

MICROORGANISMOS PSICOTRÓFICOS LIPOLÍTICOS EM PRODUTOS LÁCTEOS DURANTE O PRAZO COMERCIAL

Lipolytic psychrotrophic microorganisms in dairy products during shelf life

Maike Tais MAZIERO¹

Cibeli VIANA²

Luciano dos Santos BERSOT³

SUMÁRIO

Microorganismos psicotróficos são capazes de se multiplicar a temperatura de refrigeração e podem causar alterações sensoriais em produtos lácteos devido à produção de lipases e/ou proteases. O presente trabalho teve por objetivos avaliar a presença de psicotróficos lipolíticos em produtos lácteos com alto teor de gordura durante o prazo comercial dos mesmos, além de alterações físico-químicas provocadas por lipólise. Dez marcas de produtos lácteos com alto teor de gordura foram analisadas quatro vezes durante o prazo comercial, totalizando 40 amostras. Realizaram-se contagens de microrganismos psicotróficos, psicotróficos lipolíticos, presença *Bacillus* spp., acidez titulável, índice de peróxido, rancidez e atividade lipolítica. As amostras de creme de leite pasteurizado e de requeijão não apresentaram contagens de microrganismos psicotróficos. Duas entre três amostras de manteiga apresentaram psicotróficos, porém, somente uma com regressão linear significativa durante o prazo comercial. *Bacillus* spp. foi encontrado em uma amostra de manteiga, após 60 dias da data de fabricação, com contagem de 100 UFC/g. Não houve regressão linear significativa nas análises de acidez, peróxido e atividade lipolítica durante o prazo comercial para nenhuma das amostras. As amostras de produtos lácteos analisadas apresentaram qualidade microbiológica adequada e não houve sinais de oxidação lipídica durante o prazo comercial normal.

Termos para indexação: lipase; oxidação lipídica; psicotróficos.

1 INTRODUÇÃO

Microorganismos psicotróficos são deteriorantes que apresentam capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração (entre 0 e 7 °C), independentemente da sua temperatura ótima de multiplicação (ALMEIDA et al., 2000; SANTANA et al., 2001; FAIRBAIRN & LAW, 1986; SORHAUG & STEPANIAK, 1997).

A maioria dos psicotróficos é inativada pela pasteurização e/ou processos térmi-

cos mais drásticos, contudo, psicotróficos formadores de esporos do gênero *Bacillus* despertam interesse considerável na pesquisa do processamento de leite, pelo fato de serem também termodúricos e resistirem a estes tratamentos (SORHAUG & STEPANIAK, 1997; COLLINS, 1981, CHEN et al., 2003).

As alterações dos componentes do leite em função da multiplicação dos microrganismos psicotróficos limitam o tempo de prateleira dos produtos lácteos, devido a alte-

1. Doutoranda em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico. Caixa Postal 19011 CEP 81531-990 Curitiba – PR. e-mail: maikemaziero@yahoo.com.br
2. Médica Veterinária, Universidade Federal do Paraná – Campus Palotina, PR. email: cibeli_viana@hotmail.com.
3. Prof. Adjunto I, Curso de Medicina Veterinária, UFPR, Campus Palotina, PR. e-mail: lucianobersot@ufpr.br.

rações no sabor, odor e aparência (SANTOS & FONSECA, 2001; MIGUEL et al., 2007), pela produção de proteases e lipases termorresistentes, que podem continuar atuando nos derivados lácteos mesmo após o a pasteurização rápida (HTST) ou processamento a ultra-alta temperatura (UHT) (ADAMS & BRAWLEY, 1981; ANDERSSON et al., 1979; ADAMS et al., 1975; STEAD, 1986).

