

EVOLUÇÃO DA PROTEÓLISE DO LEITE INOCULADO *IN VITRO* COM *Pseudomonas fluorescens*

PRISCILA ALONSO DOS SANTOS*
MARCO ANTÔNIO PEREIRA DA SILVA*
GISELLE DO NASCIMENTO MOREIRA**
JULLIANE CARVALHO BARROS***
ANTÔNIO NONATO DE OLIVEIRA****
EDMAR SOARES NICOLAU****

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, visando detectar a proteólise em leite causada por *Pseudomonas fluorescens*. Foram adquiridas cepas liofilizadas de *P. fluorescens* ATCC 13525 do Instituto Adolfo Lutz, Seção de Coleção de Culturas. Após o crescimento das cepas de *P. fluorescens* determinaram-se quantidades que correspondessem a 100.000, 500.000 e 1.000.000 de UFC/mL para ser realizada a inoculação *in vitro* em amostras de leite desnatado reconstituído a 12% (LDR 12%) e esterilizado. Os experimentos de crescimento das cepas de *P. fluorescens* foram conduzidos em alíquotas de 40 mL de LDR 12%, sendo as amostras incubadas a 4°C, 7°C e 10°C em refrigerador. Durante o período de incubação, as amostras foram avaliadas a cada 24 horas até se atingir o período de 120 horas. As amostras também foram submetidas à análise para verificar a presença de caseinomacropéptido (CMP) pela técnica de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência. O crescimento de *P. fluorescens* no leite desnatado reconstituído a 12% não foi significativo nas temperaturas de estocagem de 4, 7 e 10°C, verificando-se significância apenas para o tempo de estocagem. Não foi constatada a presença de CMP nas amostras avaliadas.

PALAVRAS-CHAVE: ATIVIDADE PROTEOLÍTICA; LEITE CRU REFRIGERADO; CASEINOMACROPEPTÍDEO; PSICROTRÓFICOS.

-
- * Professores, Doutores em Higiene e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, Rio Verde, GO, Brasil (e-mail: prialonso@yahoo.com.br; marcotonyrv@yahoo.com.br).
** Engenheira de Alimentos, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brasil (e-mail: gisanmoreira@yahoo.com.br).
*** Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq), Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, Rio Verde, GO, Brasil (e-mail: jullianecarvalho@hotmail.com).
**** Professores, Doutores em Engenharia de Alimentos, Escola de Veterinária, UFG, Goiânia, GO, Brasil (e-mail: nonato@cpa.vet.ufg.br, rena@vet.ufg.br).

1 INTRODUÇÃO

Antes da introdução da refrigeração, a principal microbiota deterioradora do leite e de produtos lácteos era constituída de bactérias mesófilas fermentadoras da lactose, que causam rápida acidificação em leite não refrigerado, principal causa de sua rejeição na plataforma da indústria. O uso da refrigeração associado a períodos mais longos de armazenamento selecionou microbiota deterioradora denominada de psicotrófica (ARCURI, 2003).

A maioria das bactérias psicotróficas não sobrevive à pasteurização, porém suas enzimas podem resistir ao tratamento de ultra alta temperatura (UAT) e permanecerem ativas, pois são termorresistentes (COUSIN e BRAMLEY, 1981). Em função do curto tempo de geração em temperaturas de refrigeração, espécies do gênero *Pseudomonas* spp. representam as bactérias psicotróficas deterioradoras predominantes do leite cru refrigerado, particularmente *Pseudomonas fluorescens*.

Segundo MUIR (1996), o gênero *Pseudomonas* spp. representa em torno de 10% da microbiota total do leite recém obtido. Em leite mantido sob refrigeração, essas bactérias predominam sobre as demais espécies presentes no leite *in natura* e beneficiado.

