ALTERAÇÕES NA QUALIDADE DO LEITE PASTEURIZADO PELA AÇÃO DE LIPASE MICROBIANA

MARIA ISABEL FRANCHI VASCONCELOS GOMES
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof.Dr. JOÃO GUSTAVO BRASIL CARUSO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1988

G633a Gomes, Maria Isabel Franchi Vasconcelos
Alterações na qualidade do leite pasteurizado
pela ação de lipase microbiana. Piracicaba, 1988.
85p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Leite pasteurizado - Bioquímica 2. Leite
pasteurizado - Microbiologia 3. Leite pasteurizaa
do - Qualidade - Alteração 4. Lipase microbiana
em leite pasteurizado I. Escola Superior de Agric
ultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 637.1277

ALTERAÇÕES NA QUALIDADE DO LEITE PASTEURIZADO PELA AÇÃO DE LIPASE MICROBIANA

MARIA ISABEL FRANCHI VASCONCELOS GOMES

Aprovada em: 24.04.1989

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Gustavo Brasil Caruso	ESALQ/USP
--------------------------------------	-----------

Prof. Dr. Paulo Roberto Cantarelli	ESALQ/USP
------------------------------------	-----------

Prof. Dr. Ismael Antonio Bonassi	FCA/UNESP
----------------------------------	-----------

Prof. Dr. JOÃO GUSTAVO BRASIL CARUSO

Orientador

Ao *José Carlos*, que muito contribuiu para
tudo o que sou neste momento,

D E D I C O

À vocês que estiveram presentes auxiliando de alguma forma na elaboração deste trabalho,

A G R A D E Ç O

S U M Á R I O

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Lipólise natural	5
2.2. Lipólise microbiana e microrganismos psicrotróficos	8
2.3. Especificidade das lipases microbia- nas	26
2.4. Mecanismos de avaliação da lipólise	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Matéria prima	30
3.1.1. Amostragem	30
3.1.2. Caracterização da matéria pri ma	31
3.1.2.1. Teor de gordura	31
3.1.2.2. Acidez titulável	31
3.1.2.3. Densidade	31

3.1.2.4. Ácidos graxos livres totais	32
3.1.2.5. Contagem total dos microrganismos psicrótró- ficos	32
3.1.2.6. Contagem dos microrganismos lipolíticos	33
3.1.2.7. Contagem de <i>Pseudomonas</i> <i>sp</i>	33
3.2. Armazenagem do leite sob refrigeração	33
3.2.1. Temperatura e tempo	33
3.2.2. Análises do leite armazenado sob refrigeração	34
3.3. Análise estatística	34
4. RESULTADOS	36
4.1. Matéria prima	36
4.2. Leite armazenado sob refrigeração	40
5. CONCLUSÕES	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICE	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 1)	51
FIGURA 2 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 2)	52
FIGURA 3 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 3)	53
FIGURA 4 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 4)	54
FIGURA 5 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 5)	55
FIGURA 6 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 6)	56
FIGURA 7 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 7)	57
FIGURA 8 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 8)	58
FIGURA 9 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 9)	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Caracterização do leite utilizado como matéria prima no experimento	37
TABELA 2 - Número médio de microrganismos psicro- tróficos (ufc/ml)	41
TABELA 3 - Número médio de microrganismos lipolí- ticos (ufc/ml)	42
TABELA 4 - Número médio de <i>Pseudomonas</i> sp (ufc/ml) ...	44
TABELA 5 - Ácidos graxos livres totais (ueq/ml)	48
TABELA 6 - Coeficiente de correlação (r) entre <u>áci</u> dos graxos livres e microrganismos	60

ALTERAÇÕES NA QUALIDADE DO LEITE PASTEURIZADO PELA AÇÃO DE LIPASE MICROBIANA

Autora: MARIA ISABEL FRANCHI VASCONCELOS GOMES

Orientador: PROF. Dr. JOÃO GUSTAVO BRASIL CARUSO

RESUMO

Leite pasteurizado, padronizado a 3% de gordura, adquirido em Botucatu, foi transferido assepticamente para um recipiente esterilizado e armazenado a 10°C durante 10 dias. Foram realizadas análises microbiológicas e determinação de ácidos graxos livres (AGL) a cada 48 horas, com o propósito de relacionar o teor de AGL e as contagens de psicrotróficos, lipolíticos e *Pseudomonas sp.*

As amostras (9) foram coletadas a cada 20 dias, durante o período de março a agosto. Em 7 dos 9 experimentos realizados, as contagens de psicrotróficos e lipolíticos atingiram ou ultrapassaram o valor de 10^6 ufc/ml no 4º dia. A contagem de *Pseudomonas sp* atingiu 10^6 ufc/ml a partir do 4º dia em 4 experimentos, nos outros esse valor foi alcançado ou superado no 6º dia. Os valores de AGL excederam 1,3 ueq/ml ao 6º dia em 7 experimentos e nos outros 2, o mesmo valor foi observado no 4º e 8º dias de armazena-

gem.

Observou-se uma correlação positiva e alta mente significativa entre o aumento populacional dos três grupos microbianos e a concentração de AGL no leite. Nossos resultados indicam que o leite pasteurizado armazenado a 10°C permanece com níveis aceitáveis de lipólise até o 4º dia.

ALTERATIONS IN THE QUALITY OF PASTEURIZED MILK BY MICROBIAL LIPASE ACTION

Author: MARIA ISABEL FRANCHI VASCONCELOS GOMES

Adviser: PROF. DR. JOÃO GUSTAVO BRASIL CARUSO

SUMMARY

Standardized and pasteurized milk, containing 3% of fat, acquired in Botucatu, was aseptically transferred to a sterilized container and stored at 10°C incubator during 10 days. Microbiological analysis and free fat acids (FFA) determinations were proceeded each 48 hours in order to make correlations among the FFA grade and the psychrotrophic, lipolytic, and *Pseudomonas* counts. The samples (9) were collected each 20 days throughout the period march to august. In 7 of the 9 experiments performed, psychrotrophic and lipolytic bacterial counts reach 10^6 cfu/ml or higher at the 4th day. The *Pseudomonas* counts was 10^6 cfu/ml in 4 experiments at the 4th day and in the others this value or higher were observed at the 6th day. The concentrations of FFA was higher than 1.3 ueq/ml in 7 experiments at the 6th days and in the other 2 experiments the same value was observed at the 4th and 8th day. Highly significative

positive correlation was observed for the population increase of the three microbial groups and the concentration of FFA. Our results show that storage at 10°C keep pasteurized milk with acceptable lipolysis levels until the 4th day.

1. INTRODUÇÃO

O leite é um produto de grande importância na alimentação humana, principalmente para o desenvolvimento infantil, porque fornece uma proporção equilibrada de nutrientes. Para que este valor seja mantido é necessário que a composição do leite não sofra alterações.

A matéria graxa é um componente do leite, que se encontra na forma de glóbulos constituídos por ácidos graxos esterificados ao glicerol na forma de triglicerídeos.

A gordura do leite é caracterizada pela grande quantidade de ácidos graxos de cadeia curta, que são sintetizados pela glândula mamária. Um leite com 3,5% de gordura contribui com 48% da sua energia representada pelos triglicerídeos.

A lipólise resulta da ação das lipases, enzimas que têm a propriedade de hidrolisar os triglicerídeos da gordura, liberando os ácidos graxos de cadeia curta (bútrico, caprótico, caprílico, cáprico), que são os principais responsáveis pelo aparecimento de sabores desagradáveis ao

leite.

A membrana do glóbulo de gordura protege os triglicerídeos do leite do ataque por enzimas lipolíticas naturais do próprio leite.

No entanto, após a ordenha o leite é submetido a diferentes modificações físicas, baixa temperatura, tratamentos mecânicos, fazendo com que a integridade da membrana do glóbulo se modifique, possibilitando menor proteção aos triglicerídeos à ação da lipase.

A lipólise do leite é devida então a dois fatores: a lipase natural e as lipases microbianas.

A lipase natural, presente no leite, é uma enzima termosensível, facilmente destruída pelas temperaturas de pasteurização, não causando danos à matéria graxa de um leite manuseado e processado adequadamente. Entretanto, as lipases microbianas podem causar alterações na gordura do leite após o processamento térmico, uma vez que são resistentes à temperatura de pasteurização e permanecem ativas em temperaturas muito baixas.

A utilização de baixas temperaturas para possibilitar um maior período de armazenamento do leite pasteurizado para consumo e, daquele utilizado na elaboração de derivados, possibilita o desenvolvimento de microrganismos psicotróficos capazes de provocar alterações no leite e pro

dutos derivados.

A flora psicrotrófica do leite é responsável pela produção de lipases. Os processos de pasteurização do leite eliminam a maioria dos microrganismos inicialmente presentes no leite cru. Existe, porém, a possibilidade de sobrevivência de microrganismos psicrotrófico ou de enzimas produzidas por eles no leite pasteurizado. Existe, também, a possibilidade de uma recontaminação por estas bactérias, durante as fases de processamento do leite.

A qualidade bacteriológica do leite é responsável pela manutenção de suas características químicas e organolépticas em níveis adequados. Esta qualidade pode ser avaliada por métodos que enumerem os microrganismos presentes ou por aqueles que detectem a atividade bacteriana. O importante é que estes agentes sejam combatidos direta ou indiretamente.

A flora psicrotrófica pertencem grupos microbianos bem conhecidos: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, sendo principalmente *Pseudomonas* que se desenvolvem no leite cru, e podem estar diretamente envolvidas na deterioração da matéria graxa, hidrolisando os triglicerídeos ao produzirem lipases termoresistentes.

Embora as técnicas utilizadas no processamento, embalagem e distribuição do leite, estejam amplamente dominadas, é possível ocorrer contaminações posteriores por

falta de cuidados higiênicos durante o processamento, por má higienização e assepsia dos equipamentos e más condições de armazenamento do produto.

Todos estes fatores afetam a qualidade do leite. Faz-se necessário um conhecimento quantitativo da presença destes grupos psicotróficos e de sua atividade, não desejada, no leite de consumo. Este leite permanece sob refrigeração, após o processamento, por dois a três dias antes de ser totalmente consumido.

