



<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20140018>

Artigo Científico

<http://www.higieneanimal.ufc.br>

Contaminação do leite na ordenha por micro-organismos proteolíticos e lipolíticos

Milk contamination in the milking by proteolytic and lipolytic microorganisms

Nayara Vilarins Moreira¹, Maíke Taís Maziero Montanhini *²

Resumo: A qualidade do leite cru está associada à carga microbiana inicial, sendo a mesma influenciada pelo estado sanitário do rebanho e da higiene dos utensílios. O objetivo deste trabalho foi identificar os principais pontos de contaminação do leite por micro-organismos produtores de enzimas lipolíticas e proteolíticas em cinco propriedades leiteiras. Foram analisadas amostras provenientes de tanques de resfriamento, teteiras, tetos e as mãos do ordenador, com o auxílio de swab's, totalizando 145 pontos de coleta. As amostras foram semeadas em ágar específico para a avaliação das enzimas lipolíticas e proteolíticas. Foi observado que 44,14% das amostras tinham micro-organismos com atividade lipolítica, significativamente mais do que o resultado de amostras com atividade proteolítica (11,03%). Não foi observada diferença significativa ao compararem-se os resultados de atividades enzimáticas entre os pontos de coletas. A falta de higiene no processo de ordenha é a principal causa para a contaminação do leite por micro-organismos produtores de enzimas proteolíticas e lipolíticas.

Palavras-chave: lipase, protease, manejo de ordenha, higiene.

Abstract: The raw milk quality is associated with the initial microbiological load, being this influenced by the sanitary status of the herd and the utensils hygiene. The objective of this study was to identify the main contamination points of milk by microorganisms producers of proteolytic and lipolytic enzymes in five farms. Were analyzed samples from the cooling tank, teat cups, teats, and milkers' hands, using swab's, totalizing 145 sampling points. The samples were plated in specific agar for the production of the evaluated enzymes. We observed that 44.14% of samples had microorganisms with lipolytic activity, significantly more than the result of samples with proteolytic activity. No significant difference was observed when the sampling points were compared. The lack of hygiene during the milking process is the main cause for the development of microorganisms producers of lipolytic and proteolytic enzymes in the raw milk.

¹ Acadêmica de Medicina Veterinária, Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba-PR. E-mail: nayaravilarins@yahoo.com.br

² Doutora em Tecnologia de Alimentos, Professora da Disciplina de Tecnologia de Alimentos, Curso de Medicina Veterinária, Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba-PR. E-mail: maikemaziero@yahoo.com.br
Autor para correspondência. E-Mail: *maikemaziero@yahoo.com.br
Recebido em 10/03/2014. Aceito em 16/06/2014

Keywords: lipase, protease, milking management, hygiene.

1. Introdução

A qualidade do leite cru está associada à carga microbiana inicial, sendo a mesma influenciada pelo estado sanitário do rebanho, manejo dos animais e higienização dos utensílios. Quanto maior a contaminação microbiana inicial e a temperatura de estocagem, menor será o tempo de conservação do produto (SANTANA et al., 2001; LORENZETTI, 2006).

As bactérias são as principais responsáveis pela deterioração do leite, e, entre elas, as bactérias psicrotróficas apresentam uma grande importância, pois possuem a capacidade de se desenvolver em temperatura de refrigeração.

Com o uso prolongado de refrigeração, pode-se gerar uma seleção desse grupo de micro-organismos e o mesmo se torna predominante no leite resfriado, após dois ou três dias de estocagem (COSTA, 2006; MIGUEL et al., 2007).

As bactérias psicrotróficas predominam em condições deficientes de higiene na ordenha, saúde dos animais, do úbere, qualidade d'água e higienização dos materiais de ordenha. Durante a estocagem prolongada do leite, estes micro-organismos podem produzir lipases e proteases, enzimas com forte potencial de degradação dos componentes do leite (CHAMPAGNE et al., 1994; CHEN et al., 2003; NORBERG, 2009).

Durante o processo de pasteurização, a maioria dos micro-organismos psicrotróficos é destruída, porém, as enzimas produzidas e liberadas pelos mesmos apresentam uma alta resistência ao tratamento térmico. Estima-se que cerca de 90% das proteases extracelulares possam ser destruídas à uma temperatura de 72 °C por 4 a 5 horas ou à 120 °C por 7 minutos, porém, estes tratamentos são considerados prejudiciais às características nutricionais do leite (CHEN et al., 2003; MIGUEL et al., 2007).

