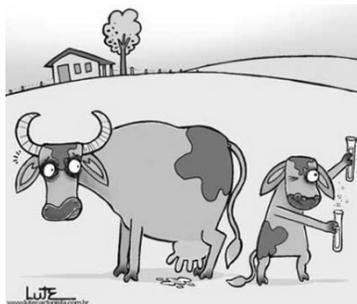


Biodiversidade microbiana de leite e derivados

Prof. Uelinton Pinto
FCF - Universidade de São Paulo
uelintonpinto@usp.br
Crédito: Mariza Landgraf

Tipos de leite

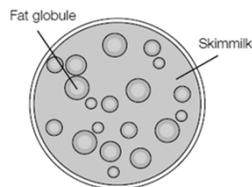
- Leite pasteurizado tipo A (normas específicas de produção)
 - ordenha mecânica
 - × $5 \times 10^2 - 1 \times 10^3$ UFC/mL
- Leite cru refrigerado
 - ordenha mecânica ou manual
 - × $<1 \times 10^5$ UFC/mL (IN62 de 2012, que alterou a IN51 de 2005)
- Regulamentos técnicos de leite tipo B e tipo C foram suprimidos



Características do leite

- Composição do leite

- Água – 87%
- Proteínas – 3,5%
- Gordura – 3,5 a 4,0%
- Lactose – 4%
- pH – 6,5 a 6,8
- Rico em vitaminas e sais minerais



Bom meio para crescimento microbiano, mas não o ideal

Gordura não completamente disponível
 Poucos micro-organismos usam a lactose
 Necessidade de produzir proteases e lipases
 Presença de inibidores naturais
 Elementos traços não necessariamente disponíveis

Composição de produtos lácteos

Table 7.4 Approximate composition, pH, and a_w of selected dairy products^a

Product	Component (g/100 g)				a_w	pH
	Water	Fat	Protein	Carbohydrate		
Butter	16.0	81.0	3.6	0.06		6.3
Cheddar cheese	37.0	32.8	24.9	1.3	0.90-0.95	5.2
Swiss cheese	37.2	27.4	28.4	3.4		5.6
Nonfat dry milk	3.2	0.8	36.2	52.0	0.2	
Evaporated skim milk	79.4	0.2	7.5	11.3	0.93-0.98	
Yogurt	89	1.7	3.5	5.1		4.3

^aCompiled from references 5, 7, 23, and 62.

Disponibilidade de C e N

- Micro-organismos que não utilizam lactose
 - × Proteínas e gorduras como fonte de C e E
- Proteínas
 - × Caseínas
 - × Proteínas do soro
 Contem todos os aminoácidos essenciais para a dieta humana

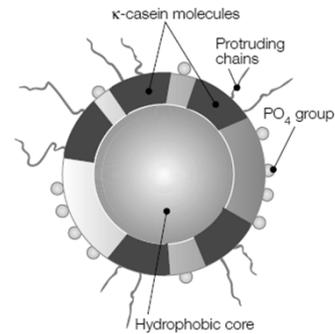
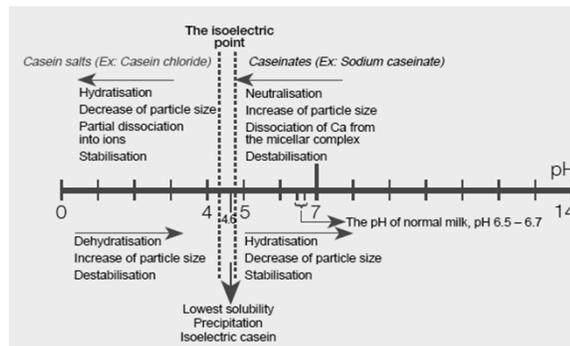


Fig 2.29 Structure of a casein submicelle.