O propósito deste trabalho foi o de estabelecer a relação entre a atividade da lipase microbiana e o número de microrganismos psicotróficos, lipolíticos e *Pseudomonas sp* em leite pasteurizado refrigerado, como elementos que provocam alterações na sua qualidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Lipólise natural

De acordo com CHILLIARD (1982), a lipólise natural resulta essencialmente da ação da lipase intrínseca, secretada pela glândula mamária. Ela pode ser induzida ou espontânea.

A lipólise espontânea é a responsável pela evolução do teor de ácidos graxos livres (AGL) no leite rapidamente refrigerado e armazenado a 4°C antes do tratamento. A lipólise induzida é considerada como resultado de agitação mecânica, ou ativação térmica, ou ambas. A fronteira entre estes dois tipos de lipólises não é facilmente definida, porque ocorre sempre alguma agitação durante o processo de ordenha, seja ele mecânico ou manual.

Depois de 1975, ficou estabelecido que somente uma lipase tem papel importante no leite normal. Esta enzima é a lipoproteína lipase (LPL), que esta presente nos tecidos que utilizam ácidos graxos dos triglicerídeos sanguíneos, como os tecidos adiposo, muscular, pulmonar e mamário.

Sua atividade esta estreitamente ligada ao provimento de triglicerídeos para estes tecidos, sendo sua produção regulada por hormônios. Quando as condições necessárias à ação da LPL de um tecido sobre os triglicerídeos circulantes são reunidas, a enzima hidrolisa as ligações esteres e os ácidos graxos são liberados, podendo ser captados pelo tecido.

O mesmo autor evidencia ainda, as propriedades da LPL do leite: ela é fortemente termolábel; no leite é inativada em alguns segundos a 72°C, em alguns minutos a 60°C, em algumas horas a 37°C e em alguns dias à 5-15°C.

Esta lipoproteína lipase pode hidrolizar particularmente, os triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia curta ou longa, os glicerídeos parciais e os fosfolipídeos. De maneira geral a LPL hidrolisa somente as ligações esteres situadas na posição externa da molécula de glicerol. A L.P.L. do leite não apresenta especificidade para os ácidos graxos, no que diz respeito ao tamanho de sua cadeia ou seu grau de insaturação.

FONSECA (1985) relata, com relação ao metabolismo de lipídeos e analisando os aspectos bioquímicos da lactação, que a glândula mamária absorve uma grande quantidade de triglicerídeos dos quilomicrons e betalipoproteínas do sangue. Os ácidos graxos de cadeia longa da gordura do leite são pré-formados no sangue e os da cadeia curta são

sintetizados pela glândula mamária.

A lipoproteína lipase hidrolisa acima de 80% dos triglicerídeos do sangue a ácidos graxos livres mais glicerol. Com a lactogênese, a LPL aumenta 8 vezes no tecido mamário, mas decresce no tecido adiposo. A prolactina controla a atividade da LPL no tecido mamário e adiposo.

Segundo CIMIANO & ALVAREZ (1983), em condições normais, a membrana do glóbulo de gordura protege os triglicerídeos do leite da ação das enzimas lipolíticas, cuja atividade é debilitada por sua associação e/ou oclusão com as micelas de caseína e, provavelmente, também pela presença, no leite, de inibidores da lipólise. As enzimas lipolíticas naturais do leite se encontram perfeitamente separadas dos triglicerídeos e qualquer atividade que possa surgir de uma pequena interação seria, possivelmente, retardada pelos inibidores, também naturalmente presentes no leite.

Os mesmos autores diferenciam a lipólise expontânea e lipólise induzida. A primeira ocorre devido a mecanismos ligados ao animal: individualidade, período de lactação, alimentação, estado de saúde. A lipólise induzida só se produz quando há deterioração da membrana do glóbulo graxo, permitindo desta forma à enzima alcançar o substrato. Esta lipólise é favorecida por fatores mecânicos como agitação, entrada de ar, bombeamentos, trocas de temperatura.

WOLFSCHOON-POMBO et alii (1986) pesquisando sobre ácidos graxos livres no leite cru, não encontraram diferenças significativas entre os teores de AGL do leite de diferentes produtores analisados. Os autores reafirmaram que nas condições de manuseio e transporte do leite entregue na plataforma, ocorre lipólise induzida, como resultado da agitação constante a que o leite é submetido nos latões, que danifica o glóbulo de gordura e facilita a ação das lipases naturais.

CHAZAL & CHILLIARD (1987) relacionando o estado de gestação com a lipólise do leite evidenciaram o efeito desse período sobre o aumento da lipólise do leite de vaca no final de lactação. O estado avançado de gestação pode predispor à lipólise que se desenvolverá em condições favoráveis. Na prática, os dois meses que precedem o esgotamento dos animais são críticos para a lipólise, sobretudo porque o nível de produção se torna inferior a 5 kg.

2.2. Lipólise microbiana e microrganismos psicrotróficos

WITTER (1961) mantém o termo "psicrofílicos" para os microrganismos que crescem a baixas temperaturas, embora o seu crescimento ótimo se dê em temperaturas mais elevadas. Esse autor, em extensa revisão bibliográfica, baseia-se em alguns critérios para definir o grupo de microrganisis

mos então chamado psicrofílico:

- a) temperatura ótima de crescimento;
- b) habilidade para crescer em baixa temperatura;
- c) método de enumeração dessas bactérias;
- d) outros critérios que independam da temperatura como atividade proteolítica, lipolítica, etc.

A atividade lipolítica do grupo bacteriano mencionado é reconhecida, nesta pesquisa, como importante em laticínios. *Pseudomonas fragi* é evidenciada como lipolítica, quando crescem em baixas temperaturas.

O autor destaca ainda as diferentes temperaturas e pH, onde a ação da lipase é considerada ótima e, a especificidade pelos triglicerídeos, que também difere entre as lipases produzidas pelos microrganismos.

AZUMA et alii (1962) trabalhando com microrganismos, comparam psicrofílicos e mesofílicos. Concluem que estes têm características idênticas, exceto pela habilidade de crescer a baixas temperaturas, e pelas características que estão diretamente ligadas a esta habilidade dos psicrofílicos.

Já se percebe pelas pesquisas realizadas que o termo psicrofílico estaria melhor relacionado com os microrganismos que têm o crescimento ótimo em temperaturas de refrigeração. Psicrofílico contrasta com a denominação me

sofílico, uma vez que os microrganismos assim classificados, é que fazem parte dos lipolíticos que se desenvolvem em la ticínios conservados sob refrigeração.

INGRAN (1964) analisando a temperatura ideal de crescimento microbiano, e relacionando os termos psicro fílicos e psicrotróficos, conclui que um grupo de microrga nismos, com temperaturas ótimas na faixa de 20 a 30°C, não pode ser chamado de psicrofílicos, embora cresçam em bai xas temperaturas. Não são também psicrofílicos facultati vos, no verdadeiro sentido da palavra, nem propriamente de vem ser chamados mesofílicos, embora eles sejam psicrotrófi cos. O autor propõe então que um novo nome seja criado pa ra designá-los, em vista de sua grande importância numérica.

PUNCH et alii (1965) analisando o nível po pulacional de bactérias psicrofílicas associadas à mudanças físicas e de "flavor" no leite, observaram que era necessá rio uma taxa de 5 a 20 milhões de células por mililitro, pa ra que ocorressem mudanças. Culturas mais ativas estavam acima e culturas menos ativas abaixo desta taxa.

Pequenas mudanças detectadas organolepticamen te, não foram detectadas por medidas químicas da hidrólise de proteína e gordura. O estudo comparativo de seis cultu ras ativas, causadoras de defeitos semelhantes no leite, a 6 e 20°C indicaram que os mesmos níveis populacionais esti veram relacionados com as mudanças ocorridas nestas tempera

turas.

Sabe-se que a lipase produzida por microrganismos possui elevado grau de estabilidade ao calor. Segundo PINHEIRO et alii (1965) existem diferenças entre esta estabilidade da lipase produzida por *Pseudomonas* sp. Foi demonstrado que a enzima produzida por *P. fluorescens* foi inativada, utilizando-se pasteurização lenta aplicada ao leite comercial. Entretanto, as enzimas produzidas por *P. fragi* e *P. mucidolens* foram mais estáveis ao tratamento térmico, causando problemas em queijo tipo suíço em função dos defeitos desenvolvido pela ação da enzima.

GYLLENBERG & EKLUND (1966) fizeram um quadro taxonômico das bactérias psicrófilas do leite e seus produtos. Este estudo mostrou que somente com relação às pseudomonas as informações são completas, mostrando que a identificação de pseudomonas psicrófilas não constitui problema. Com base na atividade lipolítica, essas bactérias presentes no leite podem ser divididas em dois grupos principais. Com exceção de algumas cepas que hidrolisam tributirina, *P. fragi* e *P. fluorescens* parecem ser inativas aos lipídeos. *P. putrefaciens* é fortemente ativa.

Segundo OVERCAST (1968) o leite desde sua obtenção, processamento e chegada ao consumidor leva 24 horas e com certeza é consumido em 48 horas. No entanto, nas

fazendas de produção o leite pode permanecer mais tempo, antes de ser consumido, em temperaturas de refrigeração. Sem dúvida, um dos mais importantes problemas para a indústria de laticínios são os microrganismos psicrófilicos.

Em geral, estes microrganismos tem origem do solo e da água. São destruídos pela pasteurização mas contaminam o leite e seus produtos através da sanitização imprópria dos equipamentos. O próprio ambiente do laticínio pode conter estes microrganismos.

O mesmo autor analisando os efeitos destes nos constituintes do leite mostrou a característica que estas bactérias possuem de produzirem rancidez. A habilidade de alguns psicrófilicos, particularmente *Pseudomonas* sp, para hidrolisar a gordura do leite, acarretam problemas sérios porque as lipases que produzem são resistentes ao calor.

Lipases resistentes de 23 espécies de *Pseudomonas* foram estudadas. A enzima de 7 destas culturas produziram ligeira rancificação em leite pasteurizado no segundo dia de estocagem. A maior parte das culturas produziu rancidez (medida pelo aumento de acidez na gordura livre e mudanças no "flavor"), depois de 8 dias de estocagem.

Com relação à estocagem, o autor concluiu que o problema maior acarretado pelos psicrófilicos em produtos

de laticínios é quando os produtos ficam expostos nos supermercados e finalmente no refrigerador doméstico. Nessas ocasiões, a temperatura de estocagem é de 7, 10 e 12°C fazendo com que se acelere a atividade dos psicrófilos e, mesmo pequenas contaminações destes microrganismos, podem causar deteriorações nessas circunstâncias.