As proteases e lipases são produzidas principalmente no final da fase exponencial e na fase estacionária de crescimento, sendo a sua síntese maior abaixo da temperatura ótima de crescimento (ARCURI, 2003). ANDERSON (1980) argumentou que *P. fluorescens*, com temperatura ótima de crescimento de 20°C, produziu o máximo de lipase a 8°C. Quantidades relativamente altas de proteases são produzidas em temperaturas de refrigeração (4 a 7°C). As proteases produzidas por microorganismos psicotróficos podem tornar o leite instável ao calor (KOHLMANN *et al.*, 1991), provocando a coagulação durante a pasteurização, a geleificação do leite UAT (LAW, 1979) e o desenvolvimento de vários odores desagradáveis (MCKELLAR, 1981). Também provocam a ocorrência de textura anormal em alguns tipos de queijos e a redução do rendimento na sua produção (STOFER e HICKS, 1983). Se o leite cru for submetido a longos períodos de estocagem sob refrigeração, o controle de psicotróficos na matéria-prima pode ser mais importante do que o realizado após o processamento.

Os problemas resultantes do crescimento de bactérias psicotróficas no leite cru são prevenidos pela sanitização adequada de equipamentos de ordenha e do tanque de refrigeração, seu rápido resfriamento após a ordenha e manutenção em temperatura baixa até o momento do processamento térmico. Também não se deve efetuar a estocagem do leite refrigerado por período de tempo muito longo.

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de *Pseudomonas fluorescens* em amostras de leite desnatado reconstituído a 12% (LDR 12%) e esterilizado, armazenadas nas temperaturas de 4, 7 e 10°C, durante 24, 48, 72, 96 e 120 horas. As amostras foram inoculadas de modo a se obter contagens da ordem de 100.000, 500.000 e 1.000.000 UFC/mL. Posteriormente verificou-se a presença de caseinomacropéptido (CMP) pela técnica de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi estudado no laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

Realizou-se a inoculação *in vitro* de LDR 12% com cepas liofilizadas de *P. fluorescens* ATCC 13525 do Instituto Adolfo Lutz, Seção de Coleção de Culturas. A reidratação das cepas de *P. fluorescens* ocorreu pela adição de 0,5 mL de água destilada esterilizada na ampola da cultura, com o auxílio de pipeta de Pasteur e incubação a 36°C ± 1°C por 18 a 24 horas. As cepas de *P. fluorescens* reidratadas foram transferidas para tubo de ensaio contendo caldo Luria Bertani e incubadas a 36°C ± 1°C por 4 a 6 horas ou até ocorrer turvação do meio. Após a reativação da cultura foram realizadas diluições partindo de 10⁻¹ a 10⁻⁹ e plaqueamento em Ágar Padrão para Contagem (PCA), em duplicata, visando determinar as quantidades de UFC/mL. Depois do crescimento das cepas de *P. fluorescens* foram

determinadas as quantidades correspondentes a 100.000, 500.000 e 1.000.000 UFC/mL para ser realizada a inoculação *in vitro*.

O experimento de crescimento das cepas de *P. fluorescens* foi conduzido com alíquotas de 40 mL de LDR 12%, esterilizadas a 121°C por 15 minutos e inoculadas em duplicata com, aproximadamente, 100.000, 500.000 e 1.000.000 UFC/mL de células ativadas previamente, por duas vezes consecutivas. As amostras foram incubadas estaticamente a 4, 7 e 10°C em refrigerador. Durante o período de incubação, as amostras foram avaliadas a cada 24 horas até se atingirem 120 horas.

2.1 CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS DE MICRO-ORGANISMOS PSICOTRÓFICOS VIÁVEIS

Prepararam-se as diluições pipetando, assepticamente, 25 mL da amostra que foram transferidos para frasco tipo Erlenmeyer, contendo 225 mL de água peptonada 0,1% esterilizada (diluição 10^{-1}). A partir dessa diluição foram preparadas diluições decimais até 10^{-6} , empregando-se o mesmo diluente.

Transferiu-se 1 mL da diluição para placas de Petri (15x100) esterilizadas, sendo adicionados de 15 a 17 mL de ágar padrão para contagem fundido e resfriado entre 43°C e 45°C. Após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas foram incubadas invertidas a 7°C por 10 dias (MARSHALL, 1992). Essas determinações foram realizadas em duplicatas. Utilizou-se contador de colônias em placas com 25 a 250 colônias. Para calcular o número de UFC/mL da amostra multiplicou-se o número de colônias, em cada placa, pelo inverso da diluição inoculada.

