

RODRIGO REZENDE CARDOSO

**INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA PSICOTRÓFICA NO RENDIMENTO DE
QUEIJO MINAS FRESAL ELABORADO COM LEITE ESTOCADO SOB
REFRIGERAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C268i
2006

Cardoso, Rodrigo Rezende, 1979-

Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo minas frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração / Rodrigo Rezende Cardoso. – Viçosa : UFV, 2005.

xii, 43f. : il. ; 29cm.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 38-43.

1. Leite - Bacteriologia. 2. Leite - Resfriamento.
3. Leite - Análise. 4. Queijo-de-minas - Análise.
5. Queijo-de-minas - Rendimento. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 634.124

RODRIGO REZENDE CARDOSO

**INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA PSICROTRÓFICA NO RENDIMENTO DE
QUEIJO MINAS FRESVAL ELABORADO COM LEITE ESTOCADO SOB
REFRIGERAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de março de 2006

Dr^a. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto
(Conselheira)

Prof. Mauro Mansur Furtado
(Conselheiro)

Prof^a. Míriam Teresinha dos Santos

Prof. Antônio Fernandes Carvalho

Prof^a. Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre ilumina o meu caminho e me concede paz, tranqüilidade, saúde e alegria para realizar meus projetos de vida.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente, ao Coluni, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e ao Departamento de Microbiologia pela excelente formação e oportunidades concedidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Fapemig pelo apoio financeiro à pesquisa.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti pela oportunidade, amizade, dedicação, pelos quatro anos de orientação, ótima convivência e valiosa colaboração.

À doutora Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG pelas sugestões, conselhos, apoio contínuo e, especialmente, pela amizade.

Ao professor Mauro Mansur Furtado pelo aconselhamento e participação na tese.

Aos professores Antônio Fernandes Carvalho e Míriam Teresinha dos Santos pela participação na defesa de tese.

A todos os funcionários do laticínios Funarbe, especialmente, Aristides, José Carlos e Helvécio, pela oportunidade, colaboração e amizade.

Ao queijeiro Oswaldo, funcionário do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela participação fundamental na fabricação dos queijos, disposição, dedicação e amizade.

Ao José Manoel, estudante de doutorado do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela ajuda nas análises físico-químicas do leite, empréstimo do dessecador e pela amizade.

A todos meus amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Patógenos e Anaeróbios, especialmente: Esther, Uelinton, Adriana Leandro, Simones, Carol, Selma, Eliane, Maurílio, Vanessa, Raquel, Eliseth, Ana Diolina, Adriana dos Reis, Renata, Flávia, Bete, Marcelo, Rafael, Janaína, Tássia, Ana Andréia, Andréia, Emilene, dentre outros, pela amizade, brincadeiras, ótima convivência e auxílio.

Ao pessoal do Laboratório de Micorrizas e Fisiologia que cederam equipamentos para análises de proteína e atividade enzimática.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, especialmente ao Sr. Paulo, Cesário, José Carlos, Pablo, Evandro, José Reinaldo e Danilo pela amizade, brincadeiras e ajuda.

À Aparecida, Laura e Nilcéa pelo auxílio constante e pela amizade.

Aos meus pais, Aloísio e Maria das Graças, pelo amor, estímulo, apoio e formação que foram fundamentais em minha vida acadêmica.

Aos meus irmãos Luciana, Adriano, Priscila e Carine, meu sobrinho Rafael, primos, tios e cunhados pelo carinho, estímulos e apoio constantes.

À Juliana, minha namorada, pelo apoio, carinho e amor que foram importantes para o meu crescimento pessoal e acadêmico.

A todos os amigos que colaboraram na realização de minhas conquistas, desde do ensino fundamental até a presente data, pois a amizade é o que fica para sempre em nossos corações.

Biografia

Rodrigo Rezende Cardoso, filho de Aloísio de Castro Cardoso e Maria das Graças Pereira Cardoso, nasceu em Viçosa, Minas Gerais no dia 05 de julho de 1979.

Em janeiro de 2004, graduou-se como Engenheiro de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Em março de 2004, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Microbiologia de Alimentos.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Produção de queijos no Brasil.....	3
2.2. Queijo Minas Frescal.....	4
2.3. Rendimento de queijos.....	5
2.4. Granelização e refrigeração do leite cru no Brasil.....	6
2.5. Bactérias psicrotróficas produtoras de enzimas hidrolíticas no leite cru refrigerado	7
2.6. Bactérias psicrotróficas e o rendimento da fabricação de queijos.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Matéria-prima para a fabricação de queijo Minas Frescal.....	15
3.2. Fabricação dos queijos	16
3.3. Análises do leite cru	16
3.3.1. Análises físico-químicas	16
3.3.2. Determinação de células somáticas	18
3.3.3. Análises microbiológicas	18

3.3.4. Determinação da atividade de enzimas hidrolíticas.....	19
3.4. Análises do soro.....	20
3.5. Análises do queijo.....	20
3.6. Cálculo do rendimento do queijo Minas Frescal.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 – Matéria-prima para a fabricação de queijos.....	22
4.2 Qualidade bacteriológica do leite cru refrigerado e do leite cru recém-ordenhado.....	23
4.2.1. Crescimento de bactérias durante a estocagem do leite cru refrigerado.....	26
4.3. Atividade proteolítica e lipolítica no leite cru.....	28
4.4. Rendimento da fabricação de queijos.....	30
4.4.1. Perdas financeiras.....	35
5. CONCLUSÕES.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	388

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Produção de queijos no Brasil sob inspeção federal.....	4
Figura 2 – Fluxograma da fabricação do queijo Minas Frescal.....	17
Figura 3 – Contagem inicial média de bactérias mesofílicas, psicotróficas, psicotróficas proteolíticas e psicotróficas lipolíticas no leite cru recém-ordenhado (■) e leite cru refrigerado (□). Média de três repetições.....	24
Figura 4 – Crescimento de bactérias mesofílicas (—◆—), psicotróficas (—■—), psicotróficas proteolíticas (—▲—) e psicotróficas lipolíticas (—×—) durante a estocagem do leite cru a 10°C.....	27
Figura 5 – Atividade de enzimas hidrolíticas durante a estocagem do leite cru refrigerado a 10 °C. (a) – atividade proteolítica, (b) – atividade lipolítica. Média de três repetições.....	29
Figura 6 – Evolução do pH do leite cru refrigerado durante a estocagem a 10 °C. Média de três repetições.....	32
Figura 7 – Logarítmo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC mL ⁻¹) de bactérias psicotróficas (—◆—), psicotróficas proteolíticas (—■—) e psicotróficas lipolíticas (—▲—) no leite cru refrigerado e o rendimento do queijo Minas Frescal em g ST no queijo L ⁻¹ de leite.....	33

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1– Composição físico-química e contagem de células somáticas das amostras de leite cru utilizadas na fabricação do queijo Minas Frescal. Valores correspondem à média de três repetições.....	23
Tabela 2 – Rendimento de queijo Minas Frescal fabricado com leite cru recém-ordenhado e leite cru refrigerado armazenado a 10°C. Valores correspondem à média de três repetições.....	31
Tabela 3 – Composição do soro obtido da fabricação de queijo Minas Frescal e cifras de perdas dos constituintes do leite no soro. Valores correspondem à média de três repetições.....	35

RESUMO

CARDOSO, Rodrigo Rezende, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2006. **Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Conselheiros: Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto e Mauro Mansur Furtado.

A estocagem do leite cru sob refrigeração favorece a seleção de bactérias psicrotróficas, incluindo espécies produtoras de proteases e lipases termorresistentes que são associadas à perdas de qualidade do leite e seus derivados. Para as indústrias de queijos, um dos principais problemas causados em decorrência da contaminação e do crescimento de bactérias psicrotróficas no leite cru refrigerado é a redução do rendimento durante a fabricação. O objetivo deste trabalho foi relacionar o rendimento do queijo Minas Frescal com a população de bactérias psicrotróficas no leite cru refrigerado granelizado. O leite cru foi estocado a 10 °C, por até quatro dias, posteriormente pasteurizado e, diariamente, utilizado para a fabricação de queijo Minas Frescal. Paralelamente, foram quantificadas as microbiotas psicrotrófica, psicrotrófica proteolítica e lipolítica e a atividade proteolítica e lipolítica do leite cru. A manutenção do leite cru a 10 °C possibilitou um crescimento da microbiota psicrotrófica, com um aumento de dois ciclos

logarítmicos na população de bactérias psicotróficas proteolíticas e de, aproximadamente, três ciclos logarítmicos na população de bactérias psicotróficas lipolíticas, após quatro dias de estocagem. As atividades proteolítica e lipolítica aumentaram durante a estocagem do leite cru refrigerado, apresentando valores superiores aos do leite recém-ordenhado. Foi constatada uma redução de 6,78 % no rendimento em termos de litros de leite por quilograma de queijo e de 6,38 % em gramas de sólidos totais no queijo por litro de leite quando o queijo Minas Frescal foi fabricado com leite refrigerado armazenado por quatro dias. O leite cru que resultou nestas perdas de rendimento apresentava uma população de 10^8 UFC mL⁻¹ a 10^9 UFC mL⁻¹ de bactérias psicotróficas e a população de bactérias psicotróficas proteolíticas e lipolíticas era superior a 10^7 UFC mL⁻¹. Verificou-se ainda, para o mesmo período de estocagem, um aumento das concentrações de nitrogênio total, gordura e sólidos totais no soro proveniente da fabricação do queijo Minas Frescal. As perdas econômicas decorrentes da redução do rendimento da fabricação de queijo Minas Frescal foram estimadas em US\$ 15,480.00 por mês, para uma indústria de laticínios processadora de 50.000 litros de leite por dia e que destine 33 % do leite captado a fabricação de queijo Minas Frescal .

ABSTRACT

CARDOSO, Rodrigo Rezende, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2006. **Psychrotrophic bacteria present in refrigerated milk on Minas Frescal cheese yield effect.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Committee Members: Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto and Mauro Mansur Furtado.

The raw milk storage under cooling temperatures selects the psychrotrophic bacteria growth including species able to produce heat resistant proteases and lipases that are usually associated with milk quality deterioration. The decrease in the cheese production yield is an important problem associated with the psychrotrophic bacteria growth in the refrigerated raw milk. This work aimed to evaluate the relation between the psychrotrophic bacteria population present in the cooled raw milk and the yield of Minas Frescal cheese production. The raw milk was stored at 10 °C, for up to four days, it was pasteurized, and daily used for the Minas Frescal cheese production. Concomitantly, the number of psychrotrophic, proteolytic and lipolytic psychrotrophic bacteria and protease and lipase activity was evaluated in the raw milk. The raw milk maintenance at 10 °C made possible the psychrotrophic bacteria growth, with an increase of two logarithmic cycles in the proteolytic psychrotrophic bacteria population and of, approximately, three logarithmic cycles in the lipolytic psychrotrophic bacteria population, after four days of

storage. The protease and lipase activities increased during the refrigerated raw milk storage, presenting superior values to the ones of the recently milked milk. A decrease of 6.78 % in liters of milk per kg of cheese and 6.38 % in grams of total solids of cheese per liter of milk when the product was done with cooled milk stored for four days, was observed. The psychrotrophic bacteria number present in that milk varied from 10^8 CFU mL⁻¹ to 10^9 CFU mL⁻¹, and the proteolytic and lipolytic psychrotrophic bacteria populations were higher than 10^7 CFU mL⁻¹. For the same storage period, an increase in the total nitrogen, fat and total solids concentrations in the serum from the Minas Frescal cheese production, was verified. It was estimated that, for an industry able to process 50.000 liters of milk per day, designating 33 % of this amount to produce Minas Frescal cheese, the economic losses associated with the decrease in the cheese production are estimated in US\$ 15,480.00 per month.

1. INTRODUÇÃO

O leite, ao ser secretado do interior da glândula mamária de animais sadios, é isento de microrganismos. A contaminação do leite pode ocorrer a partir do úbere, do ambiente, dos utensílios e equipamentos de ordenha. Como o leite *in natura* contém as condições necessárias para a multiplicação de microrganismos deterioradores, medidas devem ser adotadas para a conservação desta matéria-prima até o seu beneficiamento nas indústrias de laticínios.

A refrigeração do leite cru na fonte de produção e o seu transporte a granel são práticas implementadas em muitas propriedades no Brasil, com os objetivos de melhorar a qualidade do leite, reduzir custos operacionais de produção e aumentar a competitividade com os produtos lácteos importados.

