



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

A microbiota láctea: importância na cadeia laticinista x deterioração

Thiago Luiz Belém Spina, Juliano Gonçalves Pereira, Vanessa Mendonça
Soares, Thiago Braga Izidoro, José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Inspeção Sanitária de Alimentos de Origem Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu

Resumo

O trabalho a seguir aborda criticamente as questões envolvidas no estudo da microbiota do leite. Inicia-se com uma contextualização da atual cadeia laticinista, diante da Instrução Normativa – 51. A seguir são desenvolvidos os conceitos e definições mais relevantes sobre o assunto: a emergência dos microrganismos psicrotróficos, o metabolismo acidificante mesofílico, os prejuízos do resfriamento marginal. Por seguinte, são descritos os principais gêneros que compõe a microbiota láctea, frente ao seguinte questionamento: a partir de que ponto o metabolismo dessas bactérias deixa de ser algo benéfico e passa a caracterizar-se em uma atividade deteriorante ao produto? O trabalho termina, não com conclusões clássicas, ou respostas definitivas; mas sim com questionamentos, apontando linhas de pesquisa que podem fomentar a qualidade do leite brasileiro, tornando-o um produto diferenciado e competitivo no mercado internacional.

Palavras-chave: Deterioração. Instrução Normativa 51. Leite. Microbiota láctea.

Milk microbiota: importance in the dairy chain vs. Deterioration

Abstract

The work below boards critically the issues involved in the study of the microbiota of milk. It starts with a contextualization of the current dairy chain, in the presence of Normative Instruction - 51. Following are developed the most relevant concepts and definitions about the subject: the emergence of psychrotrophic, mesophilic acidifying metabolism, the injuries of marginal cooling. Next, the main genres that comprise the milky microbiota are described, in front of the following question: from what point the metabolism of these bacteria is no longer beneficial and becomes a deteriorating activity to the product? The paper does not end with classical conclusions or definite answers, but with questions, pointing out lines of research that can improve the quality of Brazilian milk, making it a differentiated and competitive product at the international market.

Key-words: Deterioration. Milk. Milk microbiota. Normative instruction 51.

1 Contextualização: Instrução Normativa nº51

Pela definição legal, o leite é, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies animais deve conter o nome da espécie procedente (BRASIL, 1952). Trata-se de um substrato rico em nutrientes, por se tratar de um alimento completo para os recém-nascidos das respectivas espécies. Além de água, é composto por gordura, lactose, proteínas e cinzas. Por conta dessa disponibilidade de nutrientes, associados à alta atividade de água e pH próximo à neutralidade, o leite é um meio extremamente favorável à multiplicação de diversas espécies de bactérias (ARCURI, 2006).

Os microrganismos mais adaptados ao desenvolvimento neste meio se desenvolvem mais intensamente, formando a “microbiota láctea”, em detrimento de outras classes de microrganismos, que inclusive têm seu

desenvolvimento inibido. A multiplicação bacteriana como um todo provoca alterações bioquímicas, que são resultantes de processos glicolíticos, proteolíticos e lipolíticos, dependendo da capacidade metabólica das bactérias presentes. Um leite que sofre processo intenso de proteólise torna-se amargo; já se houver lipólise, há rancificação do leite; se o leite sofrer acidificação, por processos glicolíticos, o sabor ficará azedo (PRATA, 2001). Estes processos deteriorantes tornam o produto insatisfatório para o consumo, o que acarreta prejuízos para cadeia laticinista (LINDBERG, 1997).