MICROBIOLOGIA DO LEITE

- Inibidores naturais
 - Sistema lactoperoxidase
 - × Lactoperoxidase + tiocianato + H₂O₂
 - Lactoperoxidase + tiocianato SCN⁻
 - Produzidos durante síntese do leite
 - H₂O₂
 - Metabolismo de BAL
 - Fator limitante da reação
 - micro-organismos inibidos
 - Coliformes, BAL, Vários patógenos

Hipotiocianato oxida grupos sulfidrilas de proteínas, inativando enzimas e danificando a estrutura da membrana celular

MICROBIOLOGIA DO LEITE

- Inibidores naturais

- Principais

- × Lactoferrina

- Glicoproteína que se liga ao Fe

- × Sistema lactoperoxidase

- Menos importantes

- × Lizosima

- × Imunoglobulinas, folato e ligantes de vitamina B₁₂



MICROBIOLOGIA DO LEITE

- Leite de excelente qualidade

- 100 a 10.000 bactérias/ mL

- Principais problemas

- contaminação pós ordenha

- temperatura inadequada



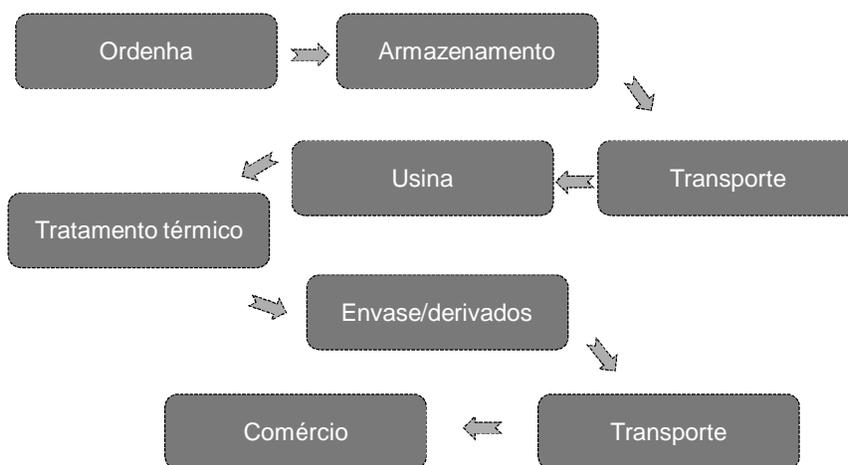
- proliferação microbiana e deterioração do leite cru

- contaminação dos derivados do leite

CUIDADOS NA OBTENÇÃO HIGIÊNICA DO LEITE

- **Início**
 - fonte de produção
- **após ordenha:**
 - resfriamento
 - tratamento térmico:
 - ✦ pasteurização
 - ✦ esterilização
- **Comercialização:** armazenamento sob refrigeração (produtos pasteurizados)