Durante a presente revisão bibliográfica foram mantidos os termos psicrófilos e psicrotrófilos conforme constavam nas pesquisas. Ambos foram usados para o mesmo grupo causador de defeitos em leite e derivados. Foi possível perceber que a partir de 1970 houve uma fixação em tôrno do termo psicrotrófico pela maioria dos autores pesquisados.

BARNARD (1971) pesquisando a vida de prateleira e sua importância para consumidores de leite, relatou que o tempo de permanência do leite sob refrigeração é de 5 dias a uma semana antes de ser processado. A temperatura se mostrou como o fator de maior importância para a durabilidade do leite.

Como regra geral, para cada aumento de 5°C a durabilidade se reduz 50%. O que se pode observar é que o leite e seus derivados fluídos permanecem em supermercados, refrigeradores domésticos, etc., em temperaturas relativamente altas, comprometendo sua qualidade.

O autor cita como exemplo, um leite estocado a 10°C pode conservar sua boa qualidade por 2 dias e meio se comparado com outro conservado por 10 dias a $4,5^{\circ}\text{C}$.

De acordo com KASON et alii (1972), a lipólise em leite pasteurizado durante estocagem em refrigerador se intensifica. Foram medidos valores de lipólise através dos ácidos graxos livres e contagem bacteriana do leite na compra e depois de 7 dias de estocagem a 4°C . Todos os leites aumentaram sua lipólise, tendo seus valores de ácidos graxos livres aumentando de 0,3 a 0,6 durante os 7 dias de estocagem. Várias amostras excederam a taxa aceitável de rancidez durante a estocagem (em torno de 1,1 meq/l).

Os autores concluíram que houve contribuição bacteriana para a deterioração do leite pasteurizado durante a refrigeração. O coeficiente de correlação foi positivo ao nível de 90%. Concluíram ainda que para prevenir deteriorações, deve-se melhorar a qualidade do leite cru, bem como deve-se fazer uma revisão cuidadosa da planta operacional de pasteurização.

Segundo KUZDZAL-SAVOIE et alii (1975), logo após a secreção o leite de vaca contém sempre uma pequena quantidade de ácidos graxos livres, em torno de 0,25 mili equivalentes por 100 g de matéria graxa. Isto é resultante provavelmente de uma síntese incompleta de glicerídeos e não proveniente de lipólise.

Com relação à lipólise microbiana, os autores evidenciam que as enzimas secretadas pelos microrganismos não podem representar papel no leite, contribuindo com o desenvolvimento de lipólise. Esta ocorrerá quando o número de microrganismos estiver em torno de 10^7 por mililitro de leite, com produção de lipase ácida no leite.

Os defeitos organolépticos estão relacionados com aparecimento ácidos graxos livres. O teor desses ácidos constitui um critério válido, podendo ser utilizado como base de controle de qualidade no leite e derivados.

MOURGUES & AUCLAIR (1973) analisando a durabilidade do leite pasteurizado, enfatizam a necessidade de que esse produto se conserve por um período longo, sem defeitos, também na França, citando que nos Estados Unidos o leite pasteurizado pode se conservar uma semana sem apresentar defeitos.

Os autores salientam que a durabilidade do leite pasteurizado depende, antes de tudo, das recontaminações após o tratamento térmico.

Foram observados períodos de 50-60 dias nos quais o leite pasteurizado conservado a 4°C , não apresentou defeitos de gosto. Na conservação do leite à 8°C , se observou uma evolução microbiana comparável àquela observada a 4°C , porém o desenvolvimento microbiano foi mais precoce e mais rápido.

Foram efetuados, nessa pesquisa, 14 ensaios e se observou que no leite conservado a 4°C os defeitos de gosto apareceram entre o 30º e o 73º dia (em média 57 dias de conservação). Para o leite conservado a 8°C, os defeitos de gosto apareceram depois de 10 a 35 dias (21 dias em média). Se constatou que a 4°C o leite se conservou 14 a 53 dias a mais que a 8°C.

O leite, após a pasteurização (75°C por 15 segundos) foi acondicionado assepticamente em frascos de 500 ml esterilizados e então foram utilizados no experimento citado.

Os microrganismos responsáveis pelas alterações do leite foram os termoresistentes e os psicrotróficos.

DEETH & FITZ-GERALD (1976) em revisão sobre a lipólise em produtos de laticínios, destacaram o papel da lipase de origem microbiana. Estas lipases também são produzidas por muitas espécies animais e vegetais e diferem consideravelmente em forma e função.

No leite, os autores ressaltaram a importância dos microrganismos psicrotróficos e suas enzimas. Muitas destas lipases podem atacar o glóbulo de gordura intacto do leite, isto é, podem causar lipólises no leite sem ativação anterior.

Esta é uma diferença da lipase natural do

leite que necessita de uma ativação para iniciar a hidrólise (seja pela presença de substâncias ativadoras, seja por processos mecânicos como agitação, temperatura, etc.).

Os métodos de avaliação organoléptica da lipólise indicam limites de ácidos graxos livres em laticínios, acima dos quais o "flavor" é inaceitável.

Para o leite e creme, o valor do grau de acidez estando entre 1,5 e 2,0, o defeito é detectado por algumas pessoas; acima de 2,0 meq/100 g o defeito é inaceitável. Para leite com ácidos graxos livres entre 1,0-1,3 µeq/ml, o defeito poderá ser detectado por algumas pessoas. Acima de 1,3 geralmente o leite tornar-se-á inaceitável.

De acordo com MARTH (1977) é muito provável que os produtos de leite pasteurizado se contaminem com bactérias psicrotróficas da água, ar e equipamentos mal limpos e higienizados.

Em 90% dos casos ou mais, as bactérias psicrotróficas do leite e seus produtos são provavelmente do gênero *Pseudomonas*. Também podem estar presentes: *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, to dos inativados pelo calor (pasteurização), com exceção do gênero *Bacillus* que é termoresistente.

Como as lipases microbianas se apresentam com particularidades específicas, ANDERSSON et alii (1979) pes

quisaram sobre inativação térmica de uma lipase resistente ao calor, produzida por uma bactéria psicrotrófica: *Pseudomonas fluorescens*.

De acordo com estes autores, o tratamento térmico foi efetuado em dois meios de cultura: caldo nutriente e leite desnatado. Para produção de lipase, os meios foram inoculados com 1 ml de cultura (contendo 10^8 células/ml), incubados a 20°C por dois dias.

O tratamento térmico efetuado nos dois meios e o tempo de tratamento necessário para inativar 90% da enzima à temperatura constante (Valor D_E), foi extremamente longo: 3,6 minutos a 140°C para Caldo Nutriente e 2,0 minutos a 140°C para leite desnatado. Estes valores D_E , foram comparados com: 2 minutos para uma protease termoestável de *Pseudomonas* a 140°C e, 3,02 segundos para esporos de *Bacillus stearothermophilus* a 140°C em leite cru.

SADOVSKI et alii (1980) obtiveram os seguintes resultados ao analisar o crescimento de microrganismos psicrotróficos em leites acidificados 72% dos psicrotróficos que foram isolados tiveram sua origem do "starter". *Streptococcus lactis diacetilactis* foi o mais abundante que *S. cremoris* e *Leuconostoc cremoris*.

Os autores consideram que estocagem dos leites acidificados a 5°C mantém suas características até 17

dias antes de haver rejeições organolépticas.

O interessante dessa pesquisa é a constatação de que as bactérias lática embora mesófilas, podem crescer a 7°C e podem fazer parte da contagem total de microrganismos psicrotróficos.

BLOQUEL & VEILLET-PONCET (1980) trabalhando com leite cru refrigerado, mostraram a importância de se conservar as propriedades originais do leite até o momento do tratamento térmico, durante o período em que este permanece sob refrigeração.

Os autores observaram que no início *Micrococcaceae* constituía 71,5% da flora bacteriana. Depois de estocagem a 4°C durante 4 dias, houve uma seleção bacteriana que favoreceu a proliferação significativa de bactérias Gram negativas, inicialmente presentes em número pequeno no leite.

Pseudomonas fluorescentes representaram 31% da flora mesófila aerobia e 73,4% da flora psicrotrófica após as condições do ensaio.

Os ensaios realizados por LÜCK et alii (1980) visaram contribuir para melhores definições da vida útil do leite pasteurizado (HTST). Os autores consideraram, para este estudo, que a vida útil seria definida como o período no qual a contagem de psicrotróficos ainda não alcançou 3

milhões por mililitro. Quando isto acontece o leite se dete
riora em horas ou até mesmo já se encontra deteriorado.

As indústrias necessitam determinar rapida
mente a vida útil do leite, creme e outros produtos líqui
dos de leite. A maneira de se prever este tempo não é pe
la contagem bacteriana imediatamente após o processo por que
esta contagem não diferencia entre contaminantes e aquelas
bactérias que sobrevivem à pasteurização, ou entre aquelas
que crescem e não crescem em temperaturas de refrigeração.

A vida útil é determinada pelo grupo de mi
croorganismos que crescem à temperatura de refrigeração. A
determinação deste grupo, no entanto, demanda tempo. Meios
seletivos para crescimento de bactérias gram negativas (con
taminantes pós-pasteurização) à temperaturas elevadas tem
sido utilizado para determinação numérica deste grupo.

Os mesmos autores obtiveram como resultado,
uma correlação significativa entre vida útil e contagem ini
cial de psicrotróficos e entre vida útil e contagem inicial
de contaminantes pós-pasteurização. Entretanto, esta corre
lação não foi consistente o bastante para recomendar estes
testes como estimação da vida útil.

A durabilidade do leite não depende somente
do número de contaminantes pós-pasteurização, mas depende
também da presença daqueles contaminantes que se multipli
cam rapidamente à temperaturas de refrigeração. Por esta

razão, a taxa de crescimento bacteriano durante estocagem a baixas temperaturas dará um melhor índice da vida útil do leite pasteurizado.

MOTTAR (1981) investigou a presença de enzimas termoresistentes e microrganismos no leite UHT e sua influência nas mudanças sensoriais durante estocagem por 4 meses a 20°C e a 1°C.