Qualquer fator que traga perdas para o setor merece atenção e empenho para revertê-lo, visto que a indústria do leite é um importante gerador de recursos para o país, já que o Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite, atingindo 27 bilhões de litros anuais (ALVIM, 2008). Além disso, a balança comercial de exportação de produtos lácteos vem registrando sucessivos superávits desde 2006. A indústria de leite e derivados é um ramo de elevada importância econômica pela sua marcante participação na cadeia produtiva e pelas ligações que mantém com os demais setores da economia. À medida que este segmento se desenvolve, sua verticalização e sua especialização ampliam-se, agregando mais valor aos produtos elaborados (CARDOSO, 2006). Parece ser um contrasenso, diante da complexidade do assunto, que um dos grandes problemas, que afeta a qualidade do leite produzido no Brasil seja a falta de condições básicas de higiene na obtenção do produto que, associado ao emprego do resfriamento marginal, acarretam a proliferação de microrganismos deteriorantes.

A qualidade microbiológica do leite está diretamente relacionada com a contaminação inicial e com a taxa de multiplicação dos microrganismos. A carga microbiana inicial depende de fatores como saúde da glândula mamária, exterior do úbere, equipamento de ordenha, tanque de resfriamento e qualidade da água. A taxa de multiplicação, por sua vez, depende do binômio tempo-temperatura (NASCIMENTO & SOUZA, 2002).

Com o intuito de promover a melhoria da qualidade do leite, e consequentemente reduzir as perdas causadas por deterioração, foi elaborado

o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (1998), e em complementação, o Ministério da Agricultura publicou, em 2002, a Instrução Normativa nº51 (IN-51).

A IN-51 traz novas diretrizes à produção de leite, regulamentando procedimentos de conservação, coleta e transporte de leite cru refrigerado, independentemente do tipo, que deve ser feito a granel. Nas propriedades, o leite deverá ser refrigerado e atingir a temperatura de 4°C (tanques de expansão) ou 7°C (tanques de imersão), em um período não superior a 3 horas após o término da ordenha. Também é prevista a permissão de tanques resfriadores comunitários, que visa atender pequenos produtores. Caminhões-tanque coletam o leite refrigerado e o encaminham a laticínios para processamento. Na recepção dos laticínios, o leite desses tanques não deverá apresentar temperatura superior a 7°C (para leite B) ou 4°C (para leite C) (BRASIL, 2002).

O resfriamento do leite ainda na propriedade é uma medida válida para reduzir a multiplicação de microrganismos, mas, como se nota, não é solução para o problema quando empregada sem o subsídio de técnicas apropriadas de higiene na obtenção do produto. A evolução da cadeia de produção leiteira no Brasil, e em outros países em desenvolvimento, demonstra que o emprego de tais técnicas adequadas de higiene é de difícil e morosa implantação, visto que questões sócio-econômicas e culturais estão implicadas neste processo.

Além da questão do resfriamento, outra importante alteração prevista pela IN-51, diz respeito ao leite tipo C; até então, o leite cru destinado ao beneficiamento desse tipo de leite pasteurizado não possuía parâmetros microbiológicos específicos. De acordo com as novas normas, esse leite deve ser refrigerado já na propriedade e possuir uma contagem de mesófilos aeróbios máxima de 1×10^6 UFC/mL, objetivo a ser atingido em diferentes prazos de acordo com a localização geográfica da região produtora (BRASIL, 2002).

Nero et al. (2005) concluíram que algumas áreas poderiam enfrentar dificuldades de adequação às normas estabelecidas pela IN-51, já que

resultados obtidos em pesquisa mostraram uma alta frequência de amostras com elevados níveis de contaminação por mesófilos aeróbios. Evidenciaram também que a adoção de resfriamento da produção nas propriedades e a granelização da coleta são importantes medidas para garantir a qualidade microbiológica do leite, como pretendido pelo PNMQL. Entretanto, a adoção isolada dessas medidas não é suficiente para a produção de leite de boa qualidade microbiológica, sendo de grande importância o desenvolvimento de programas regionais de assistência a produtores leiteiros. Portanto, a integração entre produtores, indústria, centros de pesquisa e órgãos fiscalizadores é fundamental para a produção de um leite de qualidade, capaz de concorrer no mercado internacional.