Cadeia de produção



Tratamientos térmicos

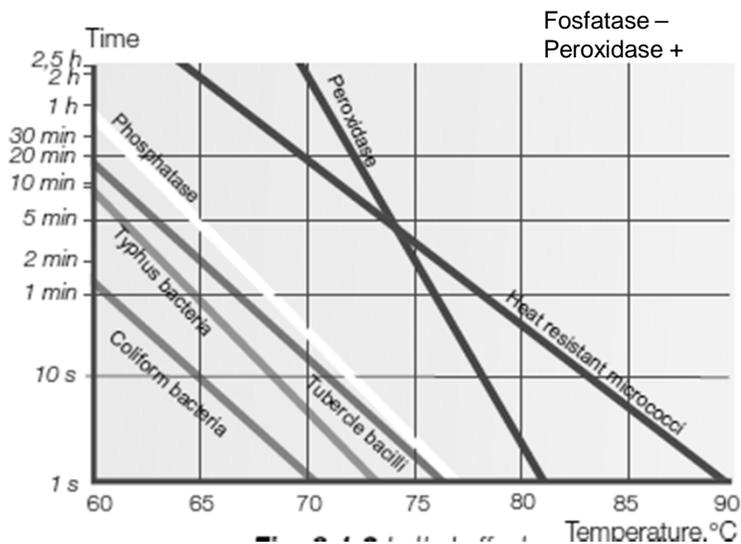
Table 6.1.1

The main categories of heat treatment in the dairy industry

Process	Temperature	Time
Thermisation	63 – 65°C	15 s
LTLT pasteurisation of milk	63°C	30 min
HTST pasteurisation of milk	72 – 75°C	15 – 20 s
HTST pasteurisation of cream etc.	>80°C	1 – 5 s
Ultra pasteurisation	125 – 138°C	2 – 4 s
UHT (flow sterilisation) normally	135 – 140°C	a few seconds
Sterilisation in container	115 – 120°C	20 – 30 min

This reduces the psychrotrophic population significantly and can extend the storage life of the raw milk by several days.

Tratamientos térmicos



Tratamentos térmicos

- Pasteurização
 - destruição *Coxiella burnetti*
 - × lenta
 - 62 – 65 °C/ 30 min
 - × HTST (Alta temperatura tempo curto)
 - 72 – 77 °C/ 15 seg
- Esterilização
 - destruição *Bacillus stearotherophilus*
 - × UHT (*Ultra High Temperature*)
 - 130 – 150 °C/ 2-4 seg
- Psicotróficas - multiplicam entre 5 e 30 °C; ideal entre 5 e 25 °C → Proliferam em leite refrigerado (4 – 7 °C)
- Mesófilas - ideal entre 30 e 35 °C; multiplicam no leite não refrigerado

Efeito da multiplicação



Fontes de contaminação

- Animal

- via interna

- × microbiota natural

- *Lactococcus*

- *Lactobacillus*

- cisterna do teto

- desejáveis

- utilizados na produção de derivados

- × patógenos causadores de mastite

- clínica

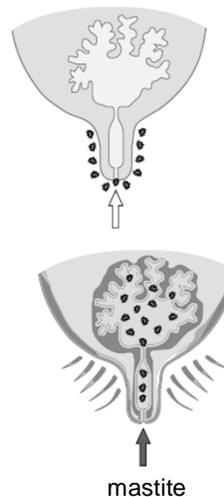
- *Streptococcus* ambientais

- *S. aureus* – coloniza canal do teto

- subclínica

- *Staphylococcus* coagulase negativa ou positiva

- corineformes



Fontes de contaminação

- Animal

- via interna

- × patógenos sistêmicos

- *Mycobacterium bovis*

- *Brucella abortus, melitensis* ou *suis*

- *Listeria monocytogenes*

- *Coxiella burnetti*

- *Toxoplasma gondi*

- *Leptospira* sp

- vírus

- raiva

- febre aftosa

Fontes de contaminação

- Animal

- via externa

- × microbiota do teto

- depende regime criação

- 10^4 UFC/g – teto animais do campo
 - 10^5 a 10^7 UFC/g – teto animais estabulados
 - *Micrococcus*
 - *Staphylococcus* coagulase negativa
 - *Streptococcus fecalis*
 - Gram negativos – cama



Fontes de contaminação

- Animal

- via externa

- × microbiota do teto

- Psicotróficos

- corineiformes e *Bacillus* Gram negativos

- Termodúricos

- Termófilos



Fontes de contaminação

- Microbiota aérea
- *Micrococcus*; Corineformes; esporos de *Bacillus*; *Streptococcus*; *Bacillus* Gram negativos
- Microbiota da água
 - Coliformes; Clostrídios; *Pseudomonas*; *Streptococcus fecalis*; *Bacillus* e esporos; corineforme; bactérias ácido lácticas
- Microbiota do equipamento
 - Latões; ordenhadeiras