A manutenção do leite cru sob refrigeração favorece o crescimento de bactérias psicrotróficas. Esses microrganismos são capazes de se multiplicar a 7 °C ou menos, independente de sua temperatura ótima de crescimento. A maioria das bactérias psicrotróficas é inativada pela pasteurização ou pelo tratamento UHT, porém, muitas são capazes de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes que podem resultar em problemas tecnológicos, tais como, a formação de sabores estranhos, coagulação e redução do rendimento de produtos derivados do leite.

Perdas econômicas podem ser significativas para as indústrias de queijos, em razão da redução no rendimento da fabricação, provocada pela atividade de proteases e lipases produzidas por bactérias psicotróficas no leite cru refrigerado. As proteases degradam as micelas de caseína do leite, o que aumenta as perdas de compostos solúveis no soro, enquanto, as lipases hidrolisam a gordura do leite, com liberação de ácidos graxos no soro.

Entre os queijos produzidos no Brasil, o queijo Minas Frescal é um dos mais populares, não existindo trabalhos na literatura que estabeleça uma relação do rendimento deste queijo com a população de bactérias psicotróficas no leite cru refrigerado.

Apesar de todas as vantagens que o sistema de granelização oferece, muitas indústrias de laticínios no Brasil têm observado uma redução no rendimento de queijos, após a introdução do leite cru refrigerado como matéria-prima. O objetivo deste trabalho foi relacionar o rendimento de queijo Minas Frescal com a população de bactérias psicotróficas no leite cru refrigerado granelizado.

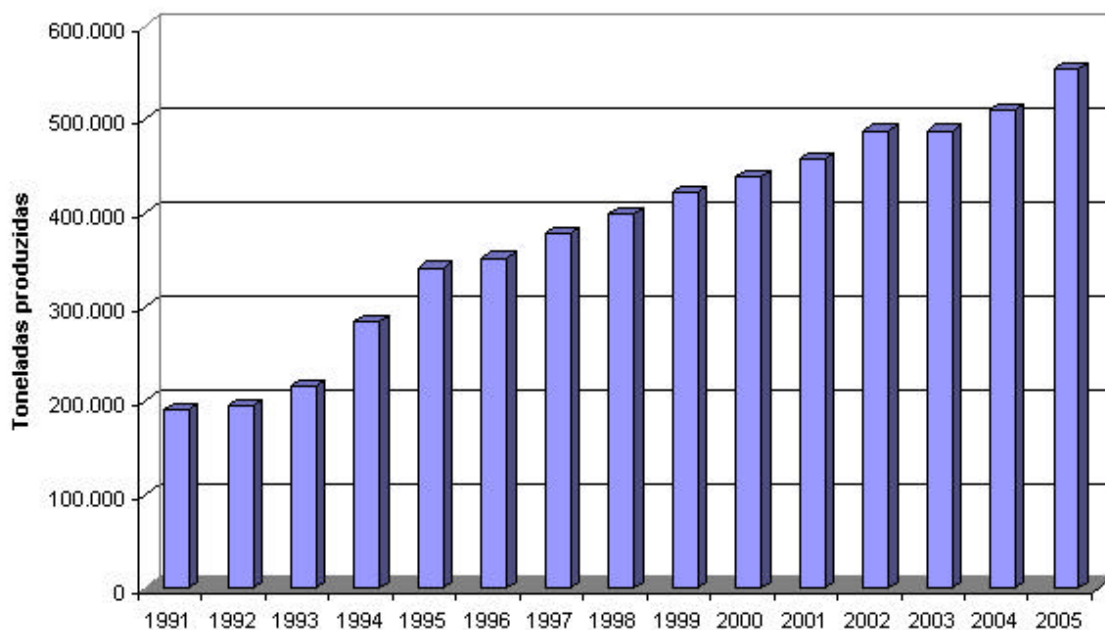
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção de queijos no Brasil

A fabricação de queijos no Brasil é o principal destino do leite produzido no país e, cerca de 33 % do leite captado sob inspeção federal, é destinado a este setor (Embrapa, 2003). Dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijos - ABIQ (2005) registraram que a produção de queijos em estabelecimentos sob inspeção federal ultrapassou 550 mil toneladas em 2005. A produção nacional de queijos vem crescendo no decorrer dos anos, sendo que os maiores aumentos ocorreram nos anos em que a população apresentava maior poder aquisitivo, principalmente, após a implementação do plano real (Figura 1).

Entretanto, o consumo de queijos *per capita* no Brasil é de 2,6 Kg/pessoa/ano, muito inferior ao dos países desenvolvidos, especialmente comparado ao consumo dos países europeus, que alcançam valores acima de 10 Kg/pessoa/ano (Embrapa, 2005).

O estado de Minas Gerais é o maior produtor brasileiro de queijos, com cerca de 215 mil toneladas por ano, o que corresponde, aproximadamente, à metade da produção nacional. A maior parte dessa produção é proveniente de pequenas e médias queijarias. Em algumas regiões do estado, o setor queijeiro emprega cerca de 30 mil famílias de pequenos proprietários rurais e movimenta, mensalmente, em torno de 10 milhões de reais (Perry, 2004).



Fonte: ABIQ (2005)

Figura 1 – Produção de queijos no Brasil sob inspeção federal.

2.2. Queijo Minas Frescal

O queijo Minas Frescal é tradicionalmente produzido no Brasil desde o período colonial, com sua origem de fabricação no estado de Minas Gerais, em especial na cidade do Serro (Rosa, 2004).

O queijo Minas Frescal é definido como queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite e, ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementadas ou não, com ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo fresco, semi-gordo e de muita alta umidade, entre 55 % e 62 %, possuindo formato cilíndrico, peso entre 0,3 kg e 5,0 kg, cor esbranquiçada, odor suave característico e baixa acidez (Brasil, 1997).

É um dos queijos mais populares do Brasil e ocupa o terceiro lugar na escala de produção, com um total aproximado de 34 mil toneladas apenas nos estabelecimentos sob inspeção federal, perdendo apenas para o queijo Mussarela e o queijo Prato (ABIQ, 2005). Trata-se de um queijo de curta durabilidade no mercado, em função do seu alto teor de umidade. É produzido

em fábricas de pequeno, médio e grande porte, possuindo um processo de fabricação simples, com utilização de equipamentos tradicionais (Furtado, 2005). Sua importância no mercado brasileiro é explicada pelo rendimento alto, custo do produto final baixo, simplicidade no processo de fabricação e preço acessível, o que o torna um produto atraente para as indústrias de queijos (Furtado e Neto, 1994; Furtado, 2005).

2.3. Rendimento de queijos

Durante o processo de conversão do leite em queijo, os constituintes do leite são separados em dois grupos, aqueles que ficam retidos na coalhada e aqueles que são perdidos no soro. A coalhada retém a maior parte da gordura e caseína do leite, enquanto o soro contém, principalmente, água, lactose, proteínas e minerais que são solúveis no pH em que o queijo é fabricado (Farkye, 2004).

A viabilidade econômica da fabricação de queijos depende diretamente da quantidade de queijo produzida a partir de um determinado volume de leite, ou seja, do rendimento industrial (Lucey e Kelly, 1994). O rendimento típico de queijo varia de 9 % a 15 % dependendo da composição química do leite, principalmente, caseína e gordura, das perdas dos constituintes do leite no soro e do teor de umidade final do queijo fabricado (Farkye, 2004).

O rendimento da fabricação de queijos pode ser avaliado por meio do rendimento econômico ou rendimento técnico. O rendimento econômico é o volume em litros de leite necessários para fabricar um quilograma de determinado tipo de queijo. Baseado neste rendimento, o empresário calcula o custo final da produção de seu queijo. O rendimento técnico, por outro lado, é aquele no qual de posse de dados sobre a composição físico-química do leite, do soro e queijo são calculadas as cifras de transição do leite para o queijo, o que permite avaliar se houve um bom aproveitamento dos constituintes do leite durante a fabricação do queijo (Furtado, 2005).

Vários fatores afetam o rendimento da fabricação de queijos, tais como, composição química do leite, a composição do queijo, as perdas durante o corte da coalhada, a pasteurização do leite, o uso de cloreto de cálcio, o tipo de

coalho usado e as contagens de células somáticas e de bactérias psicotróficas no leite cru (Lucey e Kelly, 1994; Furtado, 2005).

O rendimento médio da fabricação do queijo Minas Frescal é bastante variável, em função da grande variação no seu teor de umidade. Em média, o rendimento é de 6,0 a 6,5 litros de leite por quilograma de queijo, embora em casos isolados sejam observadas fabricações com rendimento de 5,5 L kg⁻¹ a 5,9 L kg⁻¹ (Furtado, 2005).

2.4. Granelização e refrigeração do leite cru no Brasil

O agronegócio do leite no Brasil passa por um intenso processo de modernização com a implementação do sistema de granelização do leite na fazenda e sua coleta e transporte em caminhões com tanques isotérmicos. Este novo sistema racionaliza o processo de captação do leite junto ao produtor, simplificando-o e reduzindo custos (Santos e Laranja da Fonseca, 2002).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA com objetivos de melhorar a qualidade do leite no país e aumentar as exportações de produtos lácteos, publicou, após dez anos de discussão nacional, envolvendo setores científicos e econômicos do setor leiteiro, a Instrução Normativa nº 51 que estabelece novas normas de produção, identidade, qualidade e transporte do leite cru refrigerado (Brasil, 2002a, b).

De acordo com a Instrução Normativa nº 51 (Brasil, 2002a), no sistema de coleta a granel, os tanques de refrigeração por expansão direta devem ser dimensionados de forma tal que permitam a refrigeração do leite à temperatura igual ou inferior a 4 °C, no período máximo de três horas após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade. Os tanques de refrigeração por imersão devem ser dimensionados de modo que permitam a refrigeração do leite à temperatura igual ou inferior a 7 °C, também no período máximo de três horas, após o término da ordenha, independente de sua capacidade. O uso coletivo de tanques de refrigeração a granel, denominados de tanques comunitários, é admitido, desde que baseados no princípio de operação por expansão direta, não permitindo acumular, em determinada propriedade rural, a produção de mais de uma ordenha para enviá-la, uma única vez ao dia, ao

tanque comunitário. A localização do equipamento deve ser estratégica, facilitando a entrega do leite de cada ordenha no local onde o mesmo estiver instalado. O transporte do leite em latões a temperatura ambiente é também admitido, desde que o estabelecimento processador concorde em trabalhar com esse tipo de matéria-prima, que este leite atinja todos os padrões de qualidade fixados na instrução e que o leite seja entregue em até duas horas após a ordenha.

A Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura (Brasil, 2002a) estabelece ainda que o tempo transcorrido entre a ordenha e o recebimento do leite no estabelecimento industrial, que irá beneficiá-lo, deve ser de, no máximo, 48 horas, independentemente de seu tipo; recomendando como ideal um período não superior a 24 horas. Posteriormente, o leite refrigerado é recolhido e transportado em caminhões providos de tanques isotérmicos até à indústria. A temperatura máxima de conservação do leite é de 7 °C na propriedade rural, em tanques comunitários, e de 10 °C no estabelecimento processador (Brasil, 2002a).

2.5. Bactérias psicotróficas produtoras de enzimas hidrolíticas no leite cru refrigerado

A adoção da estocagem do leite cru em temperaturas de refrigeração reduziu as perdas do leite nas indústrias de laticínios provocadas pela atividade de bactérias mesofílicas fermentadoras de lactose, que acidificavam o leite não refrigerado. Entretanto, a manutenção do leite cru sob refrigeração, por períodos prolongados, favorece a seleção de microrganismos psicotróficos os quais representam um problema para as indústrias de laticínios (Law, 1979; Cousin, 1982; Fairbairn e Law, 1986; Sørhaug e Stepaniak, 1997; Ryser, 1999; Arcuri, 2003; Stepaniak, 2004). Esses microrganismos são capazes de se multiplicar a 7 °C ou menos, independente de sua temperatura ótima de crescimento (Cousin, 1982).

Os microrganismos psicotróficos são ubíquos na natureza e suas principais fontes são o solo, poeira, ar, água, vegetação e fezes (Shah, 1994). O número de microrganismos psicotróficos no leite cru está relacionado com as condições higiênicas de produção e com o binômio tempo e temperatura

no qual o leite é mantido até seu processamento (Cousin, 1982). Quando o leite é obtido em condições sanitárias adequadas, a microbiota psicotrófica representa menos de 10 % da microbiota total do leite fresco, comparado a mais de 75 % sob condições não-sanitárias (Nielsen, 2002). As principais vias de contaminação são os equipamentos de ordenha, utensílios e tanques de estocagem (Frank, 1997). A estocagem prolongada e temperaturas de refrigeração acima de 7 °C também são responsáveis por contagens altas de psicotróficos no leite cru (Murphy e Boor, 2000).