A localização das enzimas de origem microbiana pode ser intracelular e associada à parede celular (periplasmáticas), ou serem excretadas para o meio extracelular. As enzimas intracelulares e as associadas com a parede celular são liberadas no leite quando ocorre a lise celular das bactérias, após o tratamento térmico (CHEN et al., 2003; LORENZETTI, 2006).

As proteases microbianas atuam sobre a kapa-caseína, sendo esta de extrema importância para a estabilidade da micela de caseína. Sua degradação pode resultar na coagulação do leite de forma semelhante à quimosina, liberando o caseinomacropéptido (CMP) com uma menor especificidade.

A degradação da kapa-caseína, causa sérios problemas ao produto final, como o aparecimento de sabores amargos, aumento da viscosidade do leite, geleificação do leite UHT e, até mesmo, a redução do rendimento da produção de queijos (FAIRBAIRN & LAW, 1986;

KOHLMANN et al., 1991; SILVA, 2005; COSTA, 2006).

A lipólise é resultado da ação das lipases microbianas, enzimas que têm a capacidade de hidrolisar triglicerídeos de cadeia curta ou longa, liberando os ácidos graxos de cadeias mais curtas, como: capróico, caprílico, cáprico e butírico. Estes ácidos graxos, por sua vez, conferem sabor e odor rançosos aos produtos lácteos (HASS, 2001; CHEN et al., 2003). Os ácidos graxos de cadeias mais longas produzem o sabor e odor de sabão. Já os ácidos graxos insaturados liberados durante a lipólise produzem sabor de oxidado ou metálico, pois durante o processo de lipólise a cetona e aldeídos podem ser oxidados (SILVA, 2005; PINTO et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi identificar os pontos de contaminação do leite por micro-organismos lipolíticos e proteolíticos, durante a ordenha em propriedades leiteiras localizadas na região metropolitana de Curitiba-PR.

2. Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado no período entre agosto e setembro de 2013, em cinco propriedades leiteiras no estado do Paraná, sendo uma no município de Piraquara (propriedade 1), três no município de São José dos Pinhais (propriedade 2, 3 e 4) e uma no município de Witmarsum (propriedade 5). As propriedades foram selecionadas com o auxílio da Secretária da Agricultura e Abastecimento do município de São José dos Pinhais.

Foram amostrados 29 pontos em cada propriedade leiteira, como tanque de resfriamento, teteiras, tetos e mãos dos ordenadores, com o auxílio de swab (COPAN), totalizando 145 amostras. As mesmas foram enviadas em caixas isotérmicas e analisadas no laboratório de microbiologia de alimentos da Faculdade Evangélica do Paraná.

Para avaliar a atividade proteolítica, as amostras foram semeadas em ágar leite. O ágar foi preparado com ágar padrão em

placas (PCA) acrescido de 10% de leite desnatado. As placas foram incubadas à 20 °C por três dias. Foram consideradas positivas as colônias que apresentaram halo transparente (MARCY & PRUETT, 2001)

Para a avaliação da atividade lipolítica, as amostras foram semeadas em ágar tributirina, preparado com ágar padrão em placas (PCA) acrescido de 1% de tributirina, sendo as placas incubadas a 20 °C por três dias. Foram consideradas positivas as colônias que apresentaram halo transparente (HASS, 2001).

Os resultados foram tabulados e submetidos ao teste Exato de Fischer, pelo método de qui-quadrado, para verificar diferenças significativas entre as proporções observadas, com 95% de confiabilidade.

3. Resultados e Discussão

A partir dos resultados, observou-se que 44,14% das amostras apresentaram atividade lipolítica, resultado significativamente maior comparado ao

11,03% das amostras que apresentaram atividade proteolítica (Tabela 1). A presença dessas enzimas no leite cru influencia diretamente na qualidade do produto final, pois as mesmas geram alterações de cor e odor no leite, perda da consistência pela formação do coágulo para fabricação de queijos e a geleificação do leite longa vida (SANTANA, 2001; CHEN et al., 2003; NORBERG et al., 2010). Ao avaliar os resultados das atividades lipolíticas, observou-se que as

propriedades 1 e 3 apresentam semelhante proporção entre si ($p>0,05$). Estas, por sua vez, apresentaram menor proporção do que as outras propriedades ($p<0,05$). Com relação aos resultados da atividade proteolítica, a propriedade 3 não apresentou nenhum resultado positivo e a propriedade 1 foi a que apresentou a maior proporção de resultados positivos (27,59%). As outras propriedades obtiveram resultados semelhantes entre si, variando entre 3,45 e 17,24%.