Além dos parâmetros estipulados para os microrganismos mesófilos aeróbios, o PNMQL também preconiza a redução da contagem de células somáticas (CCS). Células somáticas são todas as células presentes no leite, que incluem as células originárias da corrente sanguínea, como leucócitos e células de descamação do epitélio glandular secretor. Os leucócitos, em sua maioria, são mobilizados da corrente sanguínea para o tecido mamário diante de alterações na permeabilidade capilar. O aporte destas células se intensifica na quarta semana pré-parto, diminuindo gradativamente até uma semana pós-parto. Na secreção láctea de vacas com infecção intramamária, ocorre um aumento no número de células de defesa passando a predominar neutrófilos, seguidos por macrófagos e linfócitos, e o número de células epiteliais permanece inalterado (PHILPOT & NICKERSON, 1991).

Quando ocorre aumento da contagem de células somáticas, a composição do leite, a atividade enzimática, a produtividade, o tempo de coagulação e a qualidade dos derivados lácteos são influenciados negativamente. Os níveis de proteína total, por exemplo, sofrem pouca variação, mas a concentração de cada tipo de proteína varia de forma acentuada. Ocorre redução daquelas sintetizadas pela glândula mamária (α e β caseína, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina), e aumento dos níveis de proteínas de origem sanguínea (albumina sérica e imunoglobulinas), devido ao

aumento da permeabilidade vascular que ocorre secundariamente ao processo inflamatório (KITCHEN, 1981). A concentração de lactose e o teor de gordura em leites com aumento de CCS tendem a diminuir. O potássio, mineral predominante no leite, diminui com o dano celular, enquanto que há elevação dos níveis de sódio e cloro, que passam do sangue para o leite (SCHÄELLIBAUM, 2000).

2 Mesófilos x Psicrotróficos

Além da composição do leite, altas contagens de células somáticas também influenciam negativamente a quantidade de bactérias lácteas. Um dos mecanismos que leva a essa redução é a presença de fatores antimicrobianos produzidos pelos leucócitos, que, prolongam o tempo de fermentação em 2 a 4 horas, retardando o abaixamento do pH e, conseqüentemente, prejudicando a qualidade dos produtos lácteos fermentados (LINDMARK-MÅNSSON et al., 2000). A fagocitose promovida pelos leucócitos é um outro meio pela qual as bactérias lácteas se encontram em menor número em leites com alta CCS. Okello-Uma e Marshall (1986) observaram em microscópio a fagocitose de células de *Lactobacillus acidophilus* por leucócitos em leite de CCS alta utilizado para produção de leite fermentado. Os autores concluíram que o microrganismo não produziu ácido eficientemente devido à presença de fatores antimicrobianos que aumentaram a atividade fagocítica dos leucócitos polimorfonucleados presentes no leite de CCS alta.

Os fatores anteriormente descritos corroboram a já estabelecida ideia de que a utilização do resfriamento associada a condições higiênico-sanitárias insatisfatórias na cadeia primária tem um efeito irrisório, ou até negativo, na medida em que fez emergir um grupo de microrganismos caracterizados por seu elevado metabolismo lipo-proteolítico: os microrganismos psicrotróficos (MABBITT, 1980), que podem ser descritos como aqueles capazes de se multiplicar rapidamente em baixas temperaturas, embora seu ótimo metabólico esteja situado em faixas mais elevadas (COUSIN, 1982).

A maior parte dos microrganismos psicrotróficos encontrados no leite são bastonetes gram-negativos, termolábeis, mas também ocorre isolamento de espécies gram-positivas, produtoras de esporos resistentes ao aquecimento. A maioria dos estudos realizados demonstra que o gênero *Pseudomonas* é o mais usualmente encontrado, com destaque a *Pseudomonas fluorescens*, que possui baixa resistência térmica, porém apresenta pronunciada sobrevivência em baixas temperaturas e combinação de atividades proteolítica e lipolítica. Dentre as espécies gram-positivas, é digno de nota o isolamento de psicrotróficos esporulados, como as bactérias do gênero *Bacillus* (COUSIN, 1982). Mas há estudos que relatam que os tipos de microrganismos, e a proporção em que são encontrados, são influenciados por variações climáticas e técnicas utilizadas na ordenha (GARCIA-ARMESTO et al., 1993).