Bactérias psicotróficas Gram-negativas são predominantes na microbiota do leite cru refrigerado (Cousin, 1982; Muir, 1996; Wang e Jayaro, 1999; Pinto, 2004), podendo atingir valores de 10^3 UFC mL⁻¹ a 10^6 UFC mL⁻¹, antes do processamento (Cousin, 1982). Pinto (2004) constatou que 79,3 % dos isolados de bactérias psicotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado eram bactérias Gram-negativas. Dentre as bactérias Gram-negativas, o gênero *Pseudomonas* é predominante na microbiota do leite cru refrigerado e a espécie *P. fluorescens* a mais freqüentemente isolada (Sørhaug e Stepaniak, 1997; Wang e Jayaro, 1999; Pinto, 2004; Alatossava e Alatossava, 2006). Pinto (2004) também relatou que *Pseudomonas* foi o principal gênero encontrado com 34,3 % do total de isolados e *P. fluorescens* a espécie mais comumente isolada com predominância de 29,4 %. Outras bactérias psicotróficas Gram-negativas incluem os gêneros *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* spp (Sørhaug e Stepaniak, 1997).

As bactérias psicotróficas Gram-positivas crescem mais lentamente em temperaturas de refrigeração e sua contribuição para a microbiota total do leite cru diminui durante a estocagem (Cromie, 1992). *Bacillus*, *Micrococcus* e *Arthrobacter* são os gêneros de bactérias Gram-positivas mais freqüentemente isolados (Cousin, 1982; Champagne et al., 1994).

Com exceção do gênero *Bacillus*, a maioria das bactérias psicotróficas não seria um problema sério para a indústria de laticínios, pois são inativadas pela pasteurização (Shah, 1994). Entretanto, muitas produzem enzimas termorresistentes que degradam os componentes do leite durante a estocagem e são capazes de resistir aos tratamentos de pasteurização e UHT (“Ultra High Temperature”), continuando a alterar a qualidade do leite e seus derivados

durante o armazenamento (Fairbain e Law, 1986; Cromie, 1992; Champagne et al., 1994). Métodos utilizados para controlar a população de psicotróficos durante a estocagem do leite cru incluem a termização (60 a 66°C, 5 a 20 segundos) e a manutenção do leite em temperaturas de refrigeração próximas de 2 °C (Banks, 1990; Pinto, 2004).

Entre as enzimas extracelulares termorresistentes produzidas por psicotróficos, proteases e lipases são as que possuem maior impacto na qualidade do leite e derivados, recebendo atenção especial por parte das indústrias de laticínios (Cousin, 1982; Cromie, 1992; Shah, 1994; Sørhaug e Stepaniak, 1997).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* estão entre as produtoras de enzimas hidrolíticas e as proteases e lipases produzidas por elas são bem caracterizadas (Sørhaug e Stepaniak, 1997; Chen, Daniel e Coolbear, 2003).

A maioria das proteases de *Pseudomonas* spp. é metaloenzimas monoméricas de 40 kDa a 50 kDa, contendo um átomo de zinco e de quatro a oito átomos de cálcio (Frank, 1997; Nielsen, 2002; Stepaniak, 2004). Possuem temperatura ótima de atividade entre 30 °C e 45 °C, com atividade significativa em temperaturas de refrigeração (Frank, 1997) e pH ótimo entre 6,5 e 8,0 (Chen, Daniel e Coolbear, 2003). A termorresistência dessas proteases constitui um grande obstáculo para a indústria de laticínios. Atividades residuais superiores a 60 % após a pasteurização e a 20 % após o tratamento UHT têm sido constatadas (Shah, 1994; Muir, 1996). Estima-se que de 70 % a 90 % das amostras de leite cru contenham contaminações por bactérias psicotróficas produtoras de proteases termorresistentes (Shah, 1994). Entretanto, as proteases são sensíveis a temperaturas na faixa de 50 °C a 60 °C, em razão da autodegradação (Sørhaug e Stepaniak, 1997).

A maior produção de proteases por psicotróficos ocorre, em geral, no final da fase logarítmica e início da fase estacionária de crescimento (Kolmann et al. 1991; Pinto, 2004). Essas enzimas agem, preferencialmente, sobre a caseína, especialmente sobre a κ -caseína (Gebre-Egziabher, Humbert e Blankenagel, 1980; Chen, Daniel e Coolbear, 2003) o que pode causar uma desestabilização das micelas de caseína, podendo levar à coagulação do leite. As frações α e β -caseínas também são hidrolisadas, sendo que a refrigeração do leite provoca um aumento na fração de α -caseína solúvel, tornando-a mais

susceptível a proteólise (Cromie, 1992). Entretanto, nenhum sítio de clivagem específico foi ainda detectado nas frações de caseína (Sørhaug e Stepaniak, 1997).

Durante o crescimento em leite a 4 °C, muitas espécies de *Pseudomonas* podem produzir proteases suficientes para hidrolisar toda a caseína disponível em peptídeos solúveis (Sørhaug e Stepaniak, 1997). Wang e Jayaro (2001) observaram que 80 % dos isolados de *P. fluorescens* do leite cru refrigerado apresentavam atividade proteolítica. Pinto (2004) avaliou o efeito do crescimento de dois isolados de *P. fluorescens* sobre as proteínas do leite, incubando as amostras de leite a 2 °C, 4 °C, 7 °C e 10 °C e inoculando-as com uma população de , aproximadamente, 10^6 UFC mL⁻¹. Este autor constatou, inclusive a 2 °C, alterações na fração de κ -caseína e uma hidrólise de todas as frações de caseína nas amostras de leite cru estocadas a 4 °C por de quatro dias. Nesse trabalho, a manutenção das amostras de leite cru a 7 °C e 10 °C acelerou a deterioração das frações caseínicas, observando-se com 48 horas, a 7 °C, a degradação das frações κ e β -caseína e o aparecimento da para- κ -caseína.

Os principais problemas tecnológicos provocados por atividade de proteases de psicotróficos incluem a coagulação de produtos lácteos, redução no rendimento de queijos e desenvolvimento de defeitos sensoriais durante a estocagem (Shah, 1994). Polipeptídeos de massas moleculares baixas e aminoácidos liberados da degradação das caseínas podem estar relacionados com a formação de sabor amargo no leite e derivados (Cromie, 1992).

Além de proteases microbianas, estão também presentes no leite proteases nativas termoestáveis, conhecidas como plasmina (Nielsen, 2002). A plasmina está presente no leite como seu precursor inativo, o plasminogênio. Plasmina, plasminogênio e ativadores de plasminogênio encontram-se associados, principalmente, às micelas de caseína do leite (Nielsen, 2002; Stepaniak, 2004). Contagens altas de células somáticas no leite cru resultam na conversão de quantidades significativas de plasminogênio em plasmina, e subsequente proteólise da caseína. A plasmina hidrolisa principalmente a β -caseína e α_{S2} -caseína e, em menor extensão, α_{S1} -caseína, enquanto a κ -caseína é resistente à hidrólise por esta enzima (Nielsen, 2002; Chen, Daniel e

Coolbear, 2003). Proteases produzidas por *Pseudomonas* podem romper as micelas de caseína e liberar componentes do sistema plasmina no soro durante a fabricação de queijos (Stepaniak, 2004).

As lipases de psicrotróficos, como as proteases, também são produzidas principalmente ao final da fase logarítmica ou início da fase estacionária de crescimento (Frank, 1997). As lipases produzidas por *Pseudomonas* possuem massa molecular de 30 kDa a 50 kDa, com pH ótimo de atividade entre 7,0 e 9,0 (Chen, Daniel e Coolbear, 2003) e temperatura ótima entre 30 °C e 40 °C, apresentando, da mesma forma que as proteases, atividade considerável a temperaturas de refrigeração (Frank, 1997). As lipases produzidas por psicrotróficos são, freqüentemente, termorresistentes podendo apresentar atividade residual de 25 % após a pasteurização e de 9 % após tratamento UHT (Shah, 1994). A maioria das lipases tem especificidade para as posições sn-1 e sn-2 de triacilgliceróis e algumas hidrolisam diacilgliceróis e monoacilgliceróis mais rápido do que triacilgliceróis. Lipases bacterianas são capazes de hidrolisar os glóbulos de gordura do leite, porém o modo de acesso e o mecanismo de ação ainda não estão completamente definidos (Chen, Daniel e Coolbear, 2003). Os ácidos graxos insaturados liberados durante a lipólise são susceptíveis à oxidação, originando aldeídos e cetonas responsáveis pelo desenvolvimento de sabores desagradáveis (Chen, Daniel e Coolbear, 2003). Sabores indesejáveis como ranço, amargo, sujo, sabão, metálico, oxidado ou adstringente, atribuídos a atividade lipolítica de psicrotróficos, podem tornar o leite e produtos derivados inaceitáveis para o consumidor (Cousin, 1982; Champagne et al., 1994; Chen, Daniel e Coolbear, 2003).

O leite também contém lipases nativas. A lipase lipoprotéica (LPL) é a mais bem caracterizada. A LPL encontra-se associada principalmente a micelas de caseína, sendo inativada completamente pela pasteurização. Esta enzima, normalmente, não é ativa contra o glóbulo de gordura intacto do leite. Entretanto, a agitação, homogeneização e mudanças rápidas de temperaturas durante a estocagem do leite cru podem estimular a atividade da LPL, resultando em lipólise (Chen, Daniel e Coolbear, 2003; Stepaniak, 2004).

2.6. Bactérias psicotróficas e o rendimento da fabricação de queijos

Para as indústrias de queijos, os principais problemas causados em decorrência da contaminação e crescimento de psicotróficos no leite refrigerado incluem o desenvolvimento de sabores indesejáveis e a redução do rendimento na fabricação (Banks et al., 1988; Cromie, 1992).

Vários estudos têm demonstrado uma redução no rendimento de queijos fabricados a partir de leite cru com contagem alta de psicotróficos obtida após estocagem sob refrigeração (Cousins et al., 1977; Nelson e Marshall, 1977; Aylward, O'Leary e Langlois, 1980; Hicks et al., 1982; Yan, Langlois e O'Leary, 1983; Stofer e Hicks, 1983; Ellis e Marth 1984; Hicks et al., 1986; Banks et al., 1988; Banks, 1990; Moura, 1997).

Em geral, a população de bactérias psicotróficas deve ser superior a 10^6 UFC mL⁻¹ no leite cru refrigerado para que haja uma redução no rendimento de queijos (Lucey e Kelly, 1994). Cousins et al. (1977) relataram que uma população superior a $2,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ promoveu a hidrólise das frações de caseína em polipeptídeos, após três dias de estocagem do leite, com conseqüente decréscimo na produção de queijos de, aproximadamente, 5 %. Nelson e Marshall (1977) avaliaram o efeito do crescimento de nove isolados de bactérias psicotróficas proteolíticas sobre o rendimento de queijo. Estes autores observaram uma redução significativa do rendimento de queijo somente quando a população de psicotróficos proteolíticos foi superior a 10^7 UFC mL⁻¹. O rendimento de queijo Cottage diminuiu de 2,5 % a 3,0 % por dia de estocagem do leite cru a 5 °C, depois que a contagem de bactérias psicotróficas atingiu 10^6 UFC mL⁻¹ (Aylward, O'Leary e Langlois, 1980). Uma redução no rendimento de queijo de 4,5 %, 2,3 % e 16,6 %, respectivamente, produzidos a partir de leite estocado a 4 °C por oito dias e a 7 °C por seis e oito dias foram constatadas apenas quando a contagem de psicotróficos foi superior a 10^8 UFC mL⁻¹ (Yan, Langlois e O'Leary, 1983).