2.2 CROMATOGRÁFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA

As amostras de leite contaminadas *in vitro* foram submetidas à análise cromatográfica para verificar a presença de CMP e averiguar a proteólise gerada por *P. fluorescens*.

Para a determinação e quantificação do CMP adotou-se a metodologia oficial do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (BRASIL, 1991). Na determinação do teor de soro, mediante a técnica CLAE, efetuou-se a curva padrão preparada com leite genuíno de procedência conhecida. O leite foi adulterado com soro de leite de composição padrão nas proporções de 5%, 10%, 15% e 20%. Para o preparo da amostra, 22 mL de leite foram tratados com 10 mL da solução de ácido tricloroacético (TCA) a 24%, seguido de incubação a 25°C/60 min em banho-maria (em repouso). Realizaram-se duas filtrações após esse período, a primeira em filtro qualitativo (papel de filtro Whatman nº 40), descartando-se aproximadamente cinco mililitros do filtrado e a segunda em filtro MILLIPORE de 0,45 µm.

Efetuiu-se a determinação cromatográfica mediante injeção de 20 µL do filtrado em cromatógrafo (GILSON 118 UV/VIS), operando com vazão de 1 mL/min e detecção na faixa do ultravioleta/visível (UV-VIS) em comprimento de onda de 205 nm, com a linha de base já devidamente estabilizada.

Usou-se cromatógrafo a líquido (GILSON), com bomba isocrática (GILSON 306), injetor automático ASTED-XL da marca GILSON, looping de 200 µL e coluna Zorbax GF-250 Biosséries da Agilent de 9 mm de diâmetro interno por 250 mm de comprimento. A fase estacionária da coluna foi composta por partículas esféricas de sílica, modificadas na superfície por zircônio estabilizado, enquanto que a fase ligada continha monocamada molecular hidrofílica com diâmetro de poro de 150 Å. Para a separação empregou-se padrão fosfato com pH 6 (1,74 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) p.a., 12,37 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) p.a. e 21,41 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4), dissolvido em 1000 mL de água destilada deionizada).

Construiu-se gráfico de porcentagem de soro “versus” a intensidade do sinal do detector ou altura do pico e calculou-se a equação da reta de regressão com valores de $r \geq 0,95$. Realizou-se a comparação do cromatograma da amostra com o do leite adicionado de soro, identificou-se o pico com o mesmo tempo de retenção do soro e calculou-se a porcentagem de soro na amostra por interpolação da leitura do sinal na reta de regressão do leite adicionado de soro. Segundo o Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, a prova é considerada positiva quando a presença de soro for superior a 1% de acordo com a curva padrão dos picos com o mesmo tempo de retenção do CMP (BRASIL, 1991).

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com os tratamentos distribuídos em esquema fatorial 3x3x5, sendo três níveis de inoculação (100.000, 500.000 e 1.000.000 de UFC/mL), três temperaturas de incubação (4, 7 e 10°C) e cinco tempos de estocagem (24, 48, 72, 96 e 120 horas). Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, com auxílio do programa Statistica 6.0 (STATSOFT, 2001). Foram geradas curvas de regressão linear, calculadas a partir das contagens de *P. fluorescens*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento de *P. fluorescens* em LDR 12% nas temperaturas de 4, 7 e 10°C não foi significativo, sendo considerado para efeito da análise estatística apenas o tempo de estocagem (24, 48, 96 e 120 horas). Os dados não foram consistentes para o armazenamento por 72 horas, sendo seus resultados desconsiderados. O armazenamento do leite por diferentes períodos em temperaturas de 4, 7 e 10°C altera a qualidade do produto, pois quanto maior a temperatura e o período de estocagem pior a qualidade e menor a vida-de-prateleira do leite e seus derivados.

Nas Figuras 1, 2, 3 e 4 estão os resultados obtidos pela análise de regressão para o crescimento de *P. fluorescens* inoculados com 100.000, 500.000 e 1.000.000 de UFC/mL. Pode ser observado em todos os tempos de estocagem que o crescimento de *P. fluorescens* foi significativo.