Muitas das espécies psicrotróficas têm capacidade de produzir enzimas extracelulares que são resistentes ao aquecimento, ainda que os microrganismos produtores de tais enzimas não resistam ao tratamento térmico (CHEN, 2003). As proteases são capazes de degradar frações de caseína, desestabilizando as micelas e provocando a sua coagulação, podendo acarretar em geleificação e sabor amargo. As lipases atuam degradando os ácidos graxos saponificáveis do leite, produzindo fortes odores e rancificação (PRATA, 2001). A atividade de tais enzimas extracelulares interfere no processo de coagulação do leite, reduz a produção de derivados, como queijos, além de prejudicar a qualidade e a vida de prateleira (GARCIA-ARMESTO et al., 1993).

Estes processos degradativos são mais acentuados em temperaturas de resfriamento marginal, e um fator que necessita bastante atenção é o emprego incorreto da refrigeração do leite, principalmente em um país como o Brasil, onde as temperaturas médias ao longo do ano ficam acima de 25°C na maioria das regiões. A IN-51 dita que o leite deve ser refrigerado a 4°C, porém quando esta temperatura oscila entre 5°C e 10°C, caracterizando resfriamento marginal, cria-se um ambiente muito favorável à multiplicação de uma microbiota com características mistas (psicrotróficas/mesófilas), com intensa

atividade metabólica tanto lipo-proteolítica quanto acidificante, diminuindo a qualidade do leite e seus derivados (IZIDORO, 2008). Uma das classes de microrganismos presentes nesta faixa de temperatura são os mesófilos, pois apesar de apresentarem temperatura ótima de multiplicação entre 25°C e 40°C, eles podem se multiplicar em temperaturas mais baixas, justamente as que contemplam o resfriamento marginal.

Os mesófilos, uma vez que encontram ambiente favorável à sua multiplicação, são capazes de iniciar um processo de deterioração do leite seja pela fermentação da lactose, processo resultante do metabolismo de bactérias lácticas, como *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, ou então pelo aproveitamento da glicose, processo este, realizado por uma ampla gama de bactérias, especialmente pelas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, como *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, apenas como exemplo.

3 O metabolismo acidificante

Os processos glicolíticos provocam aumento da acidez, pois têm como etapa final a produção de ácido láctico. A primeira fase deste processo é a glicólise, na qual uma molécula de glicose, resultante da quebra da lactose em glicose e galactose, é oxidada produzindo duas moléculas de ácido pirúvico, duas moléculas de ATP e duas moléculas de NADH. Na segunda parte do processo, que é a fermentação láctica propriamente dita, o ácido pirúvico é reduzido pelo hidrogênio transportado pelo NADH, originando o ácido láctico. O acúmulo de ácido láctico provoca, deste modo, uma diminuição do pH do meio, ou seja, a acidificação do leite (BRAVERMAN, 1990).

Há duas vias bioquímicas para a utilização da lactose pelas bactérias lácticas (DE VOS & SIMONS, 1988): o gênero *Lactococcus*, por exemplo, realiza uma rápida fermentação homoláctica através do sistema fosfofenol piruvato-dependente/lactose fosfotransferase, o que resulta na absorção de lactose na célula como lactose-6-fosfato. Esta é hidrolisada pela 6-fosfo-β-D-galactosidase, dando origem a uma molécula de glicose e uma de galactose-6-

fosfato para a subsequente formação de ácido láctico (McKAY et al., 1970), esta característica do gênero *Lactococcus* é utilizada para a produção de culturas starter empregadas para fabricação de queijos.