Ellis e Marth (1984) observaram que o crescimento de espécies proteolíticas de *Pseudomonas* e *Flavobacterium*, inoculadas em leite refrigerado a 7 °C, promoveu uma redução de 1,4 % a 4,2 % no rendimento de queijo Cheddar. As maiores perdas ocorreram entre o quinto e o sétimo dia de estocagem do leite, quando as contagens de psicotróficos estavam entre 10^6

UFC mL⁻¹ a 10⁸ UFC mL⁻¹. Hicks et al. (1986) constataram que o rendimento de queijo Cheddar era afetado pela população inicial de bactérias psicotróficas e o tempo de estocagem do leite cru. Nesse trabalho foi observado uma perda no rendimento de até 0,5 % por dia em queijos fabricados com leite com contagem de bactérias psicotróficas acima de 10⁶ UFC mL⁻¹. Banks et al. (1988) observaram um decréscimo no rendimento de queijo Cheddar, somente quando a contagem de bactérias psicotróficas no leite cru estocado a 6 °C excedeu 1,0 x 10⁷ UFC mL⁻¹. Moura (1997) relatou uma redução de 5 % no rendimento de queijo Parmesão fabricado a partir de leite refrigerado estocado por cinco dias a 4 °C e inoculado com uma população inicial de, aproximadamente, 10⁶ UFC mL⁻¹ de *P. fluorescens*.

Proteases produzidas por psicotróficos no leite degradam as micelas de caseína liberando produtos solúveis, tais como polipeptídeos e aminoácidos, que podem ser perdidos no soro ao invés de formarem parte do coágulo, reduzindo o rendimento de queijos (Lucey e Kelly, 1994). As perdas de proteínas no processo de fabricação de queijos podem ser indicadas pelo aumento dos valores de nitrogênio no soro (Cromie 1992). Cousin e Marth (1977) observaram um considerável aumento no teor de nitrogênio total no soro de queijo fabricado com leite inoculado com isolados de *Pseudomonas* e *Flavobacterium*, sugerindo uma redução do rendimento de queijos, devido à hidrólise da caseína por esses microrganismos. Yates e Elliot (1977) reportaram um aumento significativo no conteúdo de proteína do soro de queijos fabricados a partir de leite inoculado com psicotróficos, resultando em uma redução de até 3,5 % na proteína disponível para fabricação de queijos.

A degradação proteolítica da caseína também pode causar uma maior retenção de água na massa de queijos fabricados com leite estocado sob refrigeração, com conseqüente aumento da umidade dos produtos, colocando-os, freqüentemente, em desacordo com os limites legais (Stofer e Hicks, 1983; Yan et al., 1983; Vassiliadou e Alichanidis, 1984; Hicks et al., 1986; Moura, 1997).

O rendimento de queijos também pode ser reduzido em função da atividade de enzimas lipolíticas sobre os triacilglicerídeos com conseqüente liberação de ácidos graxos no soro e aumento das perdas de gorduras (Stofer e Hicks, 1983; Cromie, 1992; Moura, 1997). Uma redução no rendimento de

queijos fabricados com leite inoculado com *Pseudomonas* e *Bacillus* foi constatada por Hicks et al. (1982). Esses autores concluíram que a redução no rendimento resultou tanto da degradação lipolítica como proteolítica do leite cru e estas corresponderam a 45 % e 55 % da perda de matéria seca, respectivamente. Hicks et al. (1986) relataram uma queda no teor de gordura da massa de queijo Cheddar e um aumento na concentração de ácidos graxos no soro durante a estocagem do leite cru.

As perdas econômicas para as indústrias de queijos com a redução do rendimento provocado pelo crescimento de psicrófilos no leite cru refrigerado podem ser consideráveis (Stofer e Hicks, 1983; Hicks et al., 1986; Cromie, 1992). As perdas estimadas por Yan et al. (1983) foram da ordem de US\$ 5,32, US\$ 1,43 e de US\$ 0,74 por 100 kg de leite para queijos fabricados a partir de leite estocado a 7 °C por oito dias, a 4 °C por oito dias e a 7 °C por seis dias, respectivamente.

Não existem dados disponíveis na literatura consultada sobre a relação entre a população de bactérias psicrófilas proteolíticas e lipolíticas no leite cru e o rendimento de queijo Minas Frescal. Esta informação pode orientar as indústrias produtoras de queijos sobre uma possível redução no rendimento de queijos, provocada pelo crescimento e atividade enzimática de bactérias psicrófilas no leite cru refrigerado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa-MG, em parceria com uma indústria de laticínios localizada na Zona da Mata Mineira, receptora e processadora de, aproximadamente, 14.200 litros de leite por dia. Este laticínios conta com uma rede de fornecedores de matéria-prima composta de 16 tanques individuais e 13 tanques coletivos, atendendo a, aproximadamente, 180 cooperados. Todo leite cru é recebido pela empresa de forma granelizada. Sua produção mensal de queijo Minas frescal é de, aproximadamente, 150 kg.

3.1. Matéria-prima para a fabricação de queijo Minas Frescal

O leite cru refrigerado foi obtido de uma rota definida de coleta do laticínios, pré-estabelecida de acordo com o horário de chegada do caminhão na plataforma de recepção, de modo que, nas três repetições do experimento, o leite utilizado fosse proveniente dos mesmos produtores. Este leite permaneceu estocado sob refrigeração na fazenda por até 48 horas.

Na plataforma de recepção, o leite foi transferido para um tanque e misturado por 10 minutos. Em seguida, o leite foi distribuído em cinco latões de 50 litros cada, previamente higienizados, que foram armazenados em câmara

fria a temperatura de $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até quatro dias. Diariamente, um latão era retirado da câmara fria e o leite pasteurizado a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos para a fabricação de queijo Minas Frescal. O leite de um dos latões foi imediatamente pasteurizado e usado para a fabricação de queijo Minas Frescal (tempo 0).

Foi fabricado também queijo a partir de leite recém-ordenhado, proveniente de outro fornecedor. Após a ordenha, o leite foi coletado em um latão de 50 litros e conduzido, imediatamente, ao laticínios para ser pasteurizado e usado na fabricação de queijo.

O volume de leite de cada latão foi calculado subtraindo-se o peso do latão com leite do peso do latão vazio, multiplicando-se o resultado pela densidade do leite a $15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As amostras de leite para as análises microbiológicas, enzimáticas e físico-químicas foram coletadas antes da pasteurização e encaminhadas imediatamente para o Laboratório, sob refrigeração.

3.2. Fabricação dos queijos

A fabricação do queijo Minas Frescal seguiu o fluxograma estabelecido por Furtado e Neto (1994), conforme a Figura 2.

3.3. Análises do leite cru

3.3.1. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas em duplicata.

• Gordura

O teor de gordura do leite das amostras de leite foi determinado pelo método butirométrico de Gerber (Brasil, 2003).

• Densidade

A densidade do leite foi determinada utilizando termolacto-densímetro (Brasil, 2003).

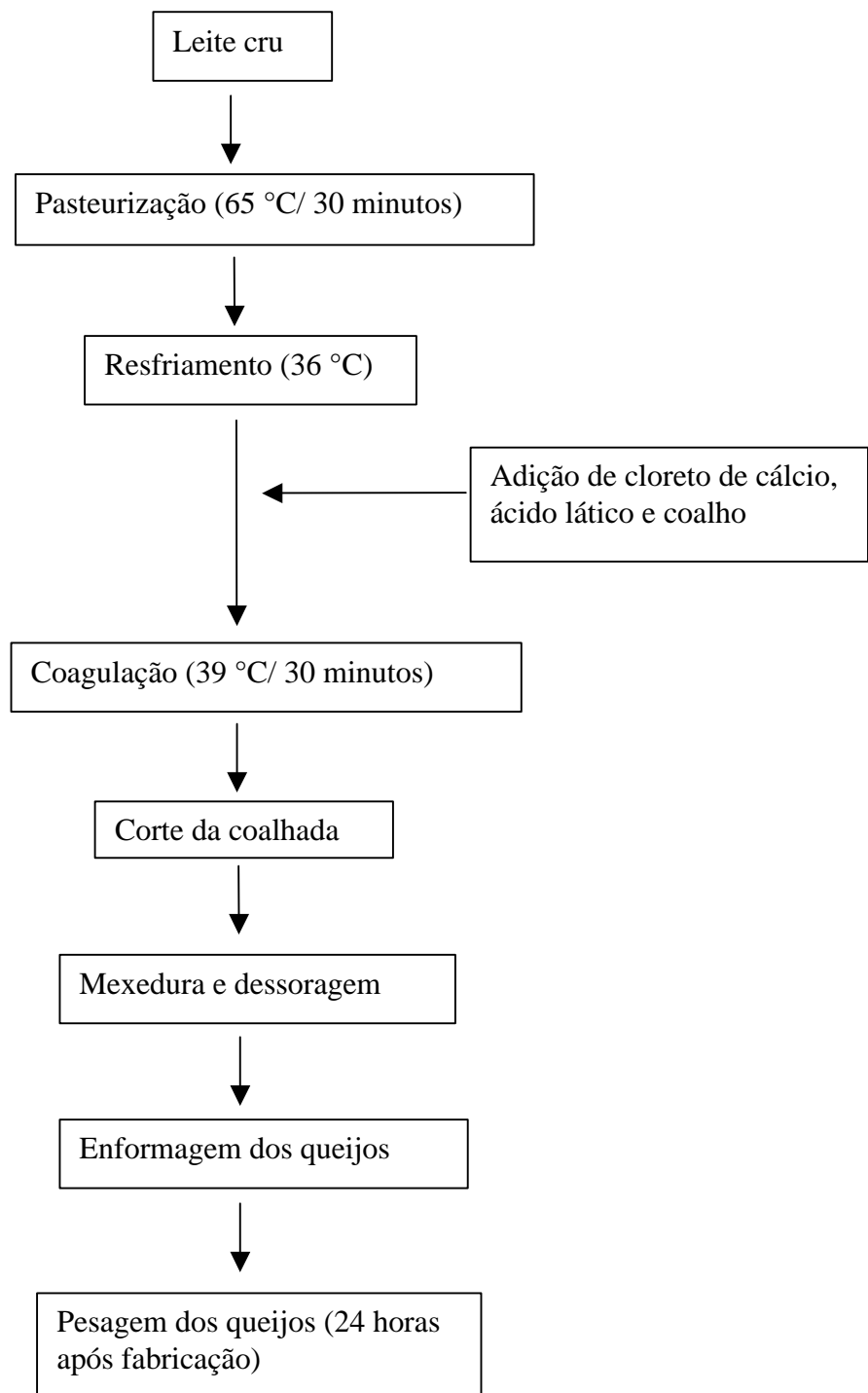


Figura 2 – Fluxograma da fabricação do queijo Minas Frescal.

- **Nitrogênio total e proteína bruta**

O nitrogênio total do leite foi determinado pelo método de Kjeldahl, de acordo com A. O. A. C. (1995). O fator utilizado para conversão dos teores de nitrogênio para proteína bruta foi de 6,38 (Pereira et al., 2001).

- **Sólidos totais**

Para determinação do teor de sólidos totais do leite foi adotado o método de secagem em estufa (modelo 315-SE, Fanem), a 105 °C (A.O.A.C., 1995).

- **Acidez titulável**

A acidez titulável foi determinada pelo método de titulação com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), empregando-se o indicador fenolftaleína (Brasil, 2003).

- **pH**

O pH do leite foi determinado por método potenciométrico (Tradelab, MPA-201P, Brasil)

3.3.2. Determinação de células somáticas

A contagem de células somáticas do leite cru foi conduzida no Laboratório de Qualidade do Leite da EMBRAPA - Gado de leite, em Juiz de Fora-MG, em contador eletrônico (Bentley SomaCount 300[®], EUA).

3.3.3. Análises microbiológicas

- **Contagem de bactérias mesofílicas**

Diluições decimais das amostras do leite cru foram realizadas e plaqueadas em Ágar Padrão para Contagem - PCA para contagem de bactérias mesofílicas viáveis, após a incubação, a 32 °C, por 48 horas (Frank et al., 1992).

- **Contagem de bactérias psicrotróficas e psicrotróficas proteolíticas**

Diluições decimais das amostras do leite cru foram plaqueadas em Ágar Caseinato de Cálcio (Merck®) para contagem de bactérias psicrotróficas e psicrotróficas proteolíticas viáveis, com incubação a $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 dias (Frank et al., 1992). As colônias características de bactérias proteolíticas apresentavam halos de clarificação, resultantes da hidrólise da caseína.

- **Contagem de bactérias psicrotróficas lipolíticas**

Diluições decimais das amostras do leite cru foram plaqueadas em Ágar Tributirina (Oxoid®) para contagem de bactérias psicrotróficas lipolíticas viáveis, com incubação a $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 dias (Frank et al., 1992). Foram contadas as colônias das bactérias lipolíticas que apresentavam halos transparentes, em razão da hidrólise da tributirina.