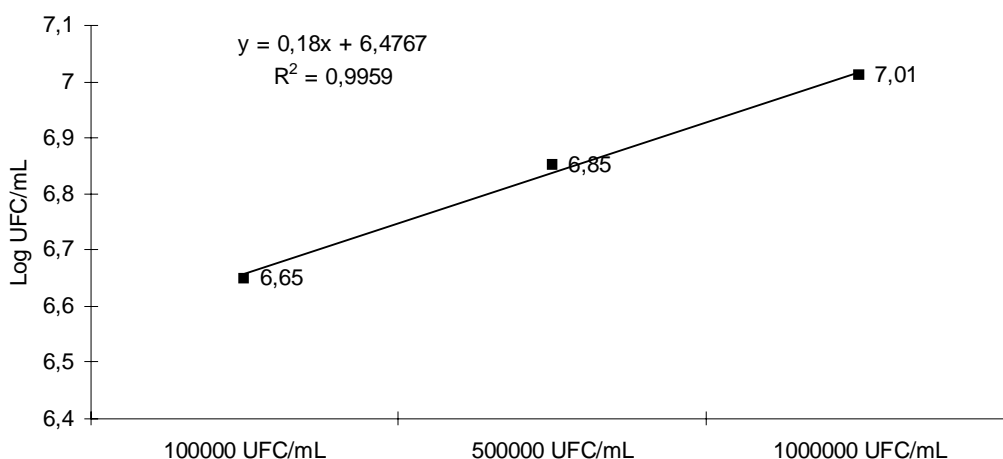


FIGURA 1 – DESENVOLVIMENTO DE *P. fluorescens* COM DIFERENTES NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO E TEMPO DE ESTOCAGEM DE 24 HORAS

Apesar da taxa de crescimento ter sido semelhante nas temperaturas usadas, a população dos microrganismos psicrótrópicos chegou a 10^7 UFC/mL no tempo de armazenamento de 96 e 120 horas para contaminação inicial de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL. Com a contaminação inicial de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL, a população desses micro-organismos ultrapassou 10^7 UFC/mL a partir de 48 horas de estocagem. Para a contaminação inicial de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL, os micro-organismos apresentaram taxa de crescimento semelhante em ambas as temperaturas e atingiram contagens próximas durante o tempo de estocagem, porém na temperatura de 10°C e estocagem por 120 horas a população de micro-organismos foi de 10^8 UFC/mL. Esses resultados reforçam a importância do controle da contaminação inicial da matéria-prima e a necessidade do estabelecimento industrial manter temperaturas inferiores a 10°C com tempo de armazenamento não superior a 48 horas.

HARYANI *et al.* (2003) constataram que o tempo para que a população de bactérias psicrófilas contaminantes naturais do leite atingisse 10^7 UFC/mL foi de dez dias a 2°C , nove dias a 4°C , sete dias a 7°C e de apenas quatro dias a 10°C .

Embora os micro-organismos psicrófilos sejam bastante termolábeis, a estocagem na temperatura de 4°C garante maior qualidade, pois as enzimas desses micro-organismos são termorresistentes e atuam mesmo após a pasteurização (LÜCK, DYNKELD e BERG, 1980).