As lipases produzidas por psicrotróficos podem causar defeitos sensoriais em sorvetes, manteiga, creme de leite pasteurizado, leite em pó, queijos e produtos UHT (STEAD, 1986; CHEN et al., 2003; ANDERSSON et al., 1981; SORHAUG & STEPANIAK, 1997). A lipólise acarreta a formação de sabores desagradáveis em produtos lácteos devido à hidrólise dos triacilglicerídeos do leite. Após a hidrólise, ácidos graxos de cadeia curta livres, como o ácido butírico, ácido capríco e ácido caprílico conferem gosto forte e picante, já os ácidos graxos de cadeia média, como o ácido cáprico e ácido láurico têm maior participação na formação de "sabor de sabão" (CHEN et al., 2003).

Os efeitos do ranço hidrolítico são facilmente percebidos em produtos como a manteiga, que possui ácidos graxos de cadeia curta em sua composição (ABREU et al., 1976; ARAÚJO, 2004). O creme de leite pasteurizado tem seu potencial deteriorante acentuado devido ao seu alto teor de gordura e pela tendência da lipase microbiana permanecer preferencialmente na fração gordurosa do leite. Em manteiga, a presença de lipases produzidas por *Pseudomonas* spp pode desencadear sua rancidez durante o armazenamento a 5 °C por 2 dias (STEAD, 1986).

O presente trabalho teve por objetivos avaliar a presença de psicrotróficos lipolíticos em produtos lácteos com alto teor de gordura durante o prazo comercial dos mesmos, e as alterações físico-químicas por eles provocadas devido à lipólise.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridos dez tipos de produtos lácteos com alto teor de gordura no

comércio da cidade de Curitiba – PR em junho de 2009, com no máximo sete dias de fabricação, sendo três marcas de creme de leite pasteurizado, três marcas de manteiga e quatro marcas de requeijão. Foram analisadas quatro amostras de cada produto do mesmo lote para cada marca, totalizando 40 amostras. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

As amostras de creme de leite pasteurizado foram avaliadas em intervalos de tempo de sete dias. As amostras de manteiga e requeijão foram analisadas em intervalos de 15 dias. Todas as amostras foram armazenadas em temperatura controlada a 4 °C até o final do experimento.

O prazo de validade é indicado pelas empresas produtoras em função as garantias de conservação dos alimentos oferecidas pelas técnicas de industrialização por elas aplicadas sendo considerado próprio para consumo o alimento que, mantido sob condições adequadas de conservação, preservem suas propriedades nutritivas e não expõe a agravos à saúde da população (BRASIL, 1984). Tendo em vista que o prazo de validade pode variar de acordo com a marca, estabeleceu-se o período de análise de 30 dias para as amostras de creme de leite pasteurizado e 60 dias para as amostras de manteiga e requeijão.

A contagem de microrganismos psicrotróficos foi realizada em ágar padrão (PCA) incubado a 7 °C por 10 dias, conforme Silva et al. (1997). A determinação do caráter lipolítico das colônias isoladas foi feita em ágar tributirina (PCA acrescido de 1% de tributirina), sendo consideradas positivas as colônias com formação de halo (BEERENS & LUQUET, 1990). Três a cinco colônias de cada placa foram submetidas à caracterização morfo-tintorial pela coloração de Gram (BRASIL, 2003).

Bacillus spp foi determinado por plaqueamento seletivo em ágar manitol-gema de ovo-polimixina B (MYP) seguido de incubação a 30 °C por 18-40 horas de acordo com o Bacteriological Analytical Manual (BAM, 2001).

As análises de acidez titulável, índice de peróxidos e rancidez (reação de Kreis), foram realizadas conforme os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos (BRASIL, 2006) a fim de avaliar a ocorrência de oxidação lipídica.

Para a determinação da atividade lipolítica, as amostras foram diluídas em água destilada numa proporção de 1:5. A solução de substrato foi preparada pela adição de 1 mL de p-nitrofenilbutirato (0,02% em isopropanol) a 25 mL de deoxicolato de sódio (4 mg/mL em tampão fosfato, 0,05M, pH 7.8). Aliquotas de 20 µL das amostras foram adicionadas a 2 mL da solução de substrato. Após a incubação em banho-maria a 37 °C por duas horas foram adicionados 2 mL de acetona para clarificar a solução e a absorbância foi medida a 410 nm em espectrofotômetro. Como controle negativo da reação foi utilizado um tubo com o mesmo volume de substrato e acetona. Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir um aumento na absorbância em 0,01 por hora de incubação. O resultado foi expresso em Unidades de Enzimas Lipolíticas - UEL (CARDOSO, 2005).