3.3.4. Determinação da atividade de enzimas hidrolíticas

- **Atividade proteolítica**

A atividade proteolítica no leite cru foi determinada pela técnica descrita por Bendicho et al. (2002), com modificações. Uma alíquota de 100 μL da amostra de leite cru foi adicionada a 1 mL de uma solução de azocaseína (Sigma, Chemical Co-St Louis, MO, EUA) 1 % (p/v), preparada com uma solução tampão pH 7,2 (36 mL de hidrogenofosfato de sódio 5 mM e 14 mL de dihidrogenofosfato de sódio 5 mM, diluindo com água destilada até 1000 mL). Os conteúdos dos tubos foram misturados e incubados a $35,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por duas horas em banho-maria, com circulação (Thermomix BM 18 BU de Braun Biotech Internacional, Alemanha). A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de ácido tricloroacético - TCA 5 %. As amostras foram clarificadas por centrifugação (Excelsa Baby I 206, Fanem, Brasil) a 5000 g, por 10 minutos, e a absorvância do sobrenadante foi medida a 345 nm, em espectrofotômetro Beckman DU640 (EUA). Para os controles de cada reação, o TCA foi adicionado antes da adição da amostra. Uma unidade de atividade proteolítica

foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir um aumento na absorvância em 0,01 por hora de incubação.

• **Atividade lipolítica**

A atividade lipolítica no leite cru foi determinada pelo método descrito por Rajmohan, Dodd e Waites (2002), com modificações. Uma solução de substrato foi preparada pela adição de 1 mL de *p*-nitrofenilbutirato (Sigma, Chemical Co-St Louis, MO, EUA) (0,02 % em isopropanol) a 25 mL de deoxicolato de sódio (4 mg mL⁻¹ em tampão fosfato, 0,05 M, pH 7,8). Alíquotas de 20 L das amostras de leite cru foram adicionadas a 2 mL da solução de substrato. Após incubação a 37 °C por duas horas em banho-maria, com circulação (Thermomix BM 18 BU de Braun Biotech Internacional, Alemanha), 2 mL de acetona foi adicionado para clarificar a solução e a absorvância medida a 410 nm, em espectrofotômetro Micronal, modelo B 582. Para controle da reação foi utilizado um tubo que continha o mesmo volume de solução de substrato e acetona. Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima requerida para produzir um aumento na absorvância em 0,01 por hora de incubação.

3.4. Análises do soro

As análises de gordura, densidade, nitrogênio total e sólidos totais foram realizadas seguindo-se a metodologia descrita no item 3.3.1.

3.5. Análises do queijo

• **Umidade**

O teor de umidade dos queijos foi determinado pelo método de secagem em estufa (modelo 315-SE, Fanem) a 105°C, conforme A.O.A.C. (1995).

• pH

O pH dos queijos foi determinado por método potenciométrico (Tradelab, MPA-201P, Brasil), com a inserção do eletrodo diretamente no queijo a ser analisado.

3.6. Cálculo do rendimento do queijo Minas Frescal

O rendimento da fabricação do queijo, expresso em litros de leite por quilo de queijo ($L\ kg^{-1}$), foi obtido pela divisão do volume total de leite (L) pelo peso total dos queijos (kg) após 24 horas de fabricação. O rendimento foi ajustado para 58 % de umidade, utilizando a fórmula descrita por Furtado (2005).

Também foram calculadas as cifras de perda de gordura e sólidos totais do leite no soro e o aproveitamento de sólidos totais do queijo por litro de leite (Furtado, 2005).

O experimento foi conduzido em três repetições e os resultados expressos como média das repetições.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Matéria-prima para a fabricação de queijos

Os resultados das análises físico-químicas e das contagens de células somáticas das amostras de leite cru utilizadas na fabricação de queijo Minas Frescal são apresentados na Tabela 1. A densidade e os teores de gordura, proteína e sólidos totais encontraram-se em conformidade com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado (Brasil, 2002b).

O leite cru refrigerado e o leite cru recém-ordenhado apresentaram composições físico-químicas diferentes, uma vez que foram obtidos de diferentes fornecedores e a composição do leite é influenciada por fatores como raça e idade da vaca, alimentação e período de lactação.

Os valores de pH das amostras de leite cru variaram de 6,64 a 6,71 e foram semelhantes aos reportados por Silva (2004) em amostras de leite cru. Este autor observou uma variação no pH de 6,60 a 6,77 em amostras de leite cru coletadas em São Paulo, Mato Grosso e Goiás nas estações seca e chuvosa. A acidez titulável variou de 15 °Dornic a 20 °Dornic, valores estes considerados normais (Pereira et al., 2001).

As contagens de células somáticas (CCS) apresentaram valores médios de 271 mil células somáticas mL⁻¹ para as amostras de leite cru refrigerado e de 211 mil células somáticas mL⁻¹ nas amostras de leite cru recém ordenhado, sendo inferiores ao valor máximo de um milhão de células somáticas mL⁻¹

prescrito pela legislação (Brasil, 200b). Os valores de CCS constatados são inferiores ao valor de 600 mil células somáticas mL⁻¹ reportado por Matioli (2000) em amostras de leite cru e que foi associado a uma redução de até 9,81 % no rendimento do queijo Minas Frescal. Uma redução menor foi observada por Klei et al. (1998) ao avaliarem o efeito da contagem de células somáticas sobre o rendimento de queijo Cottage. Esses autores constataram uma redução de 4,34 % no rendimento de queijos fabricados com leite cru que possuía média de 872 mil células somáticas mL⁻¹ em relação aos queijos fabricados com leite cru que possuía 83 mil células somáticas mL⁻¹.

Tabela 1 – Composição físico-química e contagem de células somáticas das amostras de leite cru utilizadas na fabricação do queijo Minas Frescal. Valores correspondem à média de três repetições.

Matéria-prima	Densidade a 15 °C (g/ml)	Gordura (% p/v)	Proteína Total (% p/p)	ST ¹ (% p/p)	pH	Acidez titulável (°Dornic)	CCS ³ mL ⁻¹ (X 1000)
Leite cru refrigerado	1,0308	3,25	3,20	11,47	6,68	16,5	271
Leite cru recém-ordenhado	1,0300	3,05	3,31	11,14	6,73	nd ²	211

¹ST – Sólidos totais

²ND – não determinado

³CCS – Contagem de células somáticas

4.2 Qualidade bacteriológica do leite cru refrigerado e do leite cru recém-ordenhado

As contagens iniciais de bactérias mesofílicas, psicotróficas, psicotróficas proteolíticas e psicotróficas lipolíticas do leite cru refrigerado foram acima de 10⁴ UFC mL⁻¹ (Figura 3).

A contaminação do leite cru refrigerado por bactérias mesofílicas foi superior ao limite de 10⁶ UFC mL⁻¹ estabelecido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado (Brasil, 2002b) e este resultado indica a adoção de práticas higiênicas inadequadas durante a produção, estocagem e transporte do leite até o laticínios. Contagens de bactérias mesofílicas superiores a 10⁶ UFC mL⁻¹ também foram reportadas por Pinto (2004), que registrou populações de mesófilos aeróbios entre 1,4 x 10⁶

UFC mL⁻¹ e $5,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ em amostras de leite cru refrigerado coletadas no silo industrial localizado em indústria laticinista da Zona da Mata Mineira. Para este autor, as contaminações adicionais e o crescimento microbiano durante o transporte e a estocagem na indústria podem ser os principais responsáveis por contagens altas no silo industrial.

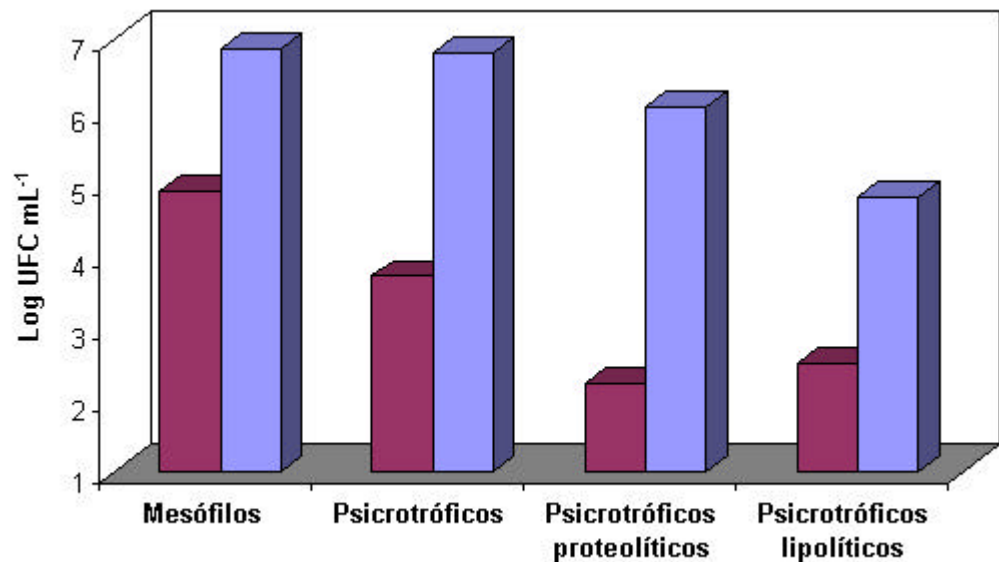


Figura 3 – Contagem inicial média de bactérias mesofílicas, psicrotróficas, psicrotróficas proteolíticas e psicrotróficas lipolíticas no leite cru recém-ordenhado (■) e leite cru refrigerado (□). Média de três repetições.

Silva (2004) constatou que amostras de leite cru coletadas em silos industriais localizados nos estados de Goiás, Rio Grande do Sul e São Paulo apresentaram contagens microbianas entre 10^6 UFC mL⁻¹ e 10^7 UFC mL⁻¹. Apenas amostras do Estado de São Paulo, na estação seca, apresentaram contagem média de mesófilos aeróbios inferior ao valor máximo legal para leite cru refrigerado. Ainda de acordo com este mesmo autor, os dados observados nas amostras coletadas no Estado de São Paulo podem ter sido influenciados pela menor distância entre os centros de produção do leite e a fábrica de laticínios, quando comparada com os estados de Goiás e Rio Grande do Sul. Para o autor, a otimização das linhas de leite e uma utilização eficaz dos postos de refrigeração poderiam reduzir o intervalo entre a ordenha e a

recepção do leite no estabelecimento industrial. Nero et al. (2005) avaliaram a qualidade microbiológica do leite cru produzido em quatro regiões do Brasil e constataram que 48,6 % das amostras apresentavam contagens de mesófilos acima do determinado pela legislação. Para esses autores, a implantação das boas práticas de produção e o desenvolvimento de programas regionais de assistência à produtores leiteiros são fundamentais para garantir um leite de melhor qualidade microbiológica.

A população de bactérias psicrófilas constatada no leite cru refrigerado foi superior a 10^6 UFC mL⁻¹ (Figura 3). Este resultado foi semelhante às contagens de bactérias psicrófilas registradas por Pinto (2004), em amostras de leite cru coletadas no silo industrial, que variou entre $5,6 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ e $6,4 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Contagens de bactérias psicrófilas entre $1,4 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $6,8 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ foram relatadas por Silva (2004) em amostras do leite cru provenientes de silos de indústrias processadoras de leite UHT dos estados de Goiás, Rio Grande do Sul e São Paulo com os maiores valores detectados na estação chuvosa.

Neste trabalho, a proporção de bactérias psicrófilas no leite cru refrigerado foi, em média, de 87,5 % do número de mesófilos. Este valor é muito superior ao padrão estabelecido pela legislação (Brasil, 1980), que determina o controle da contaminação da microbiota psicrófila de tal forma que sua contagem não exceda a 10 % do número total de mesófilos aeróbios no leite cru. Embora, não exista na legislação um limite para população de bactérias psicrófilas no leite cru, este grupo de bactérias é utilizado como um indicador suplementar da qualidade do leite. Pinto (2004) observou que 100 % das amostras de leite cru coletadas no silo de uma indústria processadora do Estado de Minas Gerais apresentavam contagens de bactérias psicrófilas superiores a 10 % da contagem de mesófilos aeróbios, e concluiu que as condições higiênicas de produção e de armazenamento, de transporte e de refrigeração, nas diferentes etapas da cadeia produtiva do leite, não estão adequadas para minimizar a contaminação microbiana e o crescimento de bactérias psicrófilas. Celestino et al. (1996) observou na Austrália uma relação entre a contagem de bactérias psicrófilas e mesófilas aeróbias em amostras de leite cru estocadas a 4 °C, por 48 horas, que variou de 47 % a 80 %.