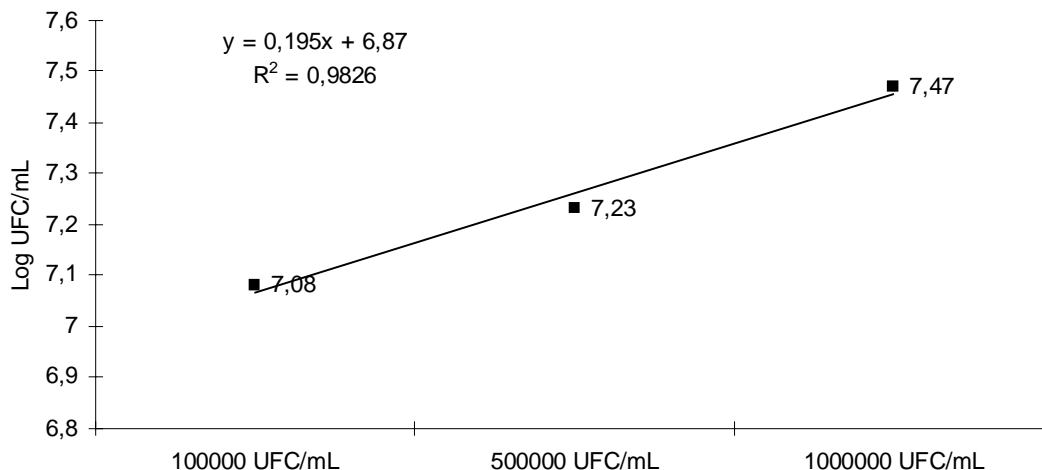


FIGURA 2 – DESENVOLVIMENTO DE *P. fluorescens* COM DIFERENTES NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO E TEMPO DE ESTOCAGEM DE 48 HORAS

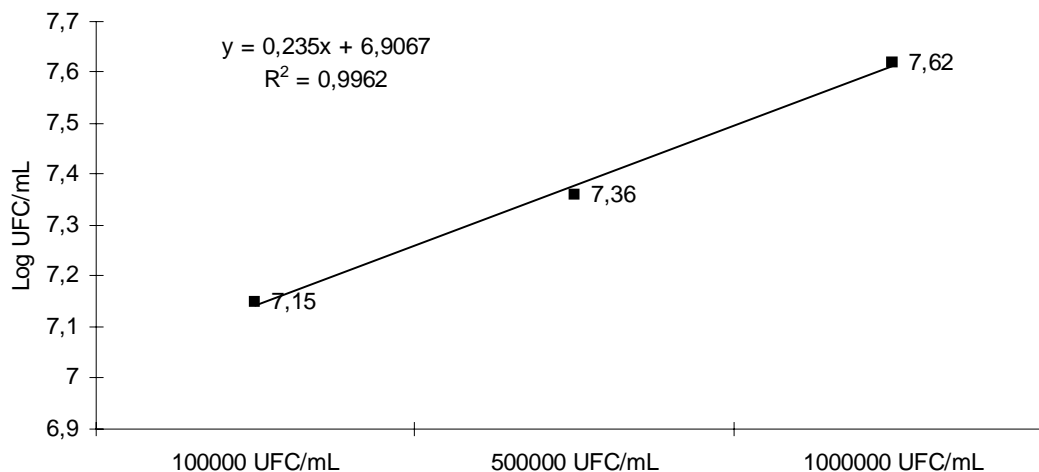


FIGURA 3 – DESENVOLVIMENTO DE *P. fluorescens* COM DIFERENTES NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO E TEMPO DE ESTOCAGEM DE 96 HORAS

JASPE *et al.* (1995) relataram que o gênero *Pseudomonas*, após a incubação em baixas temperaturas (7°C) durante 3 dias, apresenta atividade proteolítica cerca de 1.000 vezes maior, atividade lipolítica cerca de 280 vezes maior e taxa de crescimento de aproximadamente 10 vezes superior que amostras não submetidas a tal período de incubação.

Com relação aos resultados encontrados em cada tratamento, com distintas contaminações e diferentes tempos de armazenamento, apenas a amostra incubada por 96 horas e inoculada com

1,0x10⁶ UFC/mL diferiu das demais. Tal fato indica que a diferença de contaminação pode ter sido pequena (apenas um ciclo logarítmico), sugerindo a necessidade de novos estudos com maiores diferenças de contaminação e outras temperaturas de estocagem.

GRIFFITHS (1989) observou que a atividade de proteases em leite inoculado com bactérias psicrotróficas proteolíticas variou em função da estirpe bacteriana avaliada e da temperatura de incubação. A 2°C constatou baixa ou nenhuma produção de enzimas, confirmando o efeito benéfico da estocagem do leite nessa temperatura.

