



REJIANE AVELAR BASTOS

**INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO E DA
CONTAGEM DE BACTÉRIAS
PSICROTRÓFICAS DO LEITE NAS
CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO PRATO
DURANTE A MATURAÇÃO**

LAVRAS – MG

2015

REJIANE AVELAR BASTOS

**INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO E DA CONTAGEM DE
BACTÉRIAS PSICROTÓFICAS DO LEITE NAS CARACTERÍSTICAS
DO QUEIJO PRATO DURANTE A MATURAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dra. Sandra Maria Pinto

Coorientador

PhD. Luiz Ronaldo de Abreu

LAVRAS – MG

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo (a) próprio (a) autor (a)**

Bastos, Rejiane Avelar.

Influência do Armazenamento e da Contagem de Bactérias
Psicrotróficas do Leite nas Características do Queijo Prato Durante a
Maturação / Rejiane Avelar Bastos. – Lavras : UFLA, 2015.
209 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador(a): Sandra Maria Pinto.

Bibliografia.

1. Refrigeração do leite. 2. Qualidade do Leite. 3. Qualidade do
Queijo Prato. 4. Rendimento de Produção. I. Universidade Federal
de Lavras. II. Título.

REJIANE AVELAR BASTOS

**INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO E DA CONTAGEM DE
BACTÉRIAS PSICROTÓFICAS DO LEITE NAS CARACTERÍSTICAS
DO QUEIJO PRATO DURANTE A MATURAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de novembro de 2014.

Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima UFLA

Dr. Geraldo Marcio da Costa UFLA

Dr. Renata Colin Bueno Costa EPAMIG

Orientador

Dra. Sandra Maria Pinto

Coorientador

PhD. Luiz Ronaldo de Abreu

LAVRAS – MG

2014

A Deus, por toda a essência da vida.

Aos meus pais, Sebastião Hélio e Fátima, por todo amor e dedicação.

Aos meus irmãos, Renata e René, pela amizade e pelo incentivo.

*Aos meus sobrinhos, João Vitor, Anna Clara e Letícia, por simplesmente
fazerem parte de minha vida.*

Ao Raul, pelo amor, incentivo e companheirismo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Sandra Maria Pinto, pela oportunidade, orientação, confiança, amizade, apoio e dedicação, desde o início da graduação até o término do doutorado.

Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu, pela confiança, amizade, apoio e pelos ensinamentos transmitidos.

Sandra e Luiz Ronaldo, a vocês, por terem feito tudo isso por mim, pois, além de me ensinarem a pesquisa e atividades acadêmicas, me ajudaram a ser uma pessoa melhor, foram meus conselheiros, amigos e me apoiaram sempre.

Aos demais professores do Departamento de Ciência dos Alimentos, pelos ensinamentos.

Aos laboratoristas e funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela colaboração. Em especial, à Cleusa, técnica do laboratório de leite, pela amizade, pelo carinho, pelos ensinamentos, pela sua dedicação em sempre ajudar, pelo suporte e atenção na realização desse projeto. Obrigada por todos esses anos de convivência, de amizade e carinho.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Laticínios: Thais, Ana Paula, Marcel, Elisângela, Ranielly, Dieyckson, Tassyana e Sérgio, que tornaram a rotina de análises mais agradáveis e que muito contribuíram na realização deste trabalho.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, compreensão, pela força e suporte, mesmo antes do início, até a concretização deste trabalho. O exemplo e

os ensinamentos transmitidos sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos e nunca desistir.

Aos meus irmãos, Renata e René, pelo amor, pelo carinho e apoio. Amo muito vocês!

Ao Raul, pelo apoio, companheirismo e incentivo. Obrigada pela paciência nos momentos difíceis e por acompanhar todos os meus passos e me manter erguida para que eu nunca desanimasse

Às minhas amigas, em especial Débora e Cristelayne, por sempre estarem do meu lado, por torcerem sempre por mim, pelos conselhos e por simplesmente me escutarem.

A Thais Oliveira e Juliana, pela amizade, paciência e companheirismo nesta reta final do doutorado.

Aos colegas do Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais campus Barbacena, pelo apoio durante a fase final de elaboração da tese.