Em contrapartida, bactérias como *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* acumulam lactose através de uma permease específica, e, em seguida hidrolisa a lactose intracelularmente pela β -galactosidase em glicose e galactose (TINSON et al., 1982), sendo este processo de fermentação empregado na fabricação de iogurtes. A glicose é, então, metabolizada em ácido láctico, enquanto que a galactose (em *Str. Thermophilus*) é normalmente liberada para o meio através de um eficiente sistema de antiporte de galactose-lactose (HUTKINS & PONNE, 1991). Estas duas vias distintas de utilização da lactose possuem duas diferenças fundamentais, relacionadas ao sistema de transporte da lactose, e ao requisito para as diferentes enzimas que hidrolisam a lactose (SMART et al., 1993).

4 Conservação x deterioração

Os mecanismos anteriormente descritos, as vias de fermentação láctica, constituíram-se, originalmente, em uma das mais antigas formas de conservação dos alimentos. As bactérias lácticas são utilizadas há séculos na fabricação de diversos alimentos fermentados, como iogurtes e queijos. Também são utilizados na fabricação de vinhos e silagem. A ação da microbiota láctica na conservação dos alimentos está ligada à redução do pH provocada pela produção de ácido láctico (DROUAULT & CORTIER, 2001).

O gênero *Lactococcus* engloba bactérias lácticas bastante características. Compreende cinco espécies, as quais são divididas em subespécies, sendo o *L. lactis* subsp. *lactis* e o *L. lactis* subsp. *cremoris* as mais comuns deste gênero em produtos lácteos (CASALTA & MONTEL, 2008). São gram-positivas, cocos, que ficam dispostos em pares ou curtas cadeias, e podem apresentar formato ovóide, com 0,5 a 1,5 μm de comprimento. Não produzem esporos e não apresentam motilidade (MADIGAN et al., 2005). Apresentam metabolismo

homoláctico, ou seja, o ácido láctico é o único ou principal produto resultante da fermentação da glicose (JAY, 2005). São de grande importância na fabricação de produtos lácteos, sendo amplamente utilizadas na produção de queijos e manteiga (DESMAZEAUD & ROISSART, 1994).

As bactérias do gênero *Leuconostoc* são pertencentes à família *Leuconostocaceae*, gram-positivas. Assim como *Lactococcus*, apresentam formato ovóide, frequentemente formando cadeias. São catalase-negativas, o que as diferenciam das bactérias do gênero *Staphilococcus*. São imóveis e não produzem esporos (MADIGAN et al., 2005; BJÖRKROTH e HOLZAPFEL, 2006). As espécies de *Leuconostoc* são heterolácticas, isto é, a fermentação láctica produz, além do ácido láctico, etanol e gás carbônico (JAY, 2005).

Os *Lactobacillus* formam outro gênero de bactérias lácticas, que pode inclusive produzir uma série de agentes antibacterianos, denominados bacteriocinas, que são proteínas ou complexos de proteínas com atividade antibiótica e que contribuem na inibição da multiplicação de microbiotas bacterianas indesejáveis. Kovacs-Zomborszky et al. relataram, em 1994, que, após aplicar diretamente no intestino delgado de porcos uma mistura contendo bactérias lácticas, incluindo *Lactobacillus*, ocorreu diminuição do pH intestinal em decorrência do aumento da concentração de ácido láctico, e, paralelamente a isto, houve diminuição da população de *E. coli* no conteúdo intestinal e nas fezes. A imunomodulação é outro aspecto positivo à saúde atribuído a *Lactobacillus* e algumas outras bactérias lácticas, pois estas são capazes de aumentar a quantidade de linfócitos B no sangue (DE SIMONE et al., 1992). Além disso, as bactérias lácticas inibem a adesão de patógenos ao epitélio intestinal, por competição aos sítios de fixação. Um efeito anticarcinogênico também é atribuído às bactérias lácticas, pois alguns autores relatam que, ao alterarem a microflora intestinal, elas inibiriam a produção de certas enzimas carcinogênicas. A quebra de sais biliares realizada por bactérias lácticas é um fator que contribui para a redução do colesterol sérico (DROUAULT & CORTHIER, 2001). Tais efeitos benéficos à saúde humana compreendem um dos motivos pela qual a indústria de lácteos utiliza e divulga amplamente a

