATA, L.F., OLIVEIRA, J.S. Absortividade de algumas proteínas para comprimentos de onda selecionados da região ultravioleta. Boletim Ciência Veterinária Jaboticabal 6 (2) ; 7-9, 1991c.
- 85 - PRATA, L.F.; OLIVEIRA, J.S. Comparação da membrana de diálise importada com a membrana nacional (envoltório industrial) na estimação da atividade proteolítica em leite e derivados. Boletim Ciência Veterinária Jaboticabal 5 (2) : 9-10, 1991a.
- 86 - PRATA, L.F.; OLIVEIRA, J.S. Comparação do método de Hull com o método da minidrina na determinação da atividade proteolítica em leite e derivados. Boletim Ciência Veterinária-Jaboticabal 5 (1) : 8-10, 1991b.
- 87 - RAJAGOPAL, S.N.; SANDINE, W.E. Associative growth and Protelysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. J.Dairy.Sci. 73 (4) : 894-9 1990.

- 88 - RECTOR, D.; MATSUDOMI, N.; KINSELLA, J.E. Changes in gelling behavior of whey protein isolate and β -Lactoglobulin during storage: possible mechanisms. J.Food.Sci. 56 (3) : 782-8, 1991.
- 89 - SCHULZ, R. Sistema tetra brik asséptico na conservacao de alimentos longa-vida. In: Seminario em Sistemas UHT Produtos e Tecnologia. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, p.1-14, 1994.
- 90 - SHAMMET, K.M.; BROWN, R.J.; McMAHON, D.J. Proteolytic activity of proteinases on macropeptide isolated from K-casein. J.Dairy.Sci. 75 (6) : 1380-88, 1992a.
- 91 - SHAMMET, K.M.; BROWN, R.J., McMAHON, D.J. Proteolytic activity of some milk clotting enzymes on K-casein. J.Dairy.Sci. 75 (6) : 1373-79, 1992b.
- 92 - SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. Milchwissenschaft 49 (8) : 432-7, 1994.
- 93 - SHARMA, S.K.; MITTAL, G.S.; HILL, A.R. Effect of milk concentration, pH and temperature on κ -casein hydrolysis at aggregation, coagulation and curd cutting times of ultrafiltered milk. Milchwissenschaft 49 (8) : 450-3, 1994.
- 94 - SOUZA, G. Leite longa-vida. Instruções técnicas. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos. 6, 1975. 46p.
- 95 - STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF DAIRY PRODUCTS. American Public Health Association, 13 ed. Washington. 1972, 345p.
- 96 - SWAISGOOD, H.E. Review and update of casein chemistry. J.Dairy.Sci. 76 (10) : 3054-61, 1993a.

- 97 - SWAISGOOD, H.E. Symposium: Genetic perspectives on milk proteins: Comparative studies and nomenclature. J.Dairy.Sci. 76 (10) : 3054-61, 1993b.
- 98 - TURNER, J.D.; HUYNH, H.P. Role of tissue remodeling in mammary epithelial cell proliferation and morphogenesis. J.Dairy.Sci. 74 (8) : 2801-07, 1991.
- 99 - UCEDA, R.; GUILLEN, A.M.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUNEZ, M. Effect of *Pseudomonas fluorescens* growth in the ewe milk on casein breakdown, peptide formation and coagulation characteristics. Milchwissenschaft 48 (11) : 691-22, 1993.
- 100 - VAN EENENNAAM, A.L.; MEDRANO, J.F. Differences in allelic protein expression in the milk of heterogygous κ -casein cows. J.Dairy.Sci. 74 (5) : 1491-6, 1991.
- 101 - VENKATACHALAN, N.; McMAHON, D.J.; SAVELLO, P.A. Role of protein and lactose interactions in the age gelation of ultra high temperature processed concentrated skim milk. J.Dairy.Sci. 76 : 1828-94, 1993.
- 102 - VERDI, R.; BARBANO, D.M. Effect of coagulants, somatic cell enzymes on plasminogen activation. J.Dairy.Sci. 74 : 772-82, 1991.
- 103 - WALSTRA, P.; JENESS, R. Quimica y fisica lactologica. Zaragoza: Ed. Acribia, S.A., 1987. 423p.
- 104 - WHITE, J.H.; ZAVIZION, B.; O'HARE, K.; GILMORE, M.R.G.; POLITIS, I. Distribution of plasminogen activator in different fractions of bovine milk. Journal of Dairy Research 62 : 115-22, 1995.
- 105 - WHITNEY, McL., R. Proteins of milk. In: WONG, N.P. (Editor). Fundamentals of dairy chemistry. Nova Iorque: Van Nostrand Reinhold Company, p.91-169, 1988.

- 106 - YAO, K.; UBUKA, T.; MASOURA, N.; KINUTA, M.; IKEDA, T. Direct determination of bound sialic acids in sialoglycoproteins by acidic ninhydrin reaction. Anal. Biochem. 179 : 332-5, 1989.
- 107 - ZADOW, J.G. The effects of some treatments and storage temperatures on UHT whole milk. The Australian Journal of Dairy Technology 46 (2) : 57-63, 1991.
- 108 - ZIN-EL-DIN, M.; AOKI, T.; KAKO, Y. Polymerization and degradation of casein in UHT milk during storage. Milchwissenschaft 46 (5) : 284-7, 1991.