As contagens de bactérias psicrotróficas proteolíticas e psicrotróficas lipolíticas no leite cru refrigerado foram de $1,1 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ e $6,3 \times 10^4$ UFC mL⁻¹, respectivamente. Contagens de bactérias psicrotróficas proteolíticas inferiores foram relatadas por Aaku et al. (2004) em amostras de leite cru provenientes de dois laticínios localizados em Botswana, na África. Nesse trabalho, a população de bactérias psicrotróficas proteolíticas variou de 10^2 UFC mL⁻¹ a 10^5 UFC mL⁻¹ em amostras de leite cru destinadas ao processamento de leite de consumo pasteurizado. Esses mesmos autores observaram contagens de bactérias psicrotróficas lipolíticas semelhantes aos observados neste estudo, variando entre 10^4 UFC mL⁻¹ a 10^5 UFC mL⁻¹. A presença desta microbiota produtora de enzimas hidrolíticas pode comprometer a qualidade do leite e produtos lácteos derivados, pois algumas dessas enzimas são termorresistentes. Bactérias psicrotróficas produtoras de proteases e lipases termorresistentes são a principal causa de deterioração do leite cru refrigerado (Sørhaug e Stepaniak, 1997).

Ao contrário dos resultados encontrados para o leite cru refrigerado, o leite cru recém-ordenhado apresentou contagens de bactérias mesofílicas, psicrotróficas, psicrotróficas proteolíticas e psicrotróficas lipolíticas abaixo de 10^5 UFC mL⁻¹ (Figura 3). A população de mesófilos de $7,7 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ foi inferior ao limite legal de 10^6 UFC mL⁻¹ para leite cru tipo C (Brasil, 2002b). O leite recém-ordenhado, além de possuir contagens bacterianas menores em relação ao leite cru refrigerado (Figura 3), apresentou uma proporção de bactérias psicrotróficas de apenas 6,6% em relação ao número de mesófilos, atendendo o padrão estabelecido por Brasil (1980) de, no máximo, 10% do número total de mesófilos. Portanto, é possível obter um leite cru de boa qualidade microbiológica, desde que práticas higiênicas adequadas sejam adotadas e o tempo de estocagem reduzido.

4.2.1. Crescimento de bactérias durante a estocagem do leite cru refrigerado

A manutenção do leite cru, proveniente da coleta a granel, a 10 °C por quatro dias possibilitou um aumento na população de mesófilos de $7,2 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ para $2,4 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ e na população de psicrotróficos de $6,3 \times$

10^6 UFC mL⁻¹ para $1,4 \times 10^9$ UFC mL⁻¹ (Figura 4). As contagens de bactérias mesofílicas e de bactérias psicrotróficas foram semelhantes durante a estocagem do leite cru a 10 °C, sugerindo o predomínio de bactérias psicrotróficas na microbiota do leite cru refrigerado.

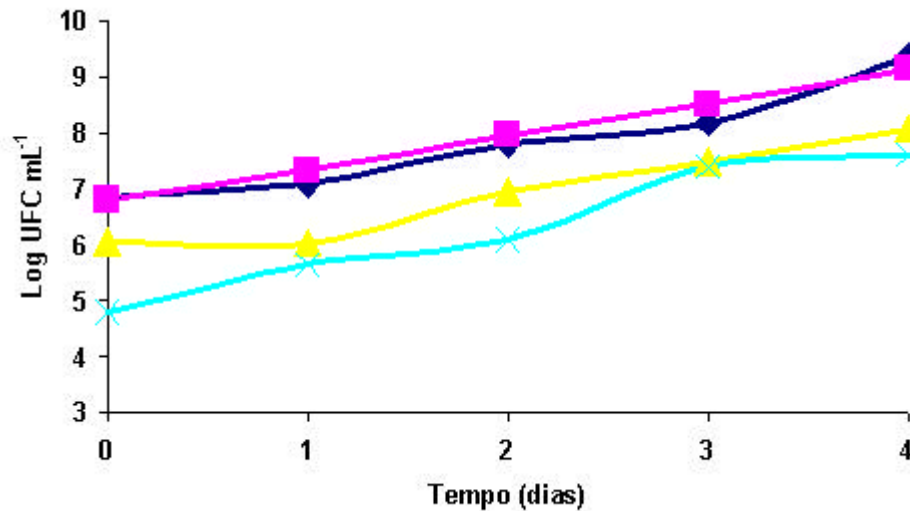


Figura 4 – Crescimento de bactérias mesofílicas (—◆—), psicrotróficas (—■—), psicrotróficas proteolíticas (—▲—) e psicrotróficas lipolíticas (—×—) durante a estocagem do leite cru a 10°C.

Durante este período de estocagem observou-se também um aumento de dois ciclos logarítmicos na população de bactérias psicrotróficas proteolíticas e de, aproximadamente, três ciclos logarítmicos na população de bactérias psicrotróficas lipolíticas, que alcançaram contagens de $1,2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ e $3,9 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, respectivamente. A microbiota psicrotrófica proteolítica representou de 5,0 % a 17,9 % da população de psicrotróficos ao longo da estocagem do leite cru. A contagem de bactérias psicrotróficas lipolíticas foi menor durante a estocagem do leite cru e representou de 1,0 % a 7,5 % da população de psicrotróficos.

O crescimento de bactérias psicrotróficas durante a estocagem do leite cru, a 10 °C também foi reportado por Cousins et al. (1977). Estes autores observaram uma população de bactérias psicrotróficas superior a 10^7 UFC mL⁻¹ em amostras de leite cru com contagem inicial de 10^4 UFC mL⁻¹, após dois dias de estocagem a 10 °C. De acordo com os autores, o uso de matéria-prima com

contagens de psicotróficos inferiores a 10^6 UFC mL⁻¹ representa um menor risco de ocorrências de alterações bioquímicas de origem microbiana.

Vassiliadou e Alichanidis (1984) avaliaram o crescimento de bactérias psicotróficas em leite estocado entre 4 °C e 5 °C e observaram um aumento da população de $6,0 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ para $1,2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ após um período de cinco dias. Esses mesmos autores também relataram um aumento na população de bactérias psicotróficas proteolíticas e psicotróficas lipolíticas de $2,0 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ para $7,0 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ e de $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹ para $6,3 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, respectivamente, no mesmo período. Hicks et al. (1986) também relataram o crescimento de bactérias psicotróficas e psicotóxicas proteolíticas no leite cru estocado a 10 °C. Estes autores observaram que uma população próxima de 10^6 UFC mL⁻¹ de bactérias psicotróficas e de 10^5 UFC mL⁻¹ de bactérias psicotróficas proteolíticas aumentaram dois ciclos logarítmicos após quatro dias de estocagem. Haryani et al. (2003) observaram que a temperatura de refrigeração influenciou o crescimento de bactérias psicotróficas em amostras de leite cru provenientes de duas fontes de produção diferentes. O tempo para que a população de psicotróficos atingisse 10^7 UFC mL⁻¹ foi de nove dias a 2 °C, sete dias a 4 °C e de quatro dias a 7 °C. Pinto (2004) observou que a manutenção de amostras de leite cru a 10 °C permitiu um aumento rápido da população de *P. fluorescens*, equivalente a três ciclos logarítmicos, após dois dias de estocagem.

Os resultados deste trabalho demonstraram que a estocagem do leite cru a 10 °C favoreceu o crescimento da microbiota psicotrófica, que muitas vezes, pode alcançar contagens de 10^7 UFC mL⁻¹ antes do processamento e, com isso, promover alterações significativas na qualidade e no rendimento de produtos derivados do leite. Apesar da legislação brasileira permitir a estocagem do leite cru no estabelecimento industrial a temperatura de até 10 °C (Brasil, 2002b), esta temperatura de estocagem na indústria pode comprometer a qualidade microbiológica do leite cru.

4.3. Atividade proteolítica e lipolítica no leite cru

A atividade proteolítica e lipolítica no leite cru refrigerado aumentou durante a estocagem a 10 °C (Figura 5). Ao final de quatro dias de estocagem,

a população de bactérias psicrotróficas proteolíticas foi de $1,2 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ e a população de bactérias psicrotróficas lipolíticas foi de $3,9 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ (Figura 4). Estas populações, provavelmente, não foram suficientes para aumentar, acentuadamente, a concentração de proteases e lipases no leite. Existem evidências de que um aumento significativo na produção de enzimas hidrolíticas por bactérias psicrotróficas ocorra apenas ao final da fase logarítmica ou início da fase estacionária de crescimento (Costa et al., 2001; Rajmohan et al., 2002; Stevenson, 2003; Pinto, 2004; Pinto, 2005).

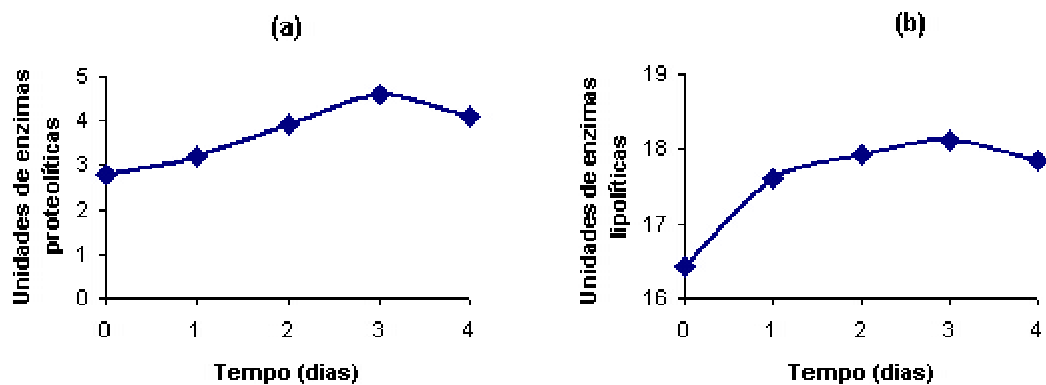


Figura 5 – Atividade de enzimas hidrolíticas durante a estocagem do leite cru refrigerado a 10 °C. (a) – atividade proteolítica, (b) – atividade lipolítica. Média de três repetições.

Uma população de *P. fluorescens* de, aproximadamente, 10^7 UFC mL⁻¹ foi necessária para que Costa et al. (2002) constatasse um aumento considerável na atividade proteolítica em leite estocado a 6 °C. Após atingir essa contagem, esses autores observaram um aumento de até 500 % na atividade proteolítica do leite. Rajmohan, Dodd e Waites (2002) e Stevenson et al. (2003) não detectaram a atividade proteolítica e lipolítica em caldo peptona e leite desnatado, respectivamente, até que a população de *Pseudomonas* spp. atingisse o final da fase exponencial ou início da fase estacionária de crescimento, contudo, estes autores não informaram a contagem mínima na qual foi detectada a produção de proteases e lipases. Pinto (2004) constatou um aumento na atividade proteolítica de dois isolados de *P. fluorescens* em leite desnatado reconstituído estocado, apenas em populações superiores a 10^8 UFC mL⁻¹, nas temperaturas de 2 °C, 4 °C, 7 °C e 10 °C. A produção de

proteases por *P. fluorescens* em seis meios de cultivos ocorreu apenas quando a cultura atingiu populações entre 10^8 UFC mL⁻¹ e 10^9 UFC mL⁻¹ (Pinto, 2005). Este autor observou valores superiores a 30 unidades de enzimas proteolíticas nesta faixa de contaminação microbiana.

O leite cru recém-ordenhado apresentou 1,99 unidades de enzimas proteolíticas e 16,09 unidades de enzimas lipolíticas. Estes valores de atividade enzimática no leite cru recém-ordenhado podem ser atribuídos, principalmente, a presença de proteases e lipases naturais no leite.

Embora muitos trabalhos, com cultura pura demonstrem um aumento da atividade proteolítica no leite quando a contagem de *P. fluorescens* é superior a 10^8 UFC mL⁻¹, esta mesma relação não pode ser feita apenas com a contagem de psicotróficos. A falta de correlação entre o número de psicotróficos e o grau de proteólise ou a atividade proteolítica em leite foi demonstrada anteriormente (Juffs, 1975; Picard et al., 1996; Haryani et al., 2003). Portanto, amostras de leite cru com altas contagens de bactérias psicotróficas não possuem, necessariamente, atividade proteolítica mais elevada em comparação com amostras de contagens baixas. Segundo Haryani et al. (2003), o principal fator que determina a atividade proteolítica e lipolítica é o tipo de bactéria psicotrófica que cresce no leite cru e não o número dessas bactérias.