Todos os resultados foram avaliados comparando-se estatisticamente os valores obtidos para cada produto, nos diferentes intervalos de tempo. Fez-se emprego do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas entre os tempos, com nível de 95% de confiabilidade, utilizando o programa Statistica v.7.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de microrganismos psicotróficos durante o tempo de prateleira dos produtos lácteos avaliados estão apresentados na Tabela 1.

As amostras de creme de leite pasteurizado e de requeijão não apresentaram contagens de microrganismos psicotróficos detectáveis pelo método empregado em nenhuma das amostras analisadas (Tabela 1). A legislação brasileira não prevê limites de microrganismos psicotróficos em produtos lácteos.

Na amostra 4 (manteiga) foram evidenciados microrganismos psicotróficos já na primeira semana com um aumento progressivo até o final do seu prazo comercial, na qual a contagem chegou a $2,4 \times 10^5$ UFC/g. A amostra 5 (manteiga) apresentou psicotróficos nos

Tabela 1. Microrganismos psicotróficos (UFC/g) dos produtos lácteos durante o prazo comercial e regressão

Nº amostra	Produto	Intervalo das Análises*			
		1	2	3	4
1	Creme de leite pasteurizado	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
2	Creme de leite pasteurizado	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
3	Creme de leite pasteurizado	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
4**	Manteiga	4x10 ²	1,7x10 ⁴	1,1x10 ⁵	2,4x10 ⁵
5	Manteiga	<10 ²	2,5x10 ²	1,0x10 ²	<10 ²
6	Manteiga	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
7	Requeijão	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
8	Requeijão	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
9	Requeijão	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
10	Requeijão	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²

* As amostras de creme de leite pasteurizado foram analisadas em intervalos de 7 dias; as amostras de manteiga e requeijão foram avaliadas em intervalos de 15 dias. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, sendo o resultado obtido da média aritmética de duas determinações. ** Variável com regressão linear significativa para o prazo comercial (P<0,05)

tempos 2 e 3, no entanto, esse aumento não foi significativo. A contaminação microbiológica, causada por falhas no processamento e/ou armazenamento, pode causar defeitos na manteiga, associados às suas características organolépticas (sabor, aroma, cor e textura) (AQUARONE et al., 2001).

Apesar da multiplicação dos microrganismos psicotróficos ter apresentado regressão linear significativa ($P < 0,05$) na amostra 4, podemos supor que não houve produção de lipase mesmo ao final do prazo comercial, uma vez que a produção de enzimas por bactérias psicotróficas é máxima na fase de crescimento exponencial ou estacionária, em torno de 10^7 a 10^8 UFC/g (KOHLMANN et al., 1991). Os resultados de acidez (Tabela 2), peróxido (Tabela 3) e rancidez (negativa) indicam que não houve oxidação lipídica durante o período avaliado (60 dias).

Não foram encontrados microrganismos psicotróficos em quantidades significativas nos produtos lácteos analisados. Contudo, inúmeros trabalhos relatam a presença de psicotróficos no leite cru (PINTO et al., 2006; ARCURI et al., 2006; ROSA & QUEIROZ, 2007; ARCURI et al., 2008). Isto pode ser explicado, uma vez que basicamente

todas as bactérias psicotróficas presentes no leite cru (com exceção de *Bacillus* spp) são eliminadas na pasteurização (FAIRBAIRN & LAW, 1986)

A atividade lipolítica das colônias dos microrganismos psicotróficos das amostras 4 e 5 (manteigas) foi de 50% e eram predominantemente formadas por bacilos Gram-negativos. Stead (1986) afirma que os bacilos Gram-negativos são a maioria dos psicotróficos encontrados no leite, sendo o gênero *Pseudomonas* o psicotrófico Gram-negativo predominante (SORHAUG & STEPANIAK, 1997; MIGUEL et al., 2007).