Fontes de contaminação

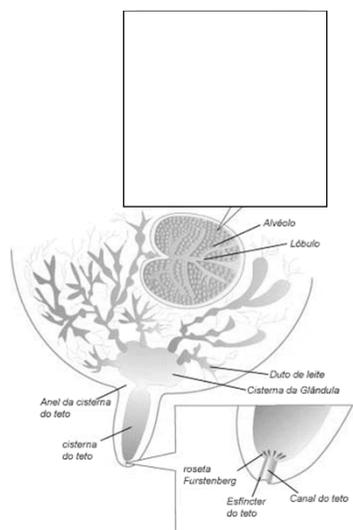
- Homem
 - ordenha manual
 - × *Staphylococcus coagulase negativa*
 - × *S. aureus*
 - × coliformes e causadores de zoonoses
 - ordenha mecânica
 - × menor importância
- A qualidade do leite cru influencia toda a cadeia do leite – derivados
- Processos térmicos do leite têm suas limitações

Bactérias mesófilas

- Leite recém ordenhado
 - temperatura favorece multiplicação (~38 °C)
 - mantém-se muito tempo na faixa entre 20 – 35 °C
 - deterioram rapidamente o leite
- Inclui
 - Bactérias ácido lácticas
 - grupo coliformes

Deterioração por Bactérias ácido lácticas

- Habitam o úbere
- Comensais



Deterioração por Bactérias ácido lácticas

- Fermentam a lactose com produção de ácido láctico
- Muito eficientes
 - deterioram rapidamente o leite cru
- Não são patogênicas
- Têm ação benéfica em processos industriais
 - fermentação

Deterioração por Bactérias ácido lácticas

- Incluem os gêneros
 - *Lactobacillus* → fermentos
 - *Lactococcus* → fermentos
 - *Enterococcus* → origem intestinal
 - *Streptococcus* → causa mastite e processos infecciosos
 - ✦ sem problemas se ingeridos
- Prejuízos no leite cru
 - aumenta acidez
 - em excesso podem causar prejuízos na fabricação do leite
 - ✦ acidez excessiva
 - ✦ queijo quebradiço

Deterioração por bactérias do Grupo coliformes

- Família das enterobactérias
- Incluem gêneros
 - *Enterobacter*
 - *Escherichia*
 - *Serratia, etc*
- Mesófilas
- Origem
 - ambiente
 - Intestino de animais

Deterioração por bactérias do Grupo coliformes

- Fermentam lactose
- Fermentação **ácida mista**
 - produzem diversos metabólitos
 - × ác. fórmico, ác. acético, ác. propiônico, H₂S, entre outros
 - × produzem gases
 - deterioram o leite por acidificação, produção de sabores desagradáveis

Deterioração por bactérias do Grupo coliformes

- Causam perdas na recepção do leite
 - leite ácido
- Podem contaminar o leite pasteurizado e derivados
- Importantes deteriorantes do leite
 - inchaço do queijo
 - queijo 'rendado'
 - queijo quebradiço

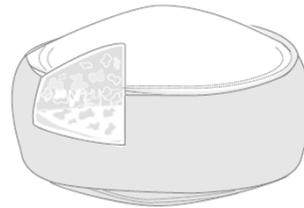


Fig. 4.16 Coliform bacteria can cause great problems in cheesemaking. They emit large volumes of gas, resulting in a blown cheese with a bad taste.

Deterioração por bactérias do Grupo coliformes

- Não têm origem no leite
 - contaminação externa!
 - causam prejuízos
- Família Enterobacteriaceae
 - gêneros patogênicos
 - × *Salmonella*
 - × *Yersinia*
 - × *Shigella*, etc

Grupo coliformes totais

- Crescem a 35 °C com produção de gás pela fermentação da lactose
- Inclui diversos gêneros
- Origem
 - ambiental
- Contagem
 - determina grau de contaminação do leite