Tabela 1. Avaliação da atividade lipolítica e proteolítica de micro-organismos isolados em salas de ordenha em propriedades leiteiras da região metropolitana de Curitiba-Pr (n=145).

Propriedade	n	Atividade lipolítica	Atividade proteolítica
1	29	3 (10,3%) ^b	8 (27,6%) ^a
2	29	29 (100,0%) ^a	5 (17,2%) ^{ab}
3	29	4 (13,8%) ^b	0 (0,0%) ^c
4	29	14 (48,3%) ^a	2 (6,9%) ^{abc}
5	29	14 (48,3%) ^a	1 (3,5%) ^{abc}
Total	145	64 (44,1%) ^A	16 (11,0%) ^B

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste exato de Fischer ($P<0,05$). Letras maiúsculas no Total indicam diferença significativa pelo teste exato de Fischer ($P<0,05$).

Devido à diferença entre o manejo de ordenha empregado pelos produtores, foi possível observar diferenças significativas entre os resultados obtidos neste estudo. As

propriedades que apresentaram os melhores resultados foram as propriedades 1 e 3, sendo a propriedade 3 a que apresentou menor proporção de atividade

lipolítica e nenhum resultado positivo para atividade proteolítica. Isso é resultado da importância que o produtor dá ao realizar um manejo adequado de ordenha. Na propriedade 3 o mesmo desprezava os três primeiros jatos de leite e, mesmo não realizava o pré-dipping com água clorada, lavava os tetos de cada animal antes de iniciar a ordenha, utilizava papel descartável; ao final de cada ordenha, realiza o pós-dipping. A diferença entre a propriedade 1 e 3 é que, a propriedade 1 não despreza os três primeiros jatos e faz uso de água clorada antes de cada ordenha; a mesma apresentou a maior atividade proteolítica. A qualidade do leite cru é influenciada por múltiplos fatores, entre eles destacam-se o manejo de ordenha, saúde dos animais e da glândula mamária, alimentação, potencial genético e o armazenamento do leite recém-ordenhado (ROSA et al., 2007). O leite pode ser contaminado logo após a ordenha de inúmeras formas: pela superfície do úbere

e tetos, os equipamentos e utensílios de ordenha, e o tanque de resfriamento.

Sendo assim, a sanidade dos animais, a higiene na ordenha, o ambiente onde as vacas são alojadas e os procedimentos de higienização dos equipamentos de ordenha influenciam diretamente na contaminação do leite cru, pois estes micro-organismos estão presentes no ambiente independente da época e estação do ano (SANTANA et al., 2001; SILVA, 2005; GUERREIRO et al., 2005)

Não foi observada diferença significativa ao compararem-se os resultados de atividades enzimáticas entre os pontos de coletas (Tabela 2).

Desta maneira, pode-se inferir que qualquer ponto contribui igualmente a esta contaminação, ou seja, todos os pontos contribuem para que haja uma contaminação do leite cru, devido às condições higiênicas deficientes, com condições favoráveis para a produção das enzimas lipolíticas e proteolíticas.

Tabela 2. Avaliação da atividade lipolítica e proteolítica nos diferentes pontos de coleta na sala de ordenha em propriedades leiteiras da região metropolitana de Curitiba-Pr (n=145).

Pontos de coleta	n	Atividade Lipolítica	Atividade Proteolítica
Tanque de resfriamento	10	5 (50,00%)	0 (0,00%)
Teteiras	75	38 (50,67%)	8 (10,67%)
Tetos	45	17(37,78%)	7 (15,56%)
Mãos dos ordenhadores	15	4 (26,67%)	1 (6,67%)

Não foram observadas diferenças significativas pelo teste exato de Fischer ($P<0,05$).

Os tanques de resfriamento apresentaram 50% de atividade lipolítica e nenhuma atividade proteolítica. Esta alta contaminação pode ser atribuída à deficiência na higienização.

Devido ao espaço de tempo entre uma lavagem e outra com sanitizantes e esponja, o uso de água apenas não elimina os micro-organismos deteriorantes e favorece a atividade lipolítica e proteolítica. Além disso, a presença de água residual nos tanques favorece a presença destes micro-organismos (HASS, 2001).