4.4. Rendimento da fabricação de queijos

Constatou-se um aumento de 1,77 % a 3,24 % no rendimento do queijo Minas Frescal em L kg⁻¹ e de 1,59 % a 3,25 % no rendimento em g ST L⁻¹ durante os três primeiros dias de estocagem do leite cru refrigerado (Tabela 2). Este aumento pode ser explicado pela queda do pH do leite cru durante a estocagem (Figura 6). A redução dos valores de pH durante a estocagem do leite cru refrigerado pode ser provocada pela produção de ácidos por bactérias psicotróficas Gram-positivas, pertencentes a algumas espécies dos gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus*, e por bactérias Gram-negativas do grupo coliformes ou ainda pela ação de lipases, produzidas por bactérias psicotróficas, que hidrolisam a gordura do leite e aumentam a concentração de ácidos graxos livres (Guinot-Thomas et al., 1995). Esta diminuição do pH

aumenta a quantidade de caseína micelar no leite e provoca um ligeiro aumento no rendimento de queijos (Yan, Langlois e O'Leary, 1983; Hicks et al., 1986).

Tabela 2 – Rendimento de queijo Minas Frescal fabricado com leite cru recém-ordenhado e leite cru refrigerado armazenado a 10°C. Valores correspondem à média de três repetições.

Variáveis	Leite cru recém-ordenhado	Leite cru refrigerado armazenado (dias)				
		0	1	2	3	4
Umidade (% p/p)	56,98	59,44	58,95	59,13	56,75	55,69
Rendimento ajustado para 58 % de umidade (L kg ⁻¹)	7,10	6,78	6,56	6,63	6,66	7,24
Variação (%) ^a	-	-	+ 3,24	+ 2,21	+ 1,77	- 6,78
Rendimento (g ST* no queijo L ⁻¹ de leite)	59,12	62,08	64,10	63,46	63,07	58,12
Variação (%) ^a	-	-	+ 3,25	+ 2,22	+ 1,59	- 6,38

^avariação em relação ao tempo 0

*ST – Sólidos totais

Uma redução de 6,78 % em L kg⁻¹ e de 6,38 % em g ST L⁻¹ no rendimento do queijo Minas Frescal foi observada quando foi utilizado leite cru estocado por quatro dias em sua fabricação. Esta queda no rendimento do queijo Minas Frescal foi relacionada a contagem de bactérias psicrotróficas, psicrotróficas proteolíticas e psicrotróficas lipolíticas (Figura 7). Perdas no rendimento, em relação ao tempo zero, ocorreram apenas quando a contagem de bactérias psicrotróficas estava entre 10⁸ UFC mL⁻¹ e 10⁹ UFC mL⁻¹ e a contagem de bactérias psicrotróficas proteolíticas e psicrotróficas lipolíticas eram superiores a 10⁷ UFC mL⁻¹.

Resultados semelhantes ao deste trabalho foram obtidos por Yan et al. (1983) que observaram uma redução no rendimento de queijo fabricado experimentalmente, somente quando a população de bactérias psicrotróficas no leite cru foram superiores a 10⁸ UFC mL⁻¹. Esses autores constataram uma redução de 2,5 % e 16,6 % no rendimento de queijos fabricados com leite estocado a 7 °C, por seis e oito dias, respectivamente. Entretanto, resultados diferentes foram descritos por Aylward, O'Leary e Langlois (1980) com reduções de 2,5 % a 3,0 % no rendimento de queijo Cottage, por dia de

estocagem das amostras leite cru, a 5° C, quando as contagens de bactérias psicotróficas alcançaram 10^6 UFC mL⁻¹.

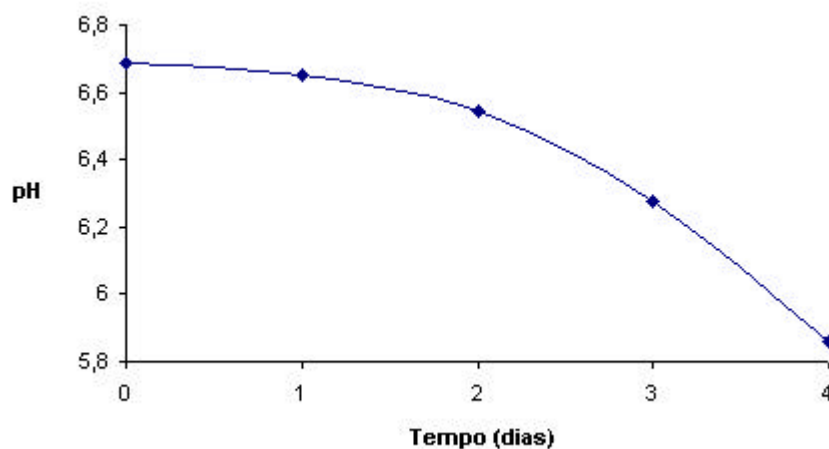


Figura 6 – Evolução do pH do leite cru refrigerado durante a estocagem a 10 °C. Média de três repetições.

Provavelmente, a redução no rendimento provocado por bactérias psicotróficas é influenciada pelas etapas diferentes utilizadas durante a fabricação dos tipos de queijos. Porém, mesmo quando é estudado o efeito do crescimento de bactérias psicotróficas sobre o rendimento de um mesmo tipo de queijo, os trabalhos publicados reportam resultados diferentes. Em alguns trabalhos foi observado uma redução significativa no rendimento de queijo Cheddar fabricados a partir de leite cru quando a contagem de bactérias psicotróficas excedia a $1,0 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ (Hicks et al., 1986), $1,0 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ (Yates e Elliot, 1977; Banks et al., 1988) ou $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ (Banks et al., 1986). Em contraste a estes trabalhos, Law et al. (1979) relataram que uma população de psicotróficos de 10^7 UFC mL⁻¹ no leite cru destinado a fabricação de queijo Cheddar não provocou uma redução no rendimento. Portanto, a constatação de perdas no rendimento de queijos não depende apenas do número de bactérias psicotróficas no leite cru, mas também, do tipo de bactérias psicotróficas que predominam durante a estocagem desta matéria-prima e que determinam a taxa de proteólise e lipólise.

O rendimento da fabricação de queijo Minas Frescal com leite recém-ordenhado foi de $7,10 \text{ L kg}^{-1}$ e de $59,12 \text{ g ST L}^{-1}$ (Tabela 2). Uma comparação

entre os rendimentos dos queijos fabricados com de leite cru recém-ordenhado e com leite cru refrigerado (Tabela 2) não foi possível, em razão de diferenças encontradas na composição química desses leites apresentadas na Tabela 1.

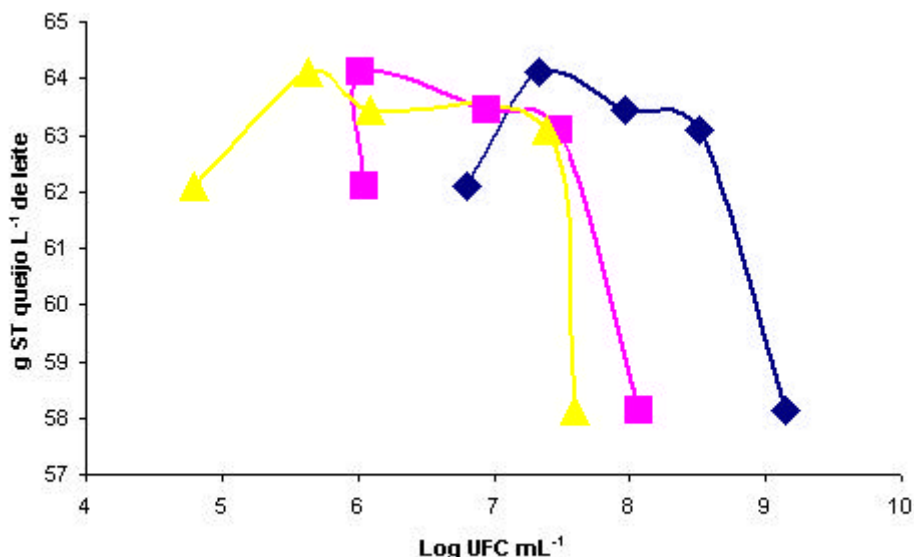


Figura 7 – Logarítmo de Unidades Formadoras de Colônias (UFC mL⁻¹) de bactérias psicotróficas (—◆—), psicotróficas proteolíticas (—■—) e psicotróficas lipolíticas (—▲—) no leite cru refrigerado e o rendimento do queijo Minas Frescal em g ST no queijo L⁻¹ de leite.

O tempo de estocagem do leite cru sob refrigeração influenciou nos teores de umidade do queijo Minas Frescal, que apresentou uma redução de até, aproximadamente, 4 % no decorrer da estocagem a 10 °C (Tabela 2). De acordo com Yan, Langlois e O'Leary (1983), uma redução no teor de umidade do coágulo de queijo experimental parece estar associada com uma queda do pH do leite cru durante a estocagem. A acidificação do leite durante a estocagem aumenta a firmeza da coalhada, que provoca uma maior expulsão de água, uma vez que poucas estruturas abertas são formadas na micela de caseína. Entretanto, resultados diferentes aos deste trabalho foram reportados por Hicks et al. (1986). Estes autores observaram um aumento do teor de umidade de queijo Cheddar durante a estocagem do leite cru, sugerindo que a proteólise da caseína aumenta sua capacidade de ligação a água, desde modo, aumentando o teor de umidade dos queijos. Moura (1997) relatou um

aumento de 2 % no teor de umidade de queijo Parmesão fabricado com leite estocado a 4° C, por cinco dias.

Um aumento de 2,5 % no teor de nitrogênio total do soro, em relação ao tempo zero, foi constatado no quarto dia de estocagem do leite cru refrigerado (Tabela 3). Resultados semelhantes foram reportados por Aylward, O'Leary e Langlois (1980), que observaram um aumento no nitrogênio total de 2 % a 3 % no soro de queijo Cottage fabricado com leite estocado a 5 °C, por quatro dias. Esses autores atribuíram esse aumento à atividade de enzimas proteolíticas produzidas por bactérias psicotróficas no leite cru, que hidrolisam as micelas de caseína, o que causa um aumento na concentração de peptídeos e aminoácidos no soro. Maiores perdas de nitrogênio no soro foram verificadas por Hicks et al. (1982), que observaram que um aumento no inóculo inicial de isolados de *Pseudomonas* no leite pasteurizado de 10^4 UFC mL⁻¹ para 10^6 UFC mL⁻¹ provocava uma elevação do nitrogênio total no soro do coágulo de queijo experimental de 1,7 mg mL⁻¹ para 1,9 mg mL⁻¹ após estocagem a 10 °C, por seis dias, o que correspondeu a um aumento de 11,8 %. Embora não tenha quantificado o nitrogênio total, Moura (1997) relatou um aumento do nitrogênio não protéico de 0,116 % para 0,130 % no soro proveniente da fabricação de queijo Parmesão fabricado com leite que possuía contagem de *P. fluorescens* superior a 10^6 UFC mL⁻¹, após cinco dias de estocagem, a 4 °C. Portanto, a microbiota psicotrófica do leite cru refrigerado tem um impacto importante sobre o conteúdo de caseína do leite, e conseqüentemente, sobre o rendimento de queijos.

O aumento no teor de gordura do soro constatado no quarto dia de estocagem do leite cru refrigerado correspondeu a uma cifra de perda de gordura do leite no soro de 16,4 % durante a fabricação do queijo Minas Frescal (Tabela 3). Este resultado sugere uma hidrólise da gordura do leite por bactérias lipolíticas, que resulta no aumento de ácidos graxos livres no soro e redução do rendimento de queijo. Moura (1997) também constatou perdas de gordura no soro obtido de queijo Parmesão. As perdas de gordura foram monitoradas pelo aumento no teor de ácidos graxos livres do soro de 0,478 mmol 100 g⁻¹ de gordura no soro para 0,720 mmol 100 g⁻¹ de gordura no soro, após a estocagem do leite cru por cinco dias, a 4° C. Este autor concluiu que a lipólise do leite cru por *P. fluorescens* é acompanhada por uma transferência de

ácidos graxos para o soro, uma vez que, parte dos ácidos graxos liberados são de cadeia curta e solúveis na fase aquosa.

Tabela 3 – Composição do soro obtido da fabricação de queijo Minas Frescal e cifras de perdas dos constituintes do leite no soro. Valores correspondem à média de três repetições.