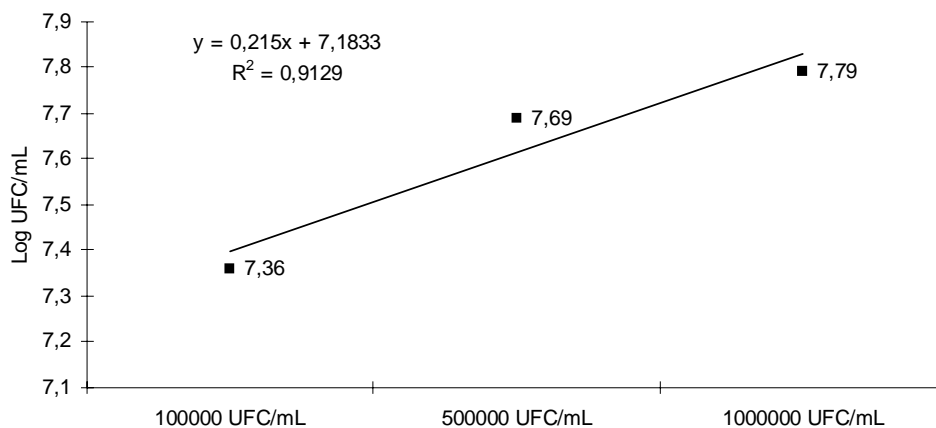


FIGURA 4 – DESENVOLVIMENTO DE *P. fluorescens* COM DIFERENTES NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO E TEMPO DE ESTOCAGEM DE 120 HORAS

De acordo com PINTO *et al.* (2004), durante a estocagem de amostras de LDR 12%, foi possível verificar que o valor de tirosina permaneceu constante até que a contagem bacteriana atingisse 10⁸ UFC/mL, sendo que o aumento no valor de tirosina coincidiu com o início da fase estacionária de crescimento em todas as temperaturas de refrigeração avaliadas (2, 4, 7, 4 10°C).

WIKING *et al.* (2002) e HARYANI *et al.* (2003) detectaram aumento da proteólise após estocagem do leite a 2, 4 e 8°C, mesmo com baixa contagem de bactérias psicrotróficas. Nesses casos, possivelmente, a proteólise estava associada à atividade do sistema plasmina/plasminogênio.

As amostras não apresentaram presença de CMP, denotando que a *P. fluorescens* provavelmente não seja a principal responsável pela proteólise em leite com contaminação inicial menor ou igual a 10⁶UFC/mL. PINTO *et al.* (2004) estudaram a atividade proteolítica e a estabilidade térmica de amostras de leite inoculadas com, aproximadamente, 10⁴ UFC/mL de *P. fluorescens* durante a estocagem a 2, 4, 7 e 10°C. Constataram que as temperaturas de 2°C e 4°C foram efetivas para o controle do crescimento de *P. fluorescens* após 24 horas de incubação. Após 48 horas, a população dessa bactéria foi de aproximadamente 10⁴ UFC/mL a 2°C, 10⁵ UFC/mL a 4°C, 10⁶ UFC/mL a 7°C e de 10⁷ UFC/mL a 10°C. Esses autores afirmaram que mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas pela legislação pode ocorrer a perda de qualidade da matéria-prima se não for realizado controle efetivo da contaminação inicial. Além disso, sabe-se que a temperatura e o tempo de resfriamento são fatores que devem ser considerados para a obtenção de produtos lácteos com alto padrão de qualidade.

4 CONCLUSÃO

O crescimento de *P. fluorescens* nas inoculações de 100.000, 500.000 e 1.000.000 UFC/mL não foi significativo nas temperaturas de estocagem de 4, 7 e 10°C.

Não se verificou a presença de caseinomacropéptido em amostras de leite cru refrigerado estocadas nas temperaturas de 4, 7 e 10°C por 24 a 120 horas.

Estudos posteriores devem ser realizados com a finalidade de esclarecer melhor as alterações ocasionadas pela presença de micro-organismos psicotróficos e psicotróficos proteolíticos em amostras de leite cru refrigerado.