A pasteurização de leite cru, causou um aumento na atividade proteolítica e uma queda na atividade lipolítica. As temperaturas utilizadas no tratamento reprimem a atividade enzimática, mas não inibe completamente. O caráter termoresistente das enzimas presentes no leite é tão acentuado, que sua destruição praticamente não pode ser efetuada: a quantidade de calor requerida teria um efeito desfavorável nas propriedades nutricional e sensorial do leite.

Atividade enzimática no leite UHT afeta a estocagem do leite e deve ser neutralizada tanto quanto for possível. A qualidade do leite cru, principalmente relacionada com a flora psicrotrófica vai determinar a natureza e o número de enzimas termoestáveis.

Das amostras analisadas 97% continham proteases e lipases termoresistentes não completamente inativadas após o tratamento UHT. A contagem de bactérias psicrotrófi

cas foi significativamente correlacionada à atividade proteolítica e lipolítica residual depois do tratamento UHT.

Em extensa revisão sobre lipases de bactérias gram negativas, SEVERINA & BASHKATOVA (1981), relacionaram as principais características de cultivo para que estas bactérias produzam lipases (necessidades nutricionais, pH, temperatura, fatores de crescimento, inibidores, etc..).

Os substratos hidrolisados pelas lipases de bactérias gram negativas são altamente diversas: gorduras vegetais e animais e triglicerídeos sintéticos - esteres de ácidos graxos saturados e insaturados com longa ou pequena cadeia de carbono. A diversidade das propriedades das lipases das bactérias gram negativas, estende um horizonte para seu uso.

COUSIN (1982) citou a existência de uma fosfolipase, produzida por psicrotróficos que pode assumir papel importante na deterioração do leite.

Seu mecanismo de ação seria sobre a membrana protetora do glóbulo de gordura. Após a degradação desta membrana, a matéria graxa do leite ficaria susceptível à ação das lipases.

Conforme têm sido salientado nesta revisão bibliográfica o microrganismo psicrotrófico mais frequente, causando deterioração do leite cru e pasteurizado, per

tence ao gênero *Pseudomonas*.

BRANDT & LEDFORD (1982) pesquisaram o fator aeração sobre o crescimento deste grupo e encontraram dados significativos de que a aeração influencia a velocidade de crescimento destes microrganismos. Houve um efeito negativo de níveis reduzidos de oxigênio na taxa de crescimento de *Pseudomonas* psicrotróficas.

Desta forma, todo o sistema que envolve a produção e processamento do leite, merecem um controle maior sobre a aeração, que associado ao controle da temperatura, poderá estender a vida útil e a qualidade do leite.

Pela presente revisão da literatura, também tem sido observado que a qualidade do leite cru (principalmente relacionando com presença de psicrotróficos), tem muita relação com a qualidade do leite pasteurizado.

Se o leite cru permanece armazenado sob refrigeração antes do seu processamento, é necessário que se tenha conhecimento de quanto tempo é possível este armazenamento, sem que modificações irreparáveis ocorram neste leite (como a lipólise).

Desta forma, MUIR & PHILLIPS (1984) mostraram como calcular este período de vida útil, utilizando o tempo de geração aparente e o conhecimento de que a partir de 10^6 unidades formadoras de colônias de psicrotróficos por

mililitro, já começa ocorrer hidrólise da matéria graxa.

De acordo com estes autores, o tempo de geração é calculado utilizando o número de células microbianas na fase logarítmica de crescimento. Entretanto, na prática, as bactérias podem ser encontradas na sua lag, logarítmica ou até mesmo na fase estacionária de seu ciclo de crescimento em leite cru. Por esta razão, um tempo de geração aparente pode ser calculado, envolvendo a lag fase (quando ela ocorre) e a fase logarítmica de crescimento.

tempo de geração aparente = tempo médio necessário para dobrar o número de bactérias

$$\text{tempo de geração aparente} = \frac{0,301 \times \text{tempo de estocagem}}{\log_{10}(\text{contagem final}) - \log_{10}(\text{cont.inicial})}$$

Segundo DRIESSEN (1984), uma produção apreciável de lipases bacterianas foi obtida somente perto do final da fase exponencial de crescimento e, durante a fase estacionária, quando a contagem bacteriana excedia 8 milhões por mililitro.

Além dos meios de controle dos psicrotróficos, que envolvem basicamente higienização e controle da matéria prima, outras formas têm sido procuradas.

MISTRY & KOSIKOWSKI (1985) analisaram a influência de sorbato de potássio e peróxido de hidrogênio nas bactérias psicrotróficas do leite.

Sorbato de potássio foi adicionado a leite pasteurizado, homogeneizado nas proporções: 0,75, 1 e 2%. A vida útil destes leites a 6,8°C foram comparados.

O crescimento bacteriano foi retardado com adição de 2% de sorbato de potássio, no entanto, observou-se modificações no sabor, com adições superiores a 1%. A adição de 0,75% desse composto sozinho ou combinado com 0,05% de peróxido de hidrogênio, inibiu o crescimento bacteriano em leite pasteurizado e, aumentou a vida útil em mais que 26 dias a 6,8°C. O ótimo para sorbato de potássio no leite esteve entre 0,75 e 1%.

Uma outra maneira de se predizer a durabilidade do leite pasteurizado homogeneizado foi proposta por CHANDLER & McMEEKIN (1985a, 1985b). Trata-se de um estudo matemático utilizando a integração da função da temperatura. Este é um processo que permite monitorização contínua do tempo-temperatura, relacionados com a história do produto, com particular referência a sua vida útil em temperaturas superiores a 15°C.

Psicrotróficos do gênero *Pseudomonas* foram relacionados pelos autores como o microrganismo deteriorador, que está sempre presente em leite refrigerado. Desta

maneira estas bactérias foram utilizadas como modelo na sua habilidade de crescer em temperaturas que variam de 0 a 15°C.

As pesquisas relacionadas com lipólise no leite cru e em leite pasteurizado, seguem evidenciando o importante papel de microrganismos psicrotóxicos com a produção de suas lipases.

A maior proporção destes microrganismos (70-80%) ocorre dentro do gênero *Pseudomonas*. Desta forma, muito se tem proposto à respeito da taxonomia, especificidade, resistência das enzimas, sempre com o objetivo de aumentar a durabilidade do leite sob refrigeração (SHELLEY et alii, 1986; SHELLEY et alii, 1987).

2.3. Especificidade das lipases microbianas

Os grupos definidos pela coloração gram (positivos e negativos) são distintos possuindo propriedades bioquímicas diferentes, que vão determinar o mecanismo de ação de cada cepa e sua especificidade.

A especificidade pode ser traduzida pelos perfis cromatográficos que indicarão a natureza dos diferentes ácidos graxos liberados pela lipólise.

Considerar que podem existir diferenças en

tre grupos bacterianos, é importante nas reações de lipólise. Isto mostra que microrganismos de propriedades bioquímicas diferentes podem produzir lipases que são próprias, capazes de hidrolisar um triglicerídeo natural ou sintético em uma posição preferencial 1 - 2 ou 3, para liberar um ácido graxo ou uma mistura desses (ALIFAX, 1972).

A especificidade de *Penicillium crysogenum* para triglicerídeos sintéticos e naturais foi observada por CHOPRA et alii (1980), através da atividade relativa da lipase purificada. Para a tributirina foi encontrada uma atividade relativa de 100% e para o óleo de manteiga 45%.

Alford & Blankenship⁽¹⁾ citados por ALIFAX (1972), classificou a lipase em três grupos de acordo com a especificidade observada:

O primeiro grupo reunia as lipases dos microrganismos que hidrolisam os triglicerídeos na posição 1. Neste grupo figuram as lipases de *Pseudomonas fragi*, *P. fluorescens*, *Candida lipolytica*, *Penicillium roqueforti*.

O segundo grupo reunia as lipases de *Staphylococcus aureus* e *Aspergillus niger*, que hidrolisam na posição 2. Ao terceiro grupo pertenciam as lipases de *Geotrichum candidum* que hidrolisam preferencialmente os ésteres.

(1) ALFORD, J.A. & BLANKENSHIP, L.C. Differences in specificities of lipases from species in *Pseudomonas* at *staphylococcus*. Bact. Procee, 171, 1961.

teres de ácidos graxos insaturados, qualquer que seja sua posição na molécula dos triglicerídeos.

A especificidade se torna mais pronunciada para os microrganismos dentro de um mesmo gênero. Quando comparada a outros fatores que envolvem a lipólise, a especificidade assume menor importância do que a temperatura ótima da enzima, o pH onde a ação é ideal e a presença de cofatores que participam da hidrólise.

2.4. Mecanismos de avaliação da lipólise

Os ácidos graxos livres (AGL), englobam todos os ácidos que resultam da hidrólise enzimática da matéria graxa do leite, ou aqueles resultantes de uma síntese incompleta ao nível da glândula mamária. Os ácidos carboxílicos como lático, succínico, cítrico, não fazem parte dos ácidos graxos livres.

Uma medida comum da lipólise em leite e derivados, pode ser efetuada pelo valor do grau de acidez que representa a quantidade (medida em mililitros) de uma base necessária para neutralizar os AGL contidos em 100 gramas de matéria graxa. O valor do grau de acidez é exprimido em miliequivalentes por 100 gramas de matéria graxa (meq/100 g MG).

Uma segunda forma de avaliar os ácidos gra-

xos livres totais é o método de extração desses ácidos graxos por solventes orgânicos, seguido por uma titulação. Neste caso utiliza-se o leite para a análise e o resultado é expresso em microequivalentes por ml de leite (meq/ml de leite).

Outras formas utilizadas seriam os métodos colorimétricos, que se baseiam na formação de sais de cobalto de cobre; ou utilização de Rodamina B e Rodamina 6 G que formam complexos coloridos.

Os ácidos graxos e outros produtos da lipólise (mono e di-glicerídeos) diminuem a tensão superficial do leite. A medida desta variação na tensão superficial, constitui um método também utilizado para avaliar a dosagem global dos ácidos graxos livres.

Finalmente, para uma análise específica dos diferentes ácidos graxos livres liberados pela lipólise, utilizam-se as técnicas de cromatografia em fase gasosa, método importante, que demanda tempo de análise e custo superiores aos anteriores que são mais indicados para análises de rotina (DEETH & FITZ-GERALD, 1976; DRIESSEN et alii, 1977; MOUILLET et alii, 1981 e SELSELET-ATTOU et alii, 1984).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matéria prima

Como matéria prima, para realização do presente trabalho, foi utilizado o leite tipo C, padronizado a 3% de gordura, adquirido no comércio de Botucatu. A aquisição desse leite foi feita sempre no mesmo estabelecimento comercial; também a marca e o dia da semana para essa aquisição foram mantidos constantes durante todo o desenvolvimento do trabalho.