Variáveis	Leite cru recém-ordenhado	Leite cru refrigerado armazenado (dias)				
		0	1	2	3	4
Densidade 15°C (g mL ⁻¹)	1,0277	1,0273	1,0272	1,0274	1,0272	1,0274
Nitrogênio total (mg mL ⁻¹)	1,369	1,257	1,212	1,249	1,249	1,288
Gordura (% p/v)	0,32	0,35	0,32	0,30	0,30	0,60
Cifra de perdas de gordura (%)	9,00	9,18	8,27	7,90	7,96	16,40
Sólidos totais (% p/p)	6,52	6,55	6,61	6,62	6,52	6,73
Cifra de perdas de ST* (%)	50,85	48,95	48,70	48,57	49,35	51,77

* ST-Sólidos totais

Os valores de sólidos totais no soro de queijo também aumentaram no quarto dia de estocagem, com uma cifra de perda de sólidos totais do leite no soro de 51,77 % (Tabela 3). Moura (1997) observou um aumento no teor de sólidos totais de 7,08 % para 7,21 % no soro de queijo Parmesão fabricado com leite após cinco dias de estocagem. Para este autor, esta perda pode estar ligada à proteólise provocada por enzimas produzidas por *Pseudomonas* durante o período de estocagem do leite. No presente trabalho, o aumento das perdas de sólidos totais no soro pode estar associado à atividade de enzimas proteolíticas e lipolíticas produzidas por bactérias psicrotróficas no leite cru, que promoveram um aumento do nitrogênio total e do teor de gordura no soro obtido durante a fabricação de queijo Minas Frescal.

4.4.1. Perdas econômicas

Neste trabalho, constatou-se uma redução no rendimento do queijo Minas Frescal, em L kg⁻¹, de 6,78 %, provavelmente em função do crescimento de bactérias psicrotróficas no leite cru refrigerado. Para ilustrar as perdas

econômicas que esta redução pode representar para uma indústria de laticínios de médio porte, algumas considerações são necessárias. Supondo-se uma indústria que apresente:

- Volume de leite cru captado por dia: 50.000 litros;
- Porcentagem de leite destinado à fabricação de queijos: 33% (média nacional);
- Rendimento da fabricação de queijo Minas Frescal: 6,5 L kg⁻¹;
- Preço de venda do queijo: US\$ 3,00 kg⁻¹.

Nestas condições, este laticínios produziria, teoricamente, 2.538 kg de queijo Minas Frescal por dia. Porém, considerando a redução do rendimento constatada neste trabalho, esta produção cairia para 2.366 kg de queijo por dia. Este valor corresponde a uma redução diária de 172 kg na produção de queijo. Em um mês, esta redução provocaria uma perda na produção de queijo de 5.160 kg, o que equivale a um prejuízo econômico mensal para esta indústria de laticínios de US\$ 15 480 e anual de US\$ 185 760.

Portanto, medidas devem ser adotadas pelas indústrias de laticínios para minimizar a contaminação e crescimento de bactérias psicrotóxicas no leite cru, evitando prejuízos financeiros decorrentes da redução do rendimento de queijos. Práticas higiênicas adequadas, a refrigeração rápida do leite cru a 4 °C ou menos e uma redução do tempo de estocagem são medidas necessárias para a obtenção de uma população baixa de bactérias psicrotóxicas no leite cru.

5. CONCLUSÕES

O crescimento de bactérias psicrotróficas no leite cru durante a estocagem a 10 °C promoveu aumento do nitrogênio total e do teor de gordura perdidos no soro e reduziu o rendimento (L/ kg) do queijo Minas Frescal em 6,78%.

As perdas financeiras decorrentes da redução do queijo Minas Frescal, foram estimadas, para uma indústria de laticínios que processa 50.000 litros de leite/dia, em US\$ 15 480 por mês.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAKU, E. N.; COLLISON, E. K.; GASHE, B. A.; MPUCHANE, S. Microbiological quality of milk from two processing plants in Botswana. **Food Control**, v. 15, p. 181-186, 2004.

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Queijos - mercado total brasileiro**. Compilado e organizado por Disney Criscione, São Paulo, 2005.

ALATOSSAVA, P. M.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. **Microbiological Research**, 2006.

ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicrótróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. 1º edição. Juiz de Fora-MG, Embrapa Gado de Leite, 168 p., 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12^a ed., Washington, 1094p., 1995.

AYLWARD, E.B.; O'LEARY, J.; LANGLOIS, B.E. Effect of milk storage on Cottage cheese yield. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 11, p. 1819 -1825, 1980.

BANKS, J. The quality of milk in relation to cheese manufacture. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 43, n. 5, p. 35-39, 1990.

BANKS, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; PHILLIPHS, J.D.; MUIR, D.D. A comparison of the effects of storage of raw milk at 2 °C and 6 °C on the yield and quality of Cheddar cheese. **Food Microbiology**, v. 5, p. 9-16, 1988.

BENDICHO, S.; MARTÍ, G.; HERNÁNDEZ, T.; MARTÍN, O. Determination of proteolytic activity in different milk systems. **Food Chemistry**, v. 79, p. 245-249, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA**. Brasília: 116 p., 1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, n. 172, p. 8-13, 20 set. 2002a. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e Oficializa o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, n. 172, p. 13-22, 20 set. 2002b. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico Mercosul de identidade e qualidade do queijo Minas Frescal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, p. 19684, 8 set. 1997. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e produtos Lácteos. Instrução Normativa nº 22, de 14/04/2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, p. 3, 2 mai. 2003. Seção I

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 51, p. 59-63, 1996.

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

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.

COSTA, L. M. ; GÓMEZ, M. F.; MOLINA, L. H.; ROMERO, A. Cinética del crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* en leche cruda a temperaturas de refrigeración. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 51, p. 1-10, 2001.

COSTA, L. M.; GÓMEZ F. S.; MOLINA, L. H. C.; SIMPSON, R. R.; ROMERO, A. M. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 52, p. 1-13, 2002.

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

COUSIN, M.A.; MARTH, E.H. Cheddar cheese made from milk that was precultured with psychrotrophic bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n. 7, p. 1048-1056, 1977.

COUSINS, C.; SHARPE, M. E.; LAW, A. The bacteriological quality of milk for cheddar cheesemaking. **Dairy Industries International**, v. 42, p. 12-17, 1977.

CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 47, p. 96-100, 1992.

ELLIS, B.R.; MARTH, E.H. Growth of *Pseudomonas* or *Flavobacterium* in milk reduced yield of Cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, v. 47, n. 9, p. 712-716, 1984.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Consumo per capita mundial de queijos**. Disponível em: < <http://www.cnpqgl.embrapa.br>>. Acesso em: mar. 2006.

FARKYE, N.; Cheese technology. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, p.91-98, 2004.

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

FRANK, J. F. Milk and dairy products. In DOYLE, P., BEUCHAT, R. MONTVILLE, J. **Food microbiology – Fundamentals and frontiers**, Washington, cap.6, p. 101-116, 1997.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: RICHARDSON, G. H. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16 ed. Cap. 8, p.189-201, 1992.

FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo. Fonte Comunicações e Editora. 200 p., 2005.

FURTADO, M.M.; NETO, J.P.M.L. **Tecnologia de queijos**. 1º edição. São Paulo –SP. Editora Dipemar Ltda, 1994.

GEBRE-EGZIABHER, A.; HUMBERT, E. S.; BLANKENAGEL, G. Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes. **Journal of Food Protection**, v. 43, n.9, p.709-712, 1980.

GUINOT-THOMAS, P.; AMMOURY, M. A.; ROUX, Y. L.; LAURENT, F. Study of proteolysis during storage of raw milk at 4 °C: effect of plasmin and microbial proteinases. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 685-697, 1995.

HARYANI, S.; DATTA, N.; ELLIOTT, A. J.; DEETH, H. C. Production of protease by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 15-20, 2003.

HICKS, C. L.; ALLAUDDIN, M.; LANGLOIS, B.E; O'LEARY, J. Psychrotrophic bacteria reduce cheese yield. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 4, p. 331-334, 1982.

HICKS, C. L.; ONUORAH, C.; O'LEARY, J.;LANGLOIS, B.E. Effect of milk quality and low temperature storage on cheese yield - A Summation. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 3, p. 649-657, 1986.

JUFFS, H. S. Proteolysis detection in milk. III Relationships between bacterial populations tyrosine value and organoleptic quality during extended cold storage of milk and cream. **Journal of Dairy Research**, v. 42, p. 31-41, 1975.

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

KLEI, L.; YUN, J.; SAPRU, A.; LYNCH, J.; BARBANO, D.; SEARS, P.; GALTON, D. Effects of milk somatic cell count on Cottage cheese yield and quality. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 5, p. 1205-1213, 1998.

LAW, B. A. Review of the progress of dairy science: enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. **Journal of Dairy Research**, v. 46, n.3, p. 573-588, 1979.

LAW, B. A.; ANDREWS A. T.; CLIFFE, A. J. SHARPE, M. E.; CHAPMAN, H. R. Effect of proteolytic raw milk psychrotrophs on Cheddar cheese-making with stored milk. **Journal of Dairy Research**, v. 46, n.3, p. 497-509, 1979.

LUCEY, J.; KELLY, J. Cheese yield. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 47, n. 1, 1994.

MATIOLI, G. P. **Influência do leite proveniente de vacas mastíticas no rendimento de queijo Minas Frescal**. 2000. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2000.

MOURA, C. J. **Efeito do resfriamento do leite sobre o rendimento e lipólise do queijo tipo parmesão**. 1997. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 1997.

MUIR, D.D. The shelf-life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.49, n.1, p.24-32, 1996.

MURPHY, S.C.; BOOR, K.J. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.20, n.8, p.606-611, 2000.

NELSON, P. J.; MARSHALL, R. T. Microbial proteolysis sometimes decreases yield of cheese curd. **Journal of Dairy Science**, v. 60, p.35, 1977.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 25, n. 1, p. 191-195, 2005.

NIELSEN, S. S. Plasmin system and microbial proteases in milk: Characteristics, roles, and relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.6628-6634, 2002.

PICARD, C.; PLARD, I.; COLLINI, J. C. Application of the inhibition ELISA method to the study of proteolysis caused by heat-resistant *Pseudomonas* protease specific towards kappa-casein in heat milk. **Milchwissenschaft**, v. 51, p. 438-442, 1996.

PINTO, C. L. O. **Bactérias psicrotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado á produção do leite UHT**. 2004. 97p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2004.

PINTO, U. M. **Quorum sensing em bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite**.2005. 81p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; JÚNIOR, L. C. G. C.; OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite e derivados. Métodos analíticos**. 2ª edição. Juiz de Fora-MG, Epamig, Templo Gráfica e Editora Ltda, 234 p., 2001.

PERRY, K. S. P. Cheese: chemical, biochemical and microbiological aspects. **Química Nova**, v.27, n.2, p.293-300, 2004.

RAJMOHAN, S.;DODD, C.E.R.; WAITES, W.M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p. 205-213, 2002.

ROSA, P. R. **Efeitos da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas Frescal**. 2004. 140p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia

dos Alimentos)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba-SP, 2004.

RYSER, E. Microorganisms of importance in raw milk. **Michigan Dairy Review**, v. 8, p. 7-9, 1999.

SANTOS, M. V.; LARANJA DA FONSECA, L.F. Bactérias psicotróficas e a qualidade do leite. **CBQL em revista**, n. 3, 2002.

SHAH, N.P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v.49, p. 432-437, 1994.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science e Techology**, v.8, p.35-40, 1997.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: Fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. Juiz de Fora-MG, Templo Gráfica e editora, 128 p., 2004.

STEPANIAK, L. Dairy enzymology. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, p. 153-171, 2004.

STEVENSON, R. G.; ROWE, M. T.; WISDOM, G. B.; KILPATRICK, D. Growth kinetics and hydrolytic enzyme production of *Pseudomonas* spp. isolated from pasteurized milk. **Journal of Dairy Research**, p. 293-296, 2003.

STOFER, W.; HICKS, C. L. Pernicious psychrophiles - their effect on cheese yield and composition. **Cultured Dairy Production Journal**, v.18, p. 11-14, 1983.

VASSILIADOU, D.K.; ALICHANIDIS, E. Effect of refrigerated storage of milk on the manufacture and quality of Teleme cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 51, p. 629-636, 1984.

WANG, L.; JAYARAO, B.M. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1421-1429, 2001.

YAN, L.; LANGLOIS, B.E; O'LEARY, J. Effect of storage conditions of grade A raw milk on proteolysis and cheese yield. **Milchwissenschaft**, v.38, p. 715-717, 1983.

YATES, A. R.; ELLIOTT, J. A. The influence of psychrotrophs on the protein content of whey. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 10, p. 269-271, 1977.