Cardoso (2006) encontrou contagem média de microrganismos psicotróficos lipolíticos de $6,3 \times 10^4$ UFC/g em leite cru utilizado na fabricação de queijo minas frescal em Minas Gerais. Não foram encontrados trabalhos avaliando a presença de psicotróficos lipolíticos em produtos lácteos.

Bacillus spp foi encontrado na amostra 6 (manteiga) na 4ª análise, ou seja, após 60 dias da data de fabricação, sendo a contagem de 100 UFC/g. A colônia isolada não apresentou comportamento lipolítico. Bactérias termorresistentes e psicotróficas podem ser encontradas em pequenas quantidades nos

Tabela 2 – Acidez titulável (% ácido láctico) das amostras de produtos lácteos analisadas durante o prazo comercial dos produtos lácteos

Nº amostra	Produto	Intervalo das Análises*			
		1	2	3	4
1	Creme de leite pasteurizado	0,11 ±0,014	0,11 ±0,021	0,10 ±0,000	0,09 ±0,014
2	Creme de leite pasteurizado	0,12 ±0,028	0,13 ±0,014	0,09 ±0,014	0,10 ±0,028
3	Creme de leite pasteurizado	0,06 ±0,011	0,08 ±0,014	0,06 ±0,007	0,07 ±0,014
4	Manteiga	0,24 ±0,021	0,25 ±0,014	0,24 ±0,014	0,27 ±0,021
5	Manteiga	0,15 ±0,028	0,19 ±0,028	0,15 ±0,014	0,19 ±0,021
6	Manteiga	0,12 ±0,014	0,26 ±0,021	0,13 ±0,007	0,15 ±0,007
7	Requeijão	0,66 ±0,007	0,69 ±0,014	0,70 ±0,014	0,77 ±0,028
8	Requeijão	0,66 ±0,021	0,47 ±0,014	0,59 ±0,028	0,70 ±0,007
9	Requeijão	1,04 ±0,014	0,94 ±0,028	0,90 ±0,014	0,88 ±0,021
10	Requeijão	0,60 ±0,014	0,56 ±0,007	0,56 ±0,021	0,61 ±0,014

* As amostras de creme de leite pasteurizado foram analisadas em intervalos de 7 dias; as amostras de manteiga e requeijão foram avaliadas em intervalos de 15 dias. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, sendo o resultado obtido da média de duas determinações.

produtos lácteos, no entanto, podem causar problemas em produtos refrigerados por um longo período (COLLINS, 1979).

A evolução do índice de acidez titulável das amostras durante o prazo comercial dos produtos lácteos está apresentada na Tabela 2.

Com relação à acidez não houve regressão linear significativa entre os tempos de análise durante o prazo comercial para nenhuma das amostras. Nenhuma das amostras de creme de leite pasteurizado e de manteiga apresentou acidez acima do estabelecido pelo regulamento técnico de identidade e qualidade (RTIQ) do creme de leite pasteurizado (máx. 0,20% ácido láctico) e de manteiga (máx. 0,30% ácido láctico) até o final do prazo comercial (BRASIL, 1996).

Augusta & Santana (1998) avaliaram 66 amostras de manteiga comercializadas no Rio de Janeiro e também não encontraram nenhuma com resultado de acidez titulável acima do estabelecido pela legislação brasileira.

No RTIQ do requeijão não há determinação de limites para acidez titulável, no entanto, a literatura indica que os mesmo apresentam, em média, de 0,56 a 0,60% de ácido láctico (RODRIGUES, 2006). No presente trabalho as médias variaram de 0,47% a 1,04% de ácido láctico.

Na Tabela 3 estão distribuídos os resultados de índice de peróxidos, sendo que somente as amostras de creme de leite pasteurizado apresentaram resultados positivos, mas sem aumento progressivo durante o prazo

comercial. Nenhuma das amostras analisadas apresentou resultado positivo para rancidez (dados não tabulados).