Indicador higiênico

Grupo coliformes termotolerantes

- Crescem a 45 °C com produção de gás (fermentação da lactose)
- Espécies
 - *Escherichia coli*
 - *Enterobacter aerogenes*
- Origem
 - Intestino, contaminação por fezes
- Contagem
 - determina grau de sanidade do leite
 - ✖ indica RISCO à saúde

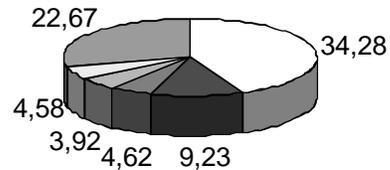
Indicador sanitário

Bactérias psicotróficas

- Grupo heterogêneo

- Origem

- ambiente
 - × solo
 - × equipamentos
 - × áreas refrigeradas



□ *Pseudomonas* □ *Aeromonas*

■ *Serratia*

□ *Klebsiella*

■ *Moraxella*

■ Outros

- Crescem em temperatura de refrigeração

- velocidade de multiplicação é lenta

- Principal gênero

- *Pseudomonas*

PINTO, 2004

Pseudomonas

- Possuem metabolismo

- Proteolítico
 - × degradam proteínas do leite
- lipolítico
 - × degradam gordura do leite
 - × Não conseguem utilizar a lactose
- Características de crescimento
 - × t de geração
 - 8-12 h a 3 °C e 5,5 a 10,5 h a 3 – 5 °C
 - Com 1 célula/mL → 5 dias deterioração

- Sensíveis à pasteurização

- Enzimas proteolíticas e lipolíticas são termorresistentes!

Bactérias psicotróficas

- Corineformes e *Bacillus* Gram negativos
- Proteólise no leite cru
 - diminuem termorresistência das proteínas
 - coagulação do leite UHT estocagem (coagulação doce) ou formação de sedimento
 - leite em pó → problemas na solubilidade
- Pasteurização
 - elimina micro-organismos psicotróficos
 - não destrói suas enzimas

Bactérias psicotróficas

- Prejuízos
 - lipólise
 - × sabor estranho, ranço em leite e derivados
 - proteólise
 - × sabor amargo em queijos
 - dificuldade na coagulação do leite
 - má qualidade do iogurte → dessoragem
 - diminui rendimento do queijo

Bactérias termodúricas

- Resistentes aos processos térmicos
- *Micrococcus, Enterococcus, Alcaligenes, Bacillus e Clostridium*
 - resistem à pasteurização (75 °C/ 15 seg)
 - deteriorantes do leite pasteurizado (principalmente os esporos de certos *Bacillus spp.* psicrotróficos)
- Origem
 - Solo, fezes, água e silagem
- Esporos termodúricos
 - resistem processo UHT – longa vida
- Origem: ambiente; intestino; ração
 - *Bacillus stearothermophilus* – deterioração *flat-sour*

Produção dos derivados

- Evitar contaminação pós tratamento térmico
- Higiene
- BPF
- APPCC

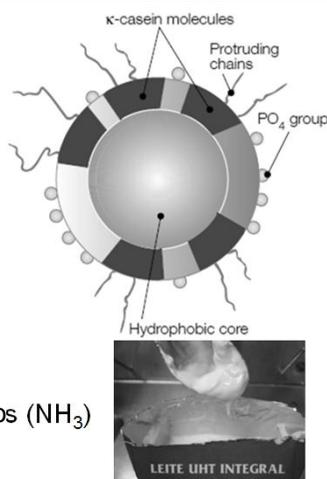


Deterioração Microbiana

- Leite cru
 - Micro-organismos psicotróficos
 - ✕ Produtores de proteases, lipases e outras enzimas hidrolíticas
 - *Pseudomonas* (Incapazes de utilizar a lactose)
 - *P. fluorescens*
 - *P. fragi*
 - *P. putida*
 - *P. lundensis*
 - *Aeromonas*
 - *Staphylococcus*
 - *Enterobacteriaceae*