presença de *Lactobacillus* em seus produtos, como leites fermentados e iogurtes. Além disso, a presença de bactérias lácticas acidificando o alimento inibe a proliferação de bactérias deteriorantes e prejudiciais à saúde.

Embora as bactérias lácticas sejam muito úteis pelas suas propriedades acidificantes no intestino dos mamíferos, e na fabricação de derivados lácteos, deixam de ser benéficas, quando a acidificação passa a ser um processo descontrolado, deteriorativo. Nessas condições, as bactérias lácticas metabolizam a lactose, tendo como uma de suas etapas a liberação de glicose, que pode ser aproveitada não só pelas bactérias lácticas, como uma continuidade natural do processo, mas também por bactérias fermentadoras de glicose, como as *Enterobacteriaceae*. Desta forma, a acidez do leite resultaria de um sinergismo entre as bactérias naturalmente presentes no leite e bactérias contaminantes.

A contaminação bacteriana do leite pode ter várias fontes, como tetos e equipamentos mal higienizados, além do próprio organismo de uma vaca mastítica (BRAMLEY, 1982). A multiplicação bacteriana acarreta a fermentação e acidificação do leite, e pode levar a uma redução dos componentes nutricionais e imunológicos, pois as imunoglobulinas presentes no leite, que são proteínas, sofrem alterações isoelétricas e danos em sua viabilização funcional pelo aumento da acidez (GALHARDO, 2002; NOVAK & CORDEIRO, 2007). Além das imunoglobulinas, a acidez também desestabiliza partículas solúveis de caseína, promovendo coagulação, e ainda aumenta a osmolaridade, altera o odor e sabor, além de reduzir as propriedades imunológicas, como citado anteriormente. Os carboidratos, que são a fonte energética das bactérias, são transformados em ácido láctico, que é ionizado em meio aquoso, liberando prótons (H^+), desestabilizando a caseína e afetando a disponibilidade de cálcio e fósforo. Conclui-se, desta forma, que quanto maior a produção de ácido láctico, menor a disponibilidade de cálcio e fósforo no leite.

Por fim, a elevação da acidez tem como resultado a alteração de várias propriedades físico-químicas intrínsecas do leite in natura. Um leite ácido tem,

por exemplo, um ponto de congelamento menor, e isto ocorre porque a molécula de lactose, quando fermentada, dá origem a quatro moléculas de ácido láctico, ou seja, o resíduo metabólico de uma bactéria fermentadora de lactose eleva a energia elétrico-cinética do meio, pelo maior número de cargas elétricas disponíveis neste. Logo, um leite muito ácido está eletricamente muito carregado, e necessita uma maior redução da temperatura para congelá-lo. Resumindo: quanto maior a acidez do leite, menor será seu ponto de congelamento (MITCHELL, 1989; PRATA, 2001).

Por outro lado, a baixa acidez também pode implicar indícios de um produto alterado. Em leites com altas contagens de células somáticas, por exemplo, a acidez estará reduzida, mas isso não significa um leite em bom estado de conservação, mas sim um produto que representa um perigo biológico, pela possibilidade de conter agentes causadores da mastite. Além disso, como citado anteriormente, leite com alta CCS tem sua contagem de bactérias lácteas bastante reduzidas por fatores antimicrobianos e fagocitose (OKELLO-UMA & MARSHALL, 1986).

5 Conclusões

Os pontos discutidos nos remetem à complexidade do assunto, sabendo que as condições higiênicas e tecnológicas da produção de leite no Brasil estão distantes do que poderia ser considerado ideal, torna-se urgente um estudo da microbiota láctea em temperaturas de resfriamento marginal de modo a obter um diagnóstico da situação atual das condições que o produto é entregue aos laticínios.