Os resultados de acidez titulável, índice de peróxidos e rancidez indicaram que não houve oxidação lipídica das amostras durante o período analisado.

Em virtude dos resultados obtidos para atividade lipolítica não terem apresentado regressão linear significativa, os resultados obtidos foram tratados em conjunto, por meio de média. As amostras de creme de leite pasteurizado apresentaram média de 99,5, 198,5 e 226,5 UEL para as amostras 1, 2 e 3, respectivamente. As amostras de manteiga apresentaram média de 8,36, 8,71 e 9,95 UEL para as amostras 4, 5 e 6, respectivamente. As amostras de requeijão apresentaram média de 120,2, 109,56, 248,18 e 256,36 UEL para as amostras 7, 8, 9 e 10 respectivamente. Cardoso (2006) encontrou atividade lipolítica de 16,09 UEL em leite cru. São raros os trabalhos que avaliam a atividade lipolítica em produtos processados.

Não houve aumento significativo de atividade lipolítica durante o período de tempo avaliado em nenhuma das amostras. Isto pode ser explicado pelo fato de não ter havido multiplicação de microrganismos psicrotrofos na maioria das amostras. A atividade lipolítica presente nas amostras pode ser devido à lipase de origem microbiana pré-formada no leite cru, antes do processamento dos produtos lácteos, uma vez que esta lipase é termorresistente.

Tabela 3 – Índice de peróxido (mEq/kg) das amostras de produtos lácteos analisadas durante o prazo comercial dos produtos lácteos

Nº amostra	Produto	Intervalo das Análises*			
		1	2	3	4
1	Creme de leite pasteurizado	2,51 ±0,14	2,30 ±0,03	2,79 ±0,18	1,93 ±0,10
2	Creme de leite pasteurizado	3,40 ±0,07	2,56 ±0,14	2,27 ±0,25	1,80 ±0,15
3	Creme de leite pasteurizado	1,79 ±0,05	1,66 ±0,08	1,40 ±0,04	1,39 ±0,29

* As amostras de creme de leite pasteurizado foram analisadas em intervalos de 7 dias; as amostras de manteiga e requeijão foram avaliadas em intervalos de 15 dias. As demais amostras (4 a 10) não apresentaram índice de peróxido em nenhuma das análises realizadas

As amostras de creme de leite pasteurizado, manteiga e requeijão avaliadas no presente trabalho não apresentaram multiplicação de microrganismos psicrotróficos nem aumento na atividade lipolítica durante o prazo comercial. As análises de acidez titulável, índice de peróxido e rancidez indicaram que não houve oxidação lipídica.

4 CONCLUSÃO

As amostras de produtos lácteos apresentaram boa qualidade microbiológica e não tiveram sinais de oxidação lipídica durante o prazo comercial. É possível concluir que o processamento térmico foi suficiente para destruir os microrganismos psicrotróficos durante o processamento tecnológico dos produtos e que as lipases não tiveram uma atuação significativa nos ácidos graxos presentes nos produtos lácteos.

SUMMARY

Psychrotrophics microorganisms are capable of multiplying at refrigeration temperature and can cause sensory changes in dairy products due to lipases and/or proteases production. This study aimed to analyze lipolytic psychrotrophic presence on high fat dairy products during its shelf life and also evaluate the physical-chemical changes caused by lipolysis. Ten brands of dairy products were analyzed four times during its shelf life, totaling 40 samples. Were performed the following analyzes: psychrotrophics microorganisms and lipolytic psychrotrophics counting, *Bacillus spp* presence, acidity, peroxide value, rancidity and lipolytic activity. Milk cream and cream cheese showed no counts of microorganisms psychrotrophic on analyzed samples. Two of three butter samples had psychrotrophic presence, however, just one of them showed a significant linear regression during the shelf life. *Bacillus spp* was found in a sample of butter 60 days after the production date, with a count of 100 CFU/g. There was no significant linear regression in acidity, peroxide and lipolytic activity during the

period of analysis for any sample. Samples of milk products had appropriate microbiological quality and no signs of lipid oxidation during the regular shelf life.