Deterioração Microbiana

- Leite cru
 - Proteases
 - ✕ Degradação preferencial de kapa caseína
 - Liberação de peptídeos
 - Sabor amargo
 - Estágio mais avançado
 - Compostos nitrogenados não protéicos (NH_3)
 - Flavor pútrido
 - Coagulação
 - Queda no rendimento da fabricação de queijos ⇒ produtos da degradação da proteína ⇒ perdidos para o soro e não se tornam parte do queijo



Deterioração Microbiana

• Leite cru

○ Proteases

✦ Produção

- Precedida pela depleção de
 - Glicose, Galactose, Lactato, Glutamina, Ácido glutâmico

- ✦ pH 4 a 9; Temperatura 20-30C (ativas em refrigeração)

- ✦ Necessidades para atividade: Ion Ca^{+2} (metaloprotease)

Afetam produtos com períodos longos de estocagem como leite UHT:

○ População de psicrotróficos no leite cru

- $10^5 - 10^7$ ufc/ml
- Baixa atividade de protease (armazenamento longo)
- Coagulação
- Formação de sedimento

Alta estabilidade térmica

Tratamento térmico	Protease (%)	Lipase (%)
77°C/17s	72	66
140°C/5s	29	40

Deterioração Microbiana

• Leite cru

○ Lipases

✦ *P. fluorescens*

- T ótima para atividade
- 22 – 70 °C (20 – 40 °C)
- pH
- 7 – 9 (7,5 – 8,5)

- Atividade residual após UHT

- ✦ Ativas a Temperaturas de refrigeração

Ativas em baixa aW

- ✦ Necessidades para atividade: Ion Ca^{+2}

Afetam produtos com períodos longos de estocagem:

UHT, alguns queijos (cheddar – sabor de ranço após 6 meses), manteiga (AG livres C10-C12, ranço menos pronunciado), leite em pó integral (rancidez)

Deterioração Microbiana

- Leite cru
 - Fosfolipase C e protease podem degradar a membrana do glóbulo de gordura ⇒ aumento da atividade lipásica
 - Lipases (ação sobre triglicerídeos)
 - ✦ Defeitos
 - Sabor e odor de ranço (liberação de ácidos graxos C₄ a C₈)
 - Sabor e odor de sabão (ács. graxos com PM maior)
 - Gosto de papelão
 - Acs. graxos insaturados ⇒ oxidados a cetonas e aldeídos
 - Sabor e odor de fruta
 - esterificação de ácidos graxos livres com etOH

Deterioração Microbiana

- Fermentadores não formadores de esporos
 - Produção de ácidos
 - ✦ Ácidos acético e propiônico
 - ✦ mais importante devido ao alto teor de açúcares
 - pH < 4,5: coagulação da caseína
 - 10 - 35 °C *Lactococcus lactis* + coliformes + bactérias lácticas + micrococos
 - 35 - 50 °C *St. thermophilus* + *Lactobacillus bulgaricus*
 - < 10 °C proteólise é mais importante

Deterioração Microbiana

- Fermentadores não formadores de esporos
 - Produtos fermentados
 - ✦ Bactérias lácticas “selvagens”
 - Gás
 - Off flavors
 - Defeitos na aparência
 - Micro-organismos
 - ✦ *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*

Deterioração Microbiana

- Fermentadores não formadores de esporos
 - Produtos
 - ✦ Produtos à base de leite fluido
 - Azedamento (BAL)
 - Sabor de malte
 - *L. lactis*
 - Aldeídos
 - Leite baboso (ropiness/rope)
 - Polímeros extracelulares
 - Cepas de lactococos

Deterioração Microbiana

- Leite pasteurizado refrigerado

- “baboso” (*ropiness*)
 - ✖ más condições de higiene na fazenda
 - Leite cru e pasteurizado
 - Característica:
 - viscosidade e aparência alteradas
 - *Alcaligenes viscolatis*, *Enterobacter aerogenes* e outros
 - *fina camada viscosa na superfície do leite que, quando tocada, desprende um fio viscoso.*