3.1.1. Amostragem

Três embalagens de leite tipo C, contendo um litro cada, foram coletadas a cada vez e transportadas imediatamente para o laboratório em recipiente contendo gelo. No laboratório o leite foi transferido assepticamente para um balão de vidro com fundo chato, esterilizado.

A coleta de amostras foi iniciada no mês de março e continuou até o mês de agosto, perfazendo assim, 180

dias. No total, nove amostras foram coletadas, com intervalo médio de 20 dias entre elas.

3.1.2. Caracterização da matéria prima

Para uma caracterização da matéria prima, foram analisados o seu teor de gordura, acidez Dornic, densidade, teor de ácidos graxos livres e o número de microrganismos psicotróficos total, de lipolíticos e de *Pseudomonas sp*, parâmetros estes que correspondem também à situação inicial do ensaio (tempo zero).

3.1.2.1. Teor de gordura

Para a determinação do teor de gordura do leite foi utilizado o método de Gerber, conforme o "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" (A.P.H.A., 1972).

3.1.2.2. Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada pelo método do Dornic, conforme procedimento descrito por BEHMER (1979).

3.1.2.3. Densidade

Para se obter o valor da densidade do leite, foi utilizado o lactodensímetro, sendo a leitura corrigida para a temperatura de 15°C (BEHMER, 1979).

3.1.2.4. Ácidos graxos livres totais

A extensão da lipólise no leite foi avaliada pelo teor de ácidos graxos livres (A.G.L.) de acordo com procedimento descrito por DEETH et alii (1975).

A gordura do leite foi extraída por uma mistura de isopropanol, éter de petróleo e ácido sulfúrico na proporção de 40:10:1. A 10 ml dessa mistura foi acrescentado 6 ml de éter de petróleo, 4 ml de água destilada e 4 ml do leite a ser analisado.

Após vigorosa agitação, seguida por um período de repouso, havia separação em duas camadas. Uma alíquota (5 ml) da camada superior era removida e titulada com KOH 0,02 N, utilizando solução metanólica de fenoftaleína a 1% como indicador. Os resultados foram expressos em micro-equivalentes por mililitro (μ eq/ml).

3.1.2.5. Contagem total dos microrganismos psicrotróficos

Para a contagem desses microrganismos, foi utilizado o meio padrão para contagem total (PCA), em placas de Petri, às quais foram inoculadas amostras do leite após diferentes diluições. As placas foram incubadas a 18°C por 45 horas e após esse período, o número de colônias foi contado (OEHLRICH & McKELLAR, 1983).

3.1.2.6. Contagem dos microrganismos lipolíticos

A contagem desse grupo de microrganismos foi feita conforme HARRIGAN & McCANCE (1976). Para isso, o meio de cultura agar tributirina (AT) próprio para contagem de microrganismos lipolíticos, foi colocado em placas de Petri, contendo as amostras do leite devidamente diluídas. As placas, inoculadas, foram incubadas a 30°C por 5 dias, após o que as colônias que apresentavam halo de lipólise ao seu redor, foram contadas.

3.1.2.7. Contagem de *Pseudomonas* sp

Para contagem dos microrganismos pertencentes a este gênero, *Pseudomonas*, foi utilizado meio de cultura específico para este fim, o Agar *Pseudomonas* (AP). Este meio é constituído pelo P.C.A. acrescido de peptona e cloreto de sódio. Antes do meio ser vertido nas placas de Petri, adicionava-se a ele solução de cloreto de trifênil tetrazolium a 5%, na proporção de 4,0 ml para cada 96,0 ml do meio.

As placas foram incubadas a 22°C por 4 dias e após este período foram contadas (BRANDT & LEDFORD, 1982).

3.2. Armazenagem do leite sob refrigeração

3.2.1. Temperatura e tempo

O balão de vidro contendo o leite (item 3.1.1)

foi colocado em uma estufa incubadora a uma temperatura de 10°C por um período de 10 dias (OVERCAST, 1968).

3.2.2. Análises do leite armazenado sob refrigeração

A cada 48 horas foi coletada uma amostra de leite de 10,0 ml para as análises microbiológicas e 4,0 ml para determinação dos ácidos graxos livres. Essas amostras receberam a identificação de acordo com o tempo de armazenamento, em dias, a partir da amostragem inicial, no momento em que o leite chegava ao laboratório e se iniciava o seu armazenamento. Portanto, foram realizadas análises nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias. Os resultados obtidos a partir da amostra a zero dias, também compuseram a caracterização da matéria prima.

Para cada tempo de amostragem, foram efetuadas as contagens dos microrganismos psicrotróficos totais, microrganismos lipolíticos e *Pseudomonas sp*, seguindo-se as técnicas descritas, respectivamente, nos itens 3.1.2.5, 3.1.2.6 e 3.1.2.7. Os ácidos graxos livres foram determinados conforme a técnica descrita em 3.1.2.4.

3.3. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados segun

do SNEDECOR & COCHRAN (1974), para regressão polinomial relacionando o crescimento microbiano e ácidos graxos livres. Foi efetuada também, correlação linear simples 2 a 2 e verificado a significância dos valores de "r" a nível de 1% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Matéria prima

Os dados referentes à caracterização do leite utilizado como matéria prima, encontram-se relacionados na Tabela 1. A acidez observada variou de 15 a 18^oD para as 9 amostras utilizadas. O teor de gordura apresentou valores variando de 3,1 a 3,4%. A densidade a 15^oC variou de 1,031 a 1,032, sendo que somente as amostras 3 e 7 é que apresentaram densidade 1,031, as demais apresentaram densidade 1,032.

Os valores obtidos para acidez e densidade encontram-se dentro do previsto pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 1953), para o leite pasteurizado ser levado ao consumidor como tipo C ou padronizado. Estes valores são de acidez não inferior a 15^oD nem superior a 20^oD. Para a densidade a 15^oC estes valores estão entre 1,031 e 1,034.

Os valores de gordura observados estão de acordo com o teor de 3%, em todas as amostras.

TABELA 1 - Caracterização do leite utilizado como matéria prima nos experimentos

Amostras	Acidez °D	Gordura %	Densidade (15°C)	Psicrotróficos ufc/ml	Lipolíticos ufc/ml	<i>Pseudomonas sp</i> ufc/ml	AGL totais ueq/ml
1	17	3,4	1,032	$<1,0 \cdot 10^4*$	$<1,0 \cdot 10^4*$	$<1,0 \cdot 10^4*$	0,3
2	16	3,3	1,032	$<1,0 \cdot 10^4*$	$5,5 \cdot 10^5$	$<1,0 \cdot 10^4*$	0,9
3	17	3,1	1,031	$<1,0 \cdot 10^4*$	$1,8 \cdot 10^5$	$<1,0 \cdot 10^4*$	1,1
4	15	3,2	1,032	$<1,0 \cdot 10^4*$	$<1,0 \cdot 10^4*$	$<1,0 \cdot 10^4*$	0,7
5	16	3,2	1,032	$1,0 \cdot 10^1$	$3,4 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$	0,9
6	17	3,2	1,032	$1,3 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^1$	$8,0 \cdot 10^4$	0,8
7	17	3,2	1,031	$6,2 \cdot 10^2$	$3,2 \cdot 10^2$	$5,8 \cdot 10^2$	0,8
8	18	3,3	1,032	$3,8 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^4$	0,9
9	17	3,2	1,032	$1,3 \cdot 10^4$	$8,7 \cdot 10^3$	$9,6 \cdot 10^3$	0,3

* Número estimado

Pode ser observado, pela mesma tabela, os resultados das contagens microbianas nos meios específicos. Para os microrganismos psicrotróficos houve contagem estimada para 4 amostras. O menor valor observado foi de $1,0 \cdot 10^1$ e o maior valor observado foi de $3,8 \cdot 10^4$ ufc/ml.

Os valores da contagem de microrganismos lipolíticos foram estimados em duas amostras. Nas demais os valores encontrados variaram de $3,0 \cdot 10^1$ a $5,5 \cdot 10^5$ ufc/ml.

Para *Pseudomonas sp*, os valores foram estimados para as 4 primeiras amostras, variando nas demais amostras de $5,8 \cdot 10^2$ a $8,0 \cdot 10^4$ ufc/ml.

De acordo com as normas vigentes do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1987), a contagem total de microrganismos no leite pasteurizado tipo C, não deve exceder a $3 \cdot 10^5$ por mililitro. Não existem padrões específicos para psicrotróficos, lipolíticos e *Pseudomonas sp* em leite pasteurizado tipo C, porém os valores de contagens obtidas para estes grupos encontram-se abaixo da contagem total padrão para todas as amostras analisadas, com exceção de um valor observado para microrganismos lipolíticos que foi superior a $3 \cdot 10^5$ ufc/ml (amostra 2).

Ainda pela Tabela 1, os valores de ácidos graxos livres observados, variaram de 0,3 a 1,1 µeq/ml nas amostras

tras analisadas. Esses valores são semelhantes aos encontrados por KASON et alii (1972) para o leite pasteurizado comercial; os valores por eles encontrados variaram de 0,58 a 1,20 meq/100 g.

Os valores de A.G.L. (Tabela 1) podem ser comparados aos valores obtidos por WOLFSCHOON-POMBO et alii (1986) que obteve no leite de plataforma médias individuais de 0.676 a 0.853 meq/l. Apenas 4 amostras (Tabela 1) apresentaram valores superiores, embora a comparação seja feita entre leite cru e pasteurizado. Segundo estes autores, dos fornecedores de leite pesquisados apenas uma porcentagem mínima resfriava o leite após a ordenha, sendo que a maioria deles fornecia leite à temperatura ambiente.

A matéria prima utilizada nos experimentos também foi fornecida em maior porcentagem por pequenos produtores, que provavelmente pouco se utilizam do resfriamento do leite, até que este seja entregue à Indústria.

JURCZAK (1987) obteve valores de ácidos graxos livres também em leite cru, variando entre $0,68 \pm 0,073$ meq/ml até 1,05, antes do processamento.