Afinal, a partir de qual temperatura o metabolismo acidificante torna-se predominante?

O aumento de acidez no leite está mais relacionado à sua carga microbiana inicial ou à sua temperatura de estocagem?

Quase 10 anos depois de entrar em vigor, qual e quanto foi o benefício trazido pela IN-51?

IZIDORO, T.B. et al. A microbiota láctea: importância na cadeia laticínista x deterioração. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 23, Ed. 128, Art. 866, 2010.

Nas respostas para essas perguntas residem estratégias para a produção e processamento de um leite seguro, de qualidade e competitivo no mercado internacional.

6 Referências

ALVIM, R. **CNA: produção de leite deve crescer 6% em 2007**. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/?noticiaID=41507&actA=7&areaID=50&secaoID=165>> . Acesso: 21 jun. 2009.

ARCURI, E.F. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.3, p. 460-466, 2006.

BJÖRKROTH, J.; HOLZAPFEL, W. **Genera Leuconostoc, Oenococcus and Weissella**. In: DWORKIN, M. (Ed.). The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: firmicutes, cyanobacteria. 3.ed. New York: Springer-Verlag, 2006. v.4, p.267-319.

BRAMLEY, A.J. Sources of *Streptococcus uberis* in the dairy herd. I. Isolation from bovine faeces and from straw bedding of cattle. **J. Dairy Res.**, v.49, p.369-373, 1982.

BRASIL. Ministério da Agricultura. RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Decreto nº 30.691**, de 29/03/52. Brasília: Ministério da Agricultura, 1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. **Instrução normativa nº. 51**, 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. Brasília, 2002.

BRAVERMAN, J.B.S. **Introducción a la bioquímica de los alimentos**. Cidade do México: Editorial El Manual Moderno, 1990. 358p.

CARDOSO, J.B. **Consequências da ALCA para exportação brasileira de alimentos**. 2006. 110f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CASALTA, E.; MONTEL, M.C. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus. **Int. J. Food Microbiol.**, v.126, p.271-273, 2008.

CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **Int. Dairy J.**, v.13, p.255-275, 2003.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **J. Food Prot.**, v.45, p.172-207, 1982.

DE SIMONE, C.; CIARDI, A.; GRASSI, A.; LAMBERT GARDINI, S.; TZANTZOGLOU, S.; TRINCHERI, V. Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* on gut mucosa and peripheral blood lymphocytes. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v.14, p.331-340, 1992.

IZIDORO, T.B. et al. A microbiota láctea: importância na cadeia laticínista x deterioração. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 23, Ed. 128, Art. 866, 2010.

DE VOS, W.M.; SIMONS, G. Molecular cloning of lactose genes in dairy lactic streptococci: the phospho- β -galactosidase and β -galactosidase genes and their expression products. **Biochimie**, v.70, p.461-473, 1988.

DESMAZEAUD, M.J.; ROISSART, M. **Metabolisme generale de bacteries lactiques**. In: ROISSART, M.; LUQUET, F.M. Bacteries lactiques. Uriage: Lorica, . p.169-204, 1994.

DROUAULT, S.; CORTHIER, G. Health effects of lactic acid bacteria ingested in fermented milk. **Vet. Res.**, v.32, p.101-117, 2001.

GALHARDO, A.L.S.M.; ARAÚJO, W.M.C.; BORGIO, L.A. Acidez dornic como parâmetro de qualidade em bancos de leite humano. **Hig. Aliment.**, v.16, p.16-27, 2002.

GARCÍA-ARMESTO, M.R.; PRIETO, M.; ALONSO, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M.C.; OTERO, A. Numerical taxonomy of psychrotrophic bacteria isolated from raw ewes' milk. **J. Dairy Res.**, v.60, p.371-383, 1993.