Deterioração Microbiana

- Alterações de cor

- bactérias produtoras de pigmento
 - ✖ vermelho
 - *Serratia*
 - ✖ amarelo
 - *Pseudomonas synxantha*
 - *Flavobacterium*
 - ✖ azul ou verde
 - *Pseudomonas syncyanea*

Deterioração Microbiana

- Manteiga
 - Água 16%
 - ✖ Gordura 81%
 - ✖ Proteína 3,6%
 - ✖ Carboidrato 0,06%
 - ✖ Aw
 - ✖ pH 6,3
 - Alterações de cor: *Pseudomonas*, *Alteromonas*
 - rancificação: psicrotróficas
 - ✖ enzima termo-estável
 - ✖ creme rançoso
 - ✖ atividade lipásica de microrg. presente mesmo à T -10°C
- Creme de leite
 - espuma: *Candida*, *Torulopsis*
- Iogurte
 - pH 4,3
 - amargor: leveduras

Deterioração Microbiana

- Queijos
 - Produção de gás
 - Características
 - produção de espuma na superfície do leite líquido
 - formação de bolhas no interior do coágulo
 - rompimento do coágulo
 - estufamento precoce
 - Frescal
 - *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*
 - Gouda, Prato
 - Contaminação pós-pasteurização do leite

Deterioração Microbiana

• Queijos

- Produção de gás
 - × Estufamento tardio - crateras
 - Fermentação butírica (-300mV)
 - grupo butírico (*Clostridium butyricum*)
 - Produção de ácido butírico (sabor de ranço)
 - Produção de gás – crateras
 - Textura indesejável
 - Não multiplicam bem no leite, mas os esporos podem germinar e multiplicar em alguns queijos
 - × “Vítimas”
 - Duros: Suiço, Parmesão, Reggianito, Provolone
 - Semi-duros: Gouda, Prato, Danbo, etc..

Alguns defeitos em leite fluido resultantes da multiplicação microbiana

Defeito	Microrganismo associado	Produto metabólico
Flavor amargo	Psicotróficos (<i>Bacillus</i>) - proteases	Peptídeos
Flavor ranço	Psicotróficos (lipases)	Ácidos graxos livres
De fruta	Psicotróficos (Lipases)	Ésteres de etila
Coagulação	<i>Bacillus</i> spp (proteases)	Desestabilização da caseína
Azedo	Bactérias lácticas	Ács. Lático e acético
Malte	Bactérias lácticas (oxidase)	3-metil butanal
Viscosidade	Bactérias lácticas	exopolissacarídeo

Alguns defeitos em queijos resultantes da multiplicação microbiana		
Defeito	Microrganismo associado	Produto metabólico
Fissuras, textura aberta	Lactobac. heteroferm.	CO ₂ , H ₂
Gás recente	Coliformes/ leveduras	CO ₂ , H ₂
Gás tardio	<i>Clostridium</i> spp.	CO ₂ , H ₂
Rancidez	Psicrotróficos	Ácidos graxos livres
Fruta	Bactérias lácticas	Ésteres etila
Depósitos cristalinos brancos superficial	<i>Lactobacillus</i> spp.	D-lactato em excesso

Atividade no Tidia

- *Liste os micro-organismos mais comuns da atualidade, envolvidos em surtos veiculados pelo leite e produtos lácteos, com base no texto fornecido.*



Bibliografia

- Frank, J.F. Milk and dairy products. In: Doyle et al. Food microbiology: fundamentals and frontiers. 2nd ed., Washington, DC, ASM., 2007, p.111- 126.
- Montville, T.J.; Matthews, K.R. Food Microbiology 2nd ed. Washington, DC, ASM, 2005. p. 281-288.
- Pinto et al. Qualidade Microbiológica do leite cru. Viçosa, MG: EPAMIG, 2013. 272p.