O crescimento microbiano nas amostras analisadas, possivelmente, pouco contribuiu para a presença de ácidos graxos livres. Este teor que se observa, mesmo no leite cru, é resultante da lipólise espontânea mais a lipólise microbiana sendo, em maior grau, resultante da lipólise

se induzida.

Os valores de ácidos graxos livres obtidos na análise da matéria prima utilizada nos experimentos estão de acordo também com aqueles obtidos por OVERCAST (1968), que observou para a acidez livre valores iniciais variando de 0,96 a 0,97 $\mu\text{eq/ml}$ em leite pasteurizado.

4.2. Leite armazenado sob refrigeração

Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos para as contagens de microrganismos psicotróficos nos 9 experimentos realizados e durante os 10 dias de armazenagem, com intervalos de 48 horas entre as contagens. Os valores mínimos observados para esses microrganismos, todos no tempo inicial (zero dias de armazenagem), estiveram sempre abaixo de $1,0 \cdot 10^4$ ufc/ml com exceção dos experimentos 6, 8 e 9. Por outro lado, o maior valor encontrado foi no experimento nº 7 ao 10º dia de armazenagem, onde foram observadas $2,6 \cdot 10^{13}$ ufc/ml.

Para os microrganismos lipolíticos, os resultados das contagens encontram-se na Tabela 3. Pode-se verificar que também para este grupo de microrganismos, a exemplo do que ocorreu com os psicotróficos, os valores mínimos observados a zero dias de armazenagem foram inferiores a $1,0 \cdot 10^4$ ufc/ml em 6 dos 9 expedimentos realizados. O

TABELA 2 - Número médio de microrganismos psicrotróficos (ufc/ml)

Experimentos	Tempo de armazenagem (dias)					
	0	2	4	6	8	10
1	$1,0 \cdot 10^4^*$	$1,0 \cdot 10^4^*$	$2,9 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^8$
2	$1,0 \cdot 10^4^*$	$1,0 \cdot 10^4^*$	$1,5 \cdot 10^7$	$4,9 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^8$	$7,0 \cdot 10^8$
3	$1,0 \cdot 10^4^*$	$1,0 \cdot 10^4^*$	$4,8 \cdot 10^5$	$9,6 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^9$	$2,0 \cdot 10^{11}$
4	$1,0 \cdot 10^4^*$	$1,0 \cdot 10^4^*$	$7,3 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^7$	$9,2 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^9$
5	$1,0 \cdot 10^1$	$1,9 \cdot 10^3$	$8,8 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^{10}$	$6,5 \cdot 10^{11}$
6	$1,3 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^7$	$9,0 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^9$	$5,0 \cdot 10^{10}$
7	$6,2 \cdot 10^2$	$3,2 \cdot 10^2$	$6,8 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^{11}$	$2,6 \cdot 10^{13}$
8	$3,8 \cdot 10^4$	$3,9 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^{11}$	$1,0 \cdot 10^{11}$
9	$1,3 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$	$5,7 \cdot 10^8$

* Número estimado (menor que)

TABELA 3 - Número médio de microrganismos lipolíticos (ufc/ml)

Experimentos	Tempo de armazenagem (dias)					
	0	2	4	6	8	10
1	$1,0 \cdot 10^4^*$	$3,2 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^7$	$6,3 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^8$
2	$5,5 \cdot 10^5$	$9,5 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^7$	$9,8 \cdot 10^7$
3	$1,8 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5^*$	$2,8 \cdot 10^7$	$9,2 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^9$
4	$1,0 \cdot 10^4^*$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^7$	$6,1 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^8$
5	$3,4 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^4$	$8,7 \cdot 10^6$	$3,6 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^8$
6	$3,0 \cdot 10^1$	$1,0 \cdot 10^1$	$1,5 \cdot 10^5$	$2,9 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^{10}$
7	$3,2 \cdot 10^2$	$4,9 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^9$	$6,3 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^{10}$
8	$2,6 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^{10}$	$4,5 \cdot 10^{11}$
9	$8,7 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^7$	$8,8 \cdot 10^8$

* Número estimado (menor que)

número máximo observado foi de $4,5 \cdot 10^{11}$ ufc/ml para o 10º dia de armazenagem no experimento nº 8.

Os resultados obtidos para as contagens de *Pseudomonas sp* encontram-se na Tabela 4. Também para este grupo de microrganismos, a contagem inicial esteve, na maioria dos experimentos, abaixo de $1,0 \cdot 10^4$ ufc/ml, exceto nos experimentos nºs 6 e 8 onde este valor foi de $8,0 \cdot 10^4$ e $2,6 \cdot 10^4$, respectivamente. Em dois experimentos, nºs 1 e 2, a maior contagem foi observada já no 6º dia de armazenagem, ocorrendo um decréscimo até o 10º dia. Em outros dois experimentos, nºs 3 e 9, este valor máximo foi observado no 8º dia de armazenagem, decrescendo no 10º dia. Mesmo assim, a maior contagem observada, considerados todos os experimentos realizados, foi ao 10º dia de armazenagem no experimento nº 6.

Ao se comparar as contagens obtidas para os três grupos de microrganismos, observa-se que a contagem total de psicrotróficos foi a mais elevada em 6 dos 9 experimentos realizados. O valor observado para contagem de *Pseudomonas sp* ultrapassou o valor observado para os outros dois grupos em 2 ensaios. O grupo de lipolíticos em apenas um experimento superou os outros dois grupos; porém neste caso, experimento 6, a contagem inicial de lipolíticos foi bem maior do que a contagem inicial para psicrotróficos e *Pseudomonas sp*.

TABELA 4 - Número médio de *Pseudomonas sp* (ufc/ml)

Experimentos	Tempo de armazenagem (dias)					
	0	2	4	6	8	10
1	$1,0 \cdot 10^4^*$	$1,0 \cdot 10^4^*$	$5,5 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^7$
2	$1,0 \cdot 10^4^*$	$1,0 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^6$	$5,3 \cdot 10^5$
3	$1,0 \cdot 10^4^*$	$1,0 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^8$
4	$1,0 \cdot 10^4^*$	$1,0 \cdot 10^5$	$7,0 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^7$	$7,3 \cdot 10^8$	$9,1 \cdot 10^8$
5	$1,4 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^4$	$7,3 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^9$	$2,8 \cdot 10^{10}$	$5,2 \cdot 10^{11}$
6	$8,0 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^9$	$9,0 \cdot 10^{11}$
7	$5,8 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^9$	$4,1 \cdot 10^{10}$	$3,3 \cdot 10^{11}$
8	$2,6 \cdot 10^4$	$4,7 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^7$	$3,9 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^{10}$	$2,0 \cdot 10^9$
9	$9,6 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^5$	$6,6 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^{10}$

* Número estimado (menor que)

Para os três grupos, os valores iniciais obtidos nas contagens, foram semelhantes em 6 dos 9 experimentos, indicando que o comportamento microbiano sofreu variações durante o período de armazenamento. Apesar deste crescimento diferenciado entre os grupos, houve uma tendência mostrando uma maior evolução para os psicrotróficos.

Comparações entre o crescimento populacional dos três grupos microbianos durante o transcorrer de cada um dos 9 experimentos, também são apresentados graficamente nas Figuras 10 a 18, no Apêndice.

De acordo com os resultados obtidos por COUSIN (1982) e MOURGUES & AUCLAIR (1973), o leite pasteurizado começa a apresentar defeitos de sabor quando a contagem microbiana para psicrotróficos atinge $1,0 \cdot 10^7$ ufc/ml ou então, segundo LAW (1979), quando este valor é de $5,0 \cdot 10^6$ ufc/ml. Ainda, conforme os resultados obtidos por CIMIANO & ALVAREZ (1983), estes valores devem estar na faixa de $5,0 \cdot 10^6$ a $1,0 \cdot 10^7$ ufc/ml que engloba exatamente os resultados obtidos pelos autores anteriormente citados.

No presente trabalho, tanto o número de microrganismos psicrotróficos (Tabela 2) como o de lipolíticos (Tabela 3), atingiram ou ultrapassaram 10^6 ufc/ml no 4º dia de armazenagem em 7 dos 9 experimentos realizados. Apenas no experimento nº 4, nenhum destes dois grupos microbianos havia, ao 4º dia de armazenagem, atingido aquele valor

que foi ultrapassado por ambos somente no 6º dia. Esses resultados indicam que em 8 dos 9 experimentos realizados, o leite pasteurizado mantido sob temperatura de 10°C permanece adequado para o consumo até no máximo 4 dias. Embora não tenha sido feito controle de acidez, houve coagulação das amostras entre o 7º e o 8º dia de armazenagem a 10°C.

Este período de conservação, adequado para o consumo, pode ser mais longo em função da temperatura de armazenagem e qualidade inicial do leite conforme os resultados obtidos por MOURGUES & AUCLAIR (1973), mostrando que o leite pasteurizado de alta qualidade, obtido na França, pode ser conservado a 8°C por 5 a 6 dias sem defeitos de gôsto. Também GEBRE et alii (1986), ao analisarem amostras de leite industrial não obtiveram aumentos significativos, ao nível de 5% nas contagens de microrganismos totais e de psicrotróficos, durante 3 dias de armazenagem a 4°C. De acordo com estes autores, o leite pode ser armazenado 4 dias nesta temperatura antes do processamento.

Para *Pseudomonas* sp (Tabela 4), os valores médios atingiram 10^6 ufc/ml a partir do 4º dia de armazenagem em apenas 4 experimentos, sendo que nos 5 experimentos restantes este valor foi alcançado ou superado no 6º dia de armazenamento. Esses valores estão de acordo com os obtidos por SASANO et alii (1984), que inocularam *Pseudomonas* em leite UHT e obtiveram um número médio de $1,0 \cdot 10^6$ a

8,6 ... 10^7 ufc/ml após 5 dias de armazenagem a 5°C. Crescimento populacional mais rápido observaram SHELLEY et alii (1986) que inocularam *Pseudomonas* em leite UHT e obtiveram 10^7 ufc/ml após 3 dias e meio de armazenagem a 5°C.

CHANDLER & McMEEKIN (1985b) utilizando leite homogeneizado e pasteurizado armazenado a 10°C, observaram para *Pseudomonas sp* um valor de 7,978 para o logarítmo do número de ufc/ml após 5 dias e meio de armazenagem. No presente trabalho, valores muito próximos ou levemente superiores a estes foram observados no 6º dia de armazenagem para os 9 experimentos realizados (Tabela 7 do Apêndice).