Index terms: lipase; lipid oxidation; psychrotrophic.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L.E.; ALMEIDA, J.P.; BRUM, M.A. Preservação da manteiga. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v.6, n.2, p.121-128, 1976.
- ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. Heat resistant proteases produced by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.58, n.6, p.828-834, 1975.
- ADAMS, D.M.; BRAWLEY, T.G. Heat resistant bacterial lipases and ultra-high temperature sterilization of dairy products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, p.1951-1957, 1981.
- ALMEIDA, I.C.; SANTOS, E.S.; CARVALHO, E.P. Pesquisa de atividade lipolítica e/ou proteolítica em cepas psicrotróficas de *Pseudomonas spp* e *Bacillus spp*. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.71, p.58-60, 2000.
- ANDERSSON, R.E.; DANIELSSON, G.; HEDLUND, C.B.; SVENSSON, S.G. Effect of a heat-resistant microbial lipase on flavor of ultra-high-temperature sterilized milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.6, p.375-379, 1981.
- ANDERSSON, R.E.; HEDLUND, B.; JONSSON, U. Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.62, p.361-367, 1979.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A. **Biotenologia**

- industrial**, volume 4: biotecnologia na produção de alimentos. Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 2001.
- ARAUJO, J.M.A. **Química de alimentos**, 3ª edição. Editora UFV, Viçosa, MG. 478p., 2004.
- ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.3, p.440-446, 2006.
- ARCURI, E.F.; SILVA, P.D.L.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; LANGE, C.C.; MAGALHÃES, M.M.A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.8, p.2250-2255, 2008.
- AUGUSTA, I.M., SANTANA, D.M.N. Avaliação da qualidade de manteigas tipo extra comercializadas no Estado do Rio de Janeiro. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas, v.18, n.4, 1998.
- BAM, **Bacteriological analytical manual**. Chapter 12: *Bacillus cereus*, 2001. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071363>, acesso em 25/04/2010.
- BEERENS, H.; LUQUET, F.M. **Guía práctica para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos**. Editorial Acríbia S.A. Zaragoza, 141p., 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Portaria 146**, Brasília, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Leite e Produtos Lácteos. **Instrução Normativa 68**, Brasília, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Instrução Normativa 62**, Brasília, 2003.
- BRASIL. Dispõe sobre instruções para conservação nas fases de transporte, comercialização e consumo dos alimentos perecíveis, industrializados ou beneficiados, acondicionados em embalagens. **Resolução CISA/MA/MS nº 10**, Brasília, 1984.
- CARDOSO, R.R. Influência da microbiota psicotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Viçosa – MG. 2006.
- CHEN, L.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, p.255-275, 2003.
- COLLINS, E.B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.64, p.157-160, 1981.
- FAIRBAIRN, D.J.; LAW, B.A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.53, p.139-177, 1986.
- KOHLMANN, K.L.; NIELSEN, S.S.; STEENSON, L.R.; LADISCH, M.R. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, p.3275-3283, 1991.

- MIGUEL, E.M.; TEODORO, V.A.M.; AHASHIRO, E.K.N. Microrganismos psicrotróficos em leite. **Revista do Instituto de laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.62, n.355, p.38-41, 2007.
- MOSSEL, D.A.A.; KOOPMAN, M.J.; JONGERIUS, E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Applied Microbiology**, Bethesda, v.15, n.3, p.650-653, 1967.
- PINTO, C.J.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.3, p.645-651, 2006.
- RODRIGUES, F. **Requeijão, fondue, especialidade, queijo processado**. Juiz de Fora, 171p., 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**, Campinas, 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**, Londrina, v.22, n.2, p.145-154, 2001.
- SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.82, p.13-19, 2001.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo. Varela. 1997.
- SORENSEN, C.M. The keeping quality of butter. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.23, p.2423-436, 1940.
- SORHAUG, T.; STEPANIAC, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends of Food Science and Technology** v.8, p.35-41, 1997.
- STEAD, D. Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. **Journal of Dairy Research**, Champaign, v.53, p.481-505, 1986.