A contaminação das teteiras pode estar associada às falhas na higienização, envolvendo temperatura e concentração de sanitizantes incorretas ou atraso nas trocas

das borrachas dos copos das teteiras (COSTA, 2006).

Os microrganismos aderem-se à superfície das teteiras e faz deste um ponto de contaminação bacteriana, além da transmissão de doenças aos animais, durante a ordenha (ROSA et al., 2007).

Os tetos apresentaram 37,78% de atividade lipolítica e 15,56% para atividade proteolítica. A adoção da pratica do pré-dipping contribui com a redução de até 80% na contagem bacteriana e de micro-organismos deteriorantes (COSTA, 2006).

Durante o intervalo entre as ordenhas, as vacas se deitam e é neste momento que ocorre uma intensa contaminação da pele dos tetos e do úbere. Por este motivo, é indicado o uso de água

clorada no pré-dipping e não apenas água (SANTANA et al., 2001)

Os ordenadores também foram avaliados, a partir da análise das mãos e as mesmas apresentaram 26,67% para atividade lipolítica e 6,67% para atividade proteolítica. Sem dúvidas, este é um ponto de grande importância, pois a maioria dos ordenadores não higienizam as mãos e os braços de forma eficiente, além de falta de cuidados com higiene pessoal e com suas vestimentas de trabalho.

Há uma necessidade de programas contínuos de educação sanitária e assistência aos produtores, visando a melhoria da qualidade do leite e seus derivados. Não obstante, esta melhoria depende do envolvimento de todos os integrantes da cadeia de laticínios como: produtores, ordenhadores, transportadores, indústria e consumidores.

4. Conclusões

Todos os pontos dentro do sistema de ordenha apresentam a mesma importância quanto ao comprometimento da qualidade

do leite e seus derivados lácteos. As práticas de higiene adotadas durante a ordenha faz com que haja diferenças na qualidade microbiológica do leite produzido entre distintas propriedades leiteiras.

5. Referências Bibliográficas

CHAMPAGNE, C.P.; LAING, R.R.; ROY, D.; MAFU, A.A. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.34, n.1, p.1-30, 1994.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powder. **International Dairy Journal**, v.13, n.40, p.255-275, 2003.

COSTA, F.F. **Interferência de práticas de manejo na Qualidade microbiológica do leite produzido em propriedades rurais familiares**. Jaboticabal-SP, 2006. 80p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, SP, 2006.

FAIRBAIRN, D.J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, v.53, n.1, p.139-177, 1986.

GUERREIRO, K.P.; MACHADO, F.G.M.; BRAGA, C.G.; GASPARINO, E.; FRANZENER, M.A.S. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.1, p.216-222, 2005.

HASS, M. Lipolytic microorganisms. In: DOWNS, F.P.; ITO K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington DC: American Public Health Association, 2001. p.175-181.

LORENZETTI, D.K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul.** Curitiba- PR, 2006. 71p (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, PR, 2006.

KOHLMANN, K.L.; NIELSEN, S.S.; STEENSON, L.R.; LADISCH, M.R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p.3275-3283, 1991.

MARCY, J.A.; PRUETT, W.P. Proteolytic microorganisms. In: DOWNS, F.P.; ITO K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4.ed. Washington DC: American Public Health Association, 2001. p.175-181.

MIGUEL, E.M.; TEODORO, V.A.M.; AHASHIRO, E.K.N. Micro-organismos psicrotróficos em leite. **Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes**, v.62, n.355, p.38-41, 2007.

NORNBERG, M.F.B.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v.37, n.2, p.157-163, 2009.

NORNBERG, M.F.B.L.; FRIEDRICH, R.S.C.; WEISS, R.D.N.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated

from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.1, p. 41-46, 2010.

PINTO, C.L.O; MARTINS M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica do leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.3, p.645-651, 2006.

ROSA, L.S.; QUEIROZ, M.I. Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p.422-430, 2007.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; MORAES, L.B.; GUSMÃO, V.V.; PEREIRA, M.S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. Semina. **Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.145-154, 2001.

SILVA L.D.P. **Avaliação, identificação e atividade enzimática de bactérias**

psicrotróficas presentes no leite cru refrigerado. Natal- RN, 2005. 91p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade do Rio Grande do Norte, RN, 2005.