No 10º dia de armazenagem em 7 experimentos, os valores encontrados para os logarítmos dos números de ufc/ml para *Pseudomonas sp* (Tabela 7 do Apêndice) estiveram muito próximos ou acima do valor de 9,5 observados por ROWE & GILMOUR (1983), após 10 dias a 7°C embora estes autores tenham utilizado uma cultura pura de *Pseudomonas fluorescens* em meio suplementado com soro e caseína.

Os teores de ácidos graxos livres totais (AGL) estão apresentados na Tabela 5. O mais alto teor encontrado foi para o leite com 10 dias de armazenagem, no experimento nº 7. Considerando o tempo máximo de armazenagem, em todos os experimentos, a menor produção de AGL se deu no experimento nº 9, onde este teor não atingiu 50% dos valores máximos observados nos experimentos nºs 7 e 8.

TABELA 5 - Ácidos graxos livres totais (ueq/ml)

Experimentos	Tempo de armazenagem (dias)						Aumento
	0	2	4	6	8	10	
1	0,3	0,8	1,9	3,5	5,0	5,6	5,3 (18)
2	0,9	0,9	1,2	1,5	4,7	5,2	4,3 (5)
3	1,1	0,0	1,0	2,0	2,5	3,2	2,1 (2)
4	0,7	0,9	0,9	2,7	4,0	5,5	4,8 (7)
5	0,9	0,9	1,1	2,1	4,2	5,8	4,9 (5)
6	0,8	1,0	1,2	2,9	4,6	6,6	5,8 (7)
7	0,8	0,8	1,1	3,7	6,4	6,7	5,9 (7)
8	0,9	0,9	1,0	2,5	4,0	5,4	4,5 (5)
9	0,3	0,8	0,9	0,9	2,0	3,1	2,8 (9)

Os números entre parênteses significam a taxa de acréscimo de AGL do tempo zero até o 10º dia de armazenagem.

Pode-se observar que, com exceção dos experimentos n^ºs 1 e 9 nos quais o teor inicial de AGL foi muito baixo crescendo no 2^º e 4^º dias, nos demais experimentos este teor permanecem praticamente constante, ou com pouca variação, até o 4^º dia de armazenagem, o que evidencia baixa atividade dos microrganismos neste período.

Este fato foi também observado por VAN DER ZANT & MOORE (1955), que encontraram lag-fase de 3 a 5 dias para leite refrigerado e pasteurizado. A flora mista, no leite, também conduz a um aumento no período de adaptação dos microrganismos e, isto se tornou evidente quando os autores utilizaram cultura pura de psicrotróficos e diminuíam esta lag-fase para um tempo não superior a 24 horas.

Há um limite para o teor de ácidos graxos livres no leite, acima do qual se torna perceptível o sabor de ranço. Este valor em termos de acidez livre da matéria gorda pura é de 1,20 meq/100 g (KASON et alii, 1972) ou quando o valor ultrapassar 1,5 meq/100 g de acordo com KUZDZALSAVOIE et alii (1975). O valor expresso em ueq/ml, onde os defeitos de sabor começam a ser detectáveis, é de 1,3 segundo os resultados observados por DEETH & FITZ-GERALD (1976). Nos 9 experimentos realizados, os valores de AGL excederam 1,3 ueq/ml no 6^º dia de armazenagem em 7 dos 9 experimentos realizados. O mesmo valor foi superado no 4^º e 8^º dias, nos experimentos restantes.

Os valores observados para AGL nos 9 experimentos realizados concordam com CIMIANO & ALVAREZ (1983). Estes autores salientam que ao fim de 24 horas não há excreção de lipases no leite. Contudo, a partir de 48 horas observa-se o aparecimento de lipases microbianas, aumentando a importância das mesmas com o tempo, com um ótimo nas 144 horas (6 dias), a 4°C.

O máximo de atividade lipase ocorre a 15°C ou depois de 3 dias ou mais de incubação segundo COUSIN (1982). As duas temperaturas de armazenagem são diferentes, uma superior e outra inferior aquela utilizada no presente ensaio, porém, os resultados da atividade, lipolítica ocorreram dentro da faixa prevista (4 a 6 dias).

Para os 3 grupos microbianos pesquisados, as relações entre o aumento de suas populações e a quantidade de ácidos graxos livres no leite, durante o transcorrer de cada experimento, encontram-se expressas nas Figuras 1 a 9. Nestas figuras são também apresentadas as correspondentes equações de regressão e ao valor do coeficiente de correlação r . Tais representações gráficas e cálculos foram obtidos a partir dos números apresentados nas Tabelas 7 a 9 do Apêndice, e dos resultados apresentados na Tabela 5.

Observando-se os valores dos coeficientes de correlação apresentados na Tabela 6, verifica-se que houve correlação significativa, a nível de 1% de probabilidade,

FIGURA 1 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 1).

FIGURA 2 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 2).

FIGURA 3 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 3).

FIGURA 4 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 4).

FIGURA 5 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 5).

FIGURA 6 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 6).

FIGURA 7 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 7).

FIGURA 8 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 8).

FIGURA 9 - Relação entre microrganismos e ácidos graxos livres (Experimento 9).

TABELA 6 - Coeficiente de correlação (r) entre ácidos graxos livres e microrganismos.

Experimentos	A G L		
	x		
	Psicrotróficos	Lipolíticos	<i>Pseudomonas</i> sp
1	0,467 ^{ns}	0,933**	0,399 ^{ns}
2	0,939**	0,835**	0,521 ^{ns}
3	0,965**	0,769**	0,855**
4	0,955**	0,933**	0,955**
5	0,831**	0,446 ^{ns}	0,876**
6	0,847**	0,909**	0,967**
7	0,899**	0,909**	0,967**
8	0,875**	0,942**	0,783**
9	0,765**	0,825**	0,827**

entre psicrotróficos e AGL em 8 experimentos, sendo não significativa apenas no experimento nº 1. A correlação entre microrganismos lipolíticos e AGL também foi significativa (1%) em 8 dos experimentos realizados. Porém para *Pseudomonas sp* a correlação foi significativa (1%) em 7 dos 9 experimentos.

LUCK et alii (1980) não observaram correlação significativa entre o logarítmo da contagem inicial de psicrotróficos e o tempo de conservação de leite pasteurizado a 7°C. É necessário que a correlação seja feita após alguns dias de armazenagem.

Os valores observados no presente trabalho, são semelhantes aos encontrados por KASON et alii (1972), que observou um coeficiente de correlação de 0,90 entre valor ácido livre e contagem bacteriana em leite pasteurizado, armazenado por 7 dias a 4°C.

5. CONCLUSÕES

Nas condições utilizadas para o presente experimento, foi possível estabelecer as seguintes conclusões:

- a - Os números médios encontrados para as contagens de psicrotróficos e lipolíticos atingiram ou ultrapassaram 10^6 ufc/ml a partir do 4º dia de armazenagem, indicando semelhança entre os dois grupos.
- b - *Pseudomonas sp* não apresentou crescimento igual quando comparado a psicrotróficos e lipolíticos, atingindo 10^6 ufc/ml em tempos diferentes de armazenagem (a partir do 6º dia na maioria dos experimentos).
- c - O teor de ácidos graxos livres permaneceu constante ou com pouca variação até o 4º dia de armazenagem, evidenciando baixa atividade microbiana nesse período.
- d - Houve correlação positiva e altamente significativa entre os teores de ácidos graxos livres e crescimento de

microrganismos psicrotróficos, lipolíticos e *Pseudomonas* *sp* durante a armazenagem.

e - Os resultados obtidos indicam que a maior parte dos microrganismos psicrotróficos são lipolíticos e do gênero *Pseudomonas*.

f - O leite pasteurizado tipo C, permanece com níveis aceitáveis de lipólise até o 4º dia de armazenagem a 10°C.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIFAX, R. Activité lipolytique de quelques microorganismes (1^{re} Bacteries). *Le Lait*, Liège, 52(515-516):283-96, 1972.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of dairy products*, 13 ed. Washington D. C., 1972. 345p.

ANDERSSON, R.E.; HEDLUNG, C.B.; JONSSON, V. Thermal inactivation of a heat-resistant lipase produced by psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, 62(3):361-7, 1979.

AZUMA, Y.; NEWTON, S.B.; WITTER, L.D. Production of psychrophilic mutants from mesophilic bacteria by ultraviolet irradiation. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, 45(12):1529-30, 1962.

BARNARD, S.E. Importance of shelf-life for consumers of milk. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, 55(1):134-6 1971.

BEHMER, M.L.A. *Tecnologia do leite*. 9.ed. São Paulo, Nobel, 1979. 320p.

BLOQUEL, R. & VEILLET-PONCET, L. Evolution et détermination de la flore bactérienne d' un lait cru réfrigéré paucimicrobien en fonction du temps. *Le Lait*, Liège, 60 (598):474-86, 1980.

BRANDT, M.J. & LEDFORD, R.A. Influence of milk aeration on growth of psychrotrophic Pseudomonads. *Journal of Food Protection*, Ames, 45(2):132-4, 1982.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Animal. Divisão de Supervisão de Produtos de Origem Animal. *Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal*; aprovado pelo Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952. Rio de Janeiro, 1953. p.154-5.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 001, 2, 28 de janeiro 1987. *Diário Oficial*, Brasília, 12 de fevereiro 1987.

CHANDLER, R.E. & McMEEKIN, T.A. Temperature function integration and the prediction of the shelf-life of milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, Victoria, 40 (1):10-3, 1985a.

CHANDLER, R.E. & McMEEKIN, T.A. Temperature function integration and its relationship to the spoilage of pasteurized, homogenized milk. *The Australia Journal of Dairy Technology*, Victoria, 40(1):37-40, 1985b.

CHAZAL, M.P. & CHILLIARD, Y. Effects respectifs du stade de lactation, du stade de gestacion et du niveau de production sur la lipolyse spontanée du lait de vache. *Le Lait*, Liège, 67(3):379-92, 1987.

CHILLIARD, Y. Variations physiologiques des activités lipasiques et de la lipolyse spontanée dans les laits de vache, de chèvre et de femme: revul bibliographique. *Le Lait*, Liège, 62(611-612):1-31, 1982.