HUTKINS, R.W.; PONNE, C. Lactose uptake driven by galactose efflux in *Streptococcus thermophilus*: evidence for a galactose-lactose antiporter. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.57, p.941-944, 1991.

IZIDORO, T.B. **Efeito da multiplicação de microrganismos psicotróficos sobre as características físico-químicas do leite cru**. 2008. 94f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

JAY, J.M. **Microbiologia dos alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712p.

KITCHEN, B.J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **J. Dairy Res.**, v.48, p.167-188, 1981.

KOVACS-ZOMBORSKY, M.; KREIZINGER, F.; GOMBOS, S.; ZOMBORSKY, Z. Data on the effect of the probiotic "Lacto Sacc". **Acta Vet. Hung.**, v.42, p.3-14, 1994.

LINDBERG, A.M.; LJUNGH, A.; AHRNÉ, S.; LOFDAHL, S.; MOLIN, G. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. **J. Food Prot.**, v.54, p.969-979, 1997.

LINDMARK-MÅNSSON, H.; SVENSSON, U.; PAULSSON, M.; ALDÉN, G.; FRANK, B.; JOHNSON, G. Influence of milk components, somatic cells and supplemental zinc on milk processability. **Int. Dairy J.**, v.10, p.423-433, 2000.

MABBITT, L.A. Factors influencing the bacteriological quality of raw milk. The bacterial quality of raw milk: a summary. **Int. Dairy Fed.**, v.120, p.30-31, 1980.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 11.ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2005. 992p.

McKAY, L.; MILLER, A.; SANDINE, W.E.; ELLIKER, P.R. Mechanisms of lactose utilization by lactic acid streptococci: enzymatic and genetic analyses. **J. Bacteriol.**, v.102, p.804-809, 1970.

MITCHELL, G.E. The contribution of lactose, chloride, citrate, and lactic acid to the freezing point of milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.44, p.61-64, 1989.

IZIDORO, T.B. et al. A microbiota láctea: importância na cadeia laticinista x deterioração. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 23, Ed. 128, Art. 866, 2010.

NASCIMENTO, M.S.; SOUZA, P.A. Estudo da correlação linear entre a contagem padrão em placa, a contagem de psicotróficos e a prova da redutase em leite cru resfriado. **Hig. Aliment.**, v.16, n.97, p.81-87, 2002.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.25, p.191-195, 2005.

NOVAK, F.R.; CORDEIRO, D.M.B. The correlation between aerobic mesophilic microorganism counts and Dornic acidity in expressed human breastmilk. **J. Ped.**, v.83, p.87-91, 2007.

OKELLO-UMA, I.; MARSHALL, V.M.E. Influence of mastitis on growth of starter organisms used for the manufacture of fermented milks. **J. Dairy Res.**, v.53, p.631-637, 1986.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. **Mastitis: counter attack. A strategy to combat mastitis**. Illinois: Babson Brothers Co., 1991. 150p.

PRATA, L.F. **Fundamentos da ciência do leite**. Jaboticabal: FUNEP, 2001. 287p.

PROGRAMA NACIONAL DE MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE (PNMQL). Baixa competitividade do leite cru brasileiro. **J. Prod. Leite PDPL/RV**, v.10, n.111, 1998.

SCHÄELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CIETEP/FIEP, 2000. p.21-26.

SMART, J.B.; PILLIDGE, C.J.; GARMAN, J.H. Growth of lactic acid bacteria and bifidobacteria on lactose and lactose-related mono-, di- and trisaccharides and correlation with distribution of β -galactosidase and phospho- β -galactosidase. **J. Dairy Res.**, v.60, p.557-568, 1993.

TINSON, W.; HILLIER, A.J; JAGO, G.R. Metabolism of *Streptococcus thermophilus*: utilization of lactose, glucose and galactose. **Aust. J. Dairy Technol.**, v.37, p.8-13, 1982.