ABSTRACT

EVOLUTION OF PROTEOLYSIS OF MILK INOCULATED *IN VITRO* WITH *Pseudomonas fluorescens*

The present study was carried in the Laboratório de Microbiologia of the Centro de Pesquisa em Alimentos from the Escola de Veterinária of the Universidade Federal de Goiás with the objective of detecting proteolysis in milk caused by the *Pseudomonas fluorescens*. Were acquired strain lyophilized of *P. fluorescens* ATCC 13525 from the Instituto Adolfo Lutz. After the growth of strain of *P. fluorescens*, were determined amounts that corresponded to 100.000, 500.000 and 1.000.000 of UFC/mL, to be carried the inoculation *in vitro* in samples of reconstituted skimmed milk 12% (RSM 12%) and sterilized. The experiments of *P. fluorescens* strain growth were lead in aliquot of 40 mL of RSM 12%. The samples were incubated at 4°C, 7°C and 10°C in refrigerator. During the incubation period the samples were evaluated at each 24 hours, for a 120 hours period. The samples were also analyzed to verify the presence of caseinmacropeptide through high-performance liquid chromatography (HPLC) technique. The growth of *P. fluorescens* in RSM 12% was not significant at the storage temperatures of 4 °C, 7 °C and 10°C interfering only on the storage time. It was not verified the presence of caseinmacropeptide in the evaluated samples.

KEY-WORDS: PROTEOLYTIC ACTIVITY; REFRIGERATED RAW MILK; CASEINMACROPEPTIDE; PSYCHROTROPHIC.

REFERÊNCIAS

- 1 ANDERSON, R.E. Microbial lipolysis at low temperature. **Applied Environmental Microbiology**, v. 39, p. 36 – 40, 1980.
- 2 ARCURI, E.F. Influência de bactérias psicotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. Cap. 10, p. 105 – 115.
- 3 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 124, de 23 de setembro de 1991. Aprova os métodos analíticos qualitativos e quantitativos de detecção de soro em leite. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, p. 20561, 24 set. 1991. Seção I.
- 4 COUSIN, M.A.; BRAMLEY, A.J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology of milk**. London: Applied Science Publishers, 1981. p. 119 – 163.
- 5 GRIFFITHS, M. W. Effect of temperature and milk fat on extracellular enzyme synthesis by psychrotrophic bacteria during growth in milk. **Milchwissenschaft**, v. 44, n. 9, p. 539 – 543, 1989.
- 6 HARYANI, S.; DATTA, N.; ELLIOTT, A.J.; DEETH, H.C. Production of protease by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 1, p. 15 – 20, 2003.
- 7 LAW, B.A. Review of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, p. 573 – 588, 1979.
- 8 JASPE, A.; OVIEDO, P.; FERNANDEZ, L.; PALACIOS, P.; SANJOSE, C. Cooling raw milk: change in the spoilage potential of contaminating *Pseudomonas*. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 915 – 921, 1995.
- 9 KOHLMANN, K.L.; NIELSEN, S.S.; STEENSON, L.R.; LADISCH, M.R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3275 – 3283, 1991.
- 10 LÜCK, H.; DYNKELD, M.; BERG, M.V.D. Shelf life tests on pasteurized milk. **South African Journal of Dairy Technology**, Johannesburg, v. 12, n. 1, p. 107 – 112, 1980.
- 11 MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16th. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1992. 546 p.
- 12 MCKELLAR, R. C. Development of off-flavors in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. **Journal of Dairy Science**, v. 64, n. 11, p. 2138 – 2145, 1981.

- 13 MUIR, D.D. The shelf-life of dairy products: 3 factors influencing intermediate and long life dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 49, n. 3, p. 67 – 72, 1996.
- 14 PINTO, C.L.O. **Bactérias psicotróficas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite uht**. 2004. 97 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG, 2004.
- 15 STATSOFT, Inc. **Statistica (Data Analysis Software System), version 6**. Tulsa, 2001. Disponível em: <<http://www.statsoft.com>>. Acesso em: 10/07/2008.
- 16 STOFER, W.; HICKS, C.L. Pernicious psychrophiles – their effect on cheese yield and composition. **Cultured Dairy Production Journal**, v. 18, p. 11 – 14, 1983.
- 17 WIKING, L.; FRØST, M.B.; LARSEN, L.B.; NIELSEN, J.H. Effects of storage condition on lipolysis, proteolysis and sensory attribute in high quality raw milk. **Milchwissenschaft**, v. 57, n. 4, p. 190 – 194, 2002.