CHOPRA, A.K.; CHANDER, H.; BATISH, U.K.; RANGANATHAN, B. Activité lipolytique de *Penicillium chrysorgenum*. *Le Lait*, Liège, 60(593-594):184-91, 1980.

CIMIANO, P.C. & ALVAREZ, J.A.G. A lipólise e sua influência na qualidade do leite. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, 38(230):27-33, 1983.

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection*, Ames, 45(2):172-207, 1982.

DEETH, H.C. & FITZ-GERALD, C.H. Lipolysis in dairy products: a review. *The Australian Journal of Dairy Technology*, Victoria, 31(2):53-63, 1976.

DEETH, H.C.; FITZ-GERALD, C.H.; WOOD, A.F. A convenient method for determining the extent of lipolysis in milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, Victoria, 30: 109-11, sept. 1975.

DRIESSEN, F.M. Lipases and proteinases in milk. Occurrence, heat inactivation and their importance for the keeping quality of milk products. *Dairy Science Abstracts*, Shinfield, 46(1-3):176, 1984.

DRIESSEN, F.M.; JELLEMA, A.; VAN LUIN, F.J.P.; STADHOUDERS, J.; WOLBERS, G.J.M. The estimation of the fat acidity in raw milk. An adaptation of the BDI method, suitable for routine assays. *Neth. Milk Dairy Journal*, Wageningen, 31:40-55, 1977.

FONSECA, F.A. *Fisiologia da Lactação*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1985. 137p.

GEBRE-EGZIABHER, A.; CHEONG, A.K.; BLANKENAGEL, G.; HUMBERT, E.S. Extended storage of raw milk. I. Effect on microbiological quality. *Dairy Science Abstracts*, Shinfield, 48(4):204, 1986.

- GYLLENBERG, H.G. & EKLUND, E. A taxonomic survey of the psychrophilic bacteria in milk and milk products. *Milchwissenschaft*, Munich, 21(5):261-5, 1966.
- HARRIGAN, W.F. & McCANCE, M.E. *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. London, Academic Press Inc., 1976. 452p.
- INGRAM, M. Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Annales de L'Institut Pasteur de Lille*, S.C. 16:111-8, 1964.
- JURCZAK, M.E. Effect of shaking and vibration on lipolysis of raw milk. *Dairy Science Abstracts*, Shinfield, 49(8): 604, 1987.
- KASON, C.M.; PAVAMANI, I.V.P.; NAKAI, S. Simple test for milk lipolysis and changes in rancidity in refrigerated pasteurized milk. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, 55(10):1420-3, 1972.
- KUZDZAL-SAVOIE, S.; AUCLAIR, J.E.; MOURGUES, R.; LANGLOIS, D. La lipolyse dans le lait refroidi. *Le Lait*, Liège, 55(548):530-43, 1975.
- LAW, B.A. Reviews of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and

milk products. *Journal of Dairy Research*, London, 46: 573-88, 1979.

LÜCK, H.; DYNKELD, M.; BERG, M.v.d. Shelf life tests on pasteurized milk. *South Afric. Journal of Dairy Technology*, Verwoerdburg, 12(3):107-12, 1980.

MARTH, E.H. Bacterias psicrotróficas. Problemas que pueden causar en la industria lechera. *Industria Lechera*, Buenos Aires, 653:13-6, 1977.

MISTRY, V.V. & KOSIKOWSKI, F.V. Influence of potassium sorbate and hydrogen peroxide. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, 68(3):605-8, 1985.

MOTTAR, J. Heat resistant enzymes in UHT milk and their influence on sensoric changes during uncooled storage. *Milchwissenschaft*, Munick, 36(2):87-91, 1981.

MOUILLET, L.; LUQUET, F.M.; NICOD, H.; BOUDIER, J.F.; MAHIEU, H. La lipolyse des laits. Etude d'une méthode rapide de mesure. *Le Lait*, Liège, 61(603-604):171-86, 1981.

MOURGUES, R. & AUCLAIR, J. Durée de conservation à 4°C et 8°C du lait pasteurisé conditionné aseptiquement. *Le Lait*, Liège, 53(528):481-90, 1973.

- MUIR, D.D. & PHILLIPS, J.D. Prediction of the shelf life of raw milk during refrigerated storage. *Milchwissenschaft*, Munick, 39(1):7-11, 1984.
- OEHLRICH, H.K. & MCKELLAR, R.C. Evaluation of an 18°C/45 - hour plate count technique for the enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, Ames, 46(6):528-9, june 1983.
- OVERCAST, W.W. Psychrophilic microorganisms and keeping quality of milk and its products. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, 51(8):1336-8, 1968.
- PINHEIRO, A.J.R.; LISKA, B.J.; PARMELEE, C.E. Heat stability of lipases of selected psychrophilic bacteria in milk and Purdue Swiss type cheese. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, 48(7):983-4, 1965.
- PUNCH, J.D.; OLSON, J.C.; THOMAS, E.L. Psychrophilic bacteria. III. Population levels associated with flavor or physical change in milk. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, 48(9):1179-83, 1965.
- ROWE, M.T. & GILMOUR, A. Nutritional factors affecting extracellular enzyme production by *Pseudomonas fluorescens* B52. *Milchwissenschaft*, Munick, 38(12):705-7, 1983.

- SADOVSKI, A.Y.; GORDIN, S.; FOREMAN, I. Psychrotrophic growth of microorganisms in a cultured milk product. *J. Food Protection*, Ames, 43(10):765-8, 1980.
- SAZANO, M.; KUMANO, Y.; OKADA, M.; CHONAN, T. Studies on lipolysis by psychrotrophic bacteria. *Dairy Science Abstracts*, Shinfield, 46(5):346, 1984.
- SELSELET-ATTOU, G.; CHILLIARD, Y.; BAS, P.; MORAND-FEHR, P. Comparaison de deux méthodes de dosage des acides gras libres totaux du lait de chèvre. *Le Lait*, Liège, 64(635-636-637):72-4, 1984.
- SEVERINA, L.O. & BASHKATOVA, N.A. Lipases of gram-negative bacteria (review). *Applied Biochemistry Microbiol.*, New York, 17(2):131-43, 1981.
- SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; MacRAE, I.C. Growth of lipolytic psychrotrophic pseudomonads in raw and ultra-heat-treated milk. *Journal of Applied Bacteriology*, Reagind, 61:395-400, 1986.
- SHELLEY, A.W.; DEETH, H.C.; MacRAE, I.C. A numerical taxonomic study of psychrotrophic bacteria associated with lipolytic spoilage of raw milk. *Journal of Applied Bacteriology*, Reagind, 62:197-207, 1987.

SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 6.ed.
Ames, Iowa State University, 1974. 593p.

VAN DER ZANT, W.C. & MOORE, A.V. The influence of certain factors on the bacterial counts and proteolytic activities of several psychrophilic organisms. *J. Dairy Science*, Lancaster, 38(7):743-50, 1955.

WITTER, L.D. Psychrophilic bacteria - a review. *J. Dairy Science*, Lancaster, 44(6):983-1015, 1961.

WOLFSCHROON-POMBO, A.F.; CARVALHO, F.A.; FISCHER, R. Ácidos graxos livres no leite de plataforma. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, 41(244):8-12, 1986.

A P Ê N D I C E

FIGURA 10 - Comparação entre o número de microrganismos e teor de ácidos graxos livres (Experimento 1).

FIGURA 11 - Comparação entre o número de microrganismos e teor de ácidos graxos livres (Experimento 2).

FIGURA 12 - Comparação entre o número de microrganismos e teor de ácidos graxos livres (Experimento 3).

FIGURA 13 - Comparação entre o número de microrganismos e teor de ácidos graxos livres (Experimento 4).

FIGURA 14 - Comparação entre o número de microrganismos e teor de ácidos graxos livres (Experimento 5).

FIGURA 15 - Comparação entre o número de microrganismos e teor de ácidos graxos livres (Experimento 6).

FIGURA 16 - Comparação entre o número de microrganismos e teor de ácidos graxos livres (Experimento 7).

FIGURA 17 - Comparação entre o número de microrganismos e teor de ácidos graxos livres (Experimento 8).

FIGURA 18 - Comparação entre o número de microrganismos e teor de ácidos graxos livres (Experimento 9).

TABELA 7 - Logarítmo do número médio de microrganismos psicrotróficos

Experimentos	Tempo de armazenagem (dias)					
	0	2	4	6	8	10
1	-	-	7,462	9,146	9,079	8,146
2	-	-	7,176	7,690	8,255	8,845
3	-	-	5,681	6,982	7,740	11,301
4	-	-	5,863	7,462	8,964	9,041
5	1,000	3,279	6,944	9,505	10,477	11,813
6	4,114	7,000	7,954	8,602	9,477	10,699
7	2,792	2,505	7,832	9,653	11,000	13,415
8	4,580	7,591	7,380	9,602	11,079	11,000
9	4,114	6,079	7,653	7,544	7,531	8,756

TABELA 8 - Logarítmo do número médio de microrganismos lipolíticos

Experimentos	Tempo de armazenagem (dias)					
	0	2	4	6	8	10
1	-	4,505	6,633	7,146	7,999	8,079
2	5,740	5,977	6,531	7,398	7,505	7,991
3	5,255	-	7,447	8,964	9,477	9,00
4	-	4,079	5,000	7,362	8,785	8,699
5	3,531	4,000	6,939	8,556	5,000	8,000
6	1,477	1,000	5,176	7,462	8,623	10,362
7	2,505	6,690	7,146	9,531	9,799	10,041
8	5,415	5,041	7,176	9,602	10,265	11,653
9	3,939	5,505	7,255	7,342	7,462	8,944

TABELA 9 - Logarítmo do número médio de *Pseudomonas sp*

Experimentos	Tempo de armazenagem (dias)					
	0	2	4	6	8	10
1	-	-	5,740	7,672	6,342	7,000
2	-	4,000	5,079	6,491	6,361	5,724
3	-	4,000	5,662	6,079	9,491	8,477
4	-	5,000	5,845	7,114	8,863	8,959
5	3,146	4,255	6,863	9,505	10,447	11,724
6	4,903	6,623	5,000	8,477	9,613	11,954
7	2,763	7,544	8,568	9,556	10,612	11,518
8	4,415	6,672	7,397	9,591	10,176	9,301
9	3,982	5,602	7,819	8,477	9,380	10,114