A Deus, por incluir-me como parte integrante de sua criação.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho, minha sincera gratidão.

Muito Obrigada!

RESUMO GERAL

O armazenamento do leite sob refrigeração e o conseqüente crescimento das bactérias psicotróficas e a atuação de suas enzimas podem trazer alterações às características do próprio leite e às características do queijo, principalmente durante sua maturação. A fim de obter dados para verificar como estas variáveis influenciam as características do leite utilizado para a produção de derivados e a qualidade, o rendimento e as características durante a maturação do queijo tipo prato, foram realizadas inoculações no leite com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, o qual foi armazenado nas temperaturas de 4°C, 7°C e 10°C, por 24, 48 e 72 horas. O leite foi analisado em cada intervalo de tempo nas respectivas temperaturas e com ele foi fabricado queijo prato. Os queijos foram analisados durante 60 dias de maturação. Foi verificado aumento da contagem das bactérias psicotróficas no leite com o aumento do tempo e da temperatura, sendo mais expressivo quando o leite foi inoculado com alta contagem de bactérias psicotróficas. As alterações na qualidade deram-se em relação a um aumento da atividade proteolítica e lipolítica no leite, e, assim, ocorreu o aumento de proteínas solúveis e na quantidade de ácidos graxos livres. A contagem inicial de bactérias psicotróficas, o tempo e a temperatura de armazenamento do leite influenciaram de forma direta a qualidade final do leite, a qual modificou substancialmente a composição e o rendimento do queijo prato, percebendo-se as seguintes mudanças: alteração no tempo de coagulação do leite, alteração das características físico-químicas e queda significativa no rendimento. Os queijos produzidos com leite inoculado com alta e baixa contagem de bactérias psicotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas apresentaram, durante a maturação, maiores índices proteolíticos devido à maior umidade, ao maior teor de ácidos graxos livres pela ação das enzimas lipolíticas, ao aumento do pH devido à maior proteólise e à alteração na coloração. Essas alterações podem influenciar de forma negativa a aceitação dos queijos prato pelo consumidor, uma vez que se obtiveram queijos com características diferentes do queijo prato produzido com leite recém-ordenhado. Assim, é necessário o controle da contaminação inicial do leite com bactérias psicotróficas, o tempo e a temperatura de armazenamento do leite, mesmo que estes estejam dentro dos padrões exigidos pela legislação, evitando, assim, a perda de rendimento e da qualidade, e alterações das características durante a maturação.

Palavras-chave: Refrigeração do leite. Qualidade do leite. Qualidade do queijo Prato. Rendimento de produção. Proteólise. Lipólise.

GENERAL ABSTRACT

Milk storage under refrigeration and the consequent growth of psychrotrophic bacteria and the acting of their enzymes can bring alterations to the characteristics of milk itself and to the characteristics of the cheese, chiefly during its ripening. In order to obtain data to verify how these variables influence the characteristics of the milk used for the production of dairy products and the quality, yield and the characteristics during the ripening of the prato-type cheese. Inoculations were conducted in the milk with high and low count of psychrotrophic bacteria, which was stored at the temperatures of 4C, 7C and 10 C for 24, 48 and 72 hours. The milk was analyzed at each time interval at the respective temperatures and with it prato cheese was manufactured. The cheeses were analyzed for 60 days' ripening. Increased count of psychrotrophic bacteria in the milk with increasing time and temperature was found, its being more expressive when milk was inoculated with high count of psychrotrophic bacteria. The alterations in the milk quality took place in relation to an increase of the proteolytic and lypolytic activity in the milk and so the increase of soluble proteins and in the amount of free fatty acids occurred. The initial count of psychrotrophic bacteria, the time and temperature of storage of the milk influenced in a direct way the final quality of the milk, which modified markedly both the composition and yield of prato cheese, the following changes: being realized: alterations in the milk coagulation time, alterations of the physicochemical characteristics and significant fall in yield. The cheeses produced from milks inoculated with a high and low count of psychrotrophic bacteria and stored at different times of times and temperatures presented, during ripening, higher proteolytic indices due to the increased moisture, increased free fatty acid content through the action of the lypolytic enzymes, to the rise of pH owing to the greater proteolysis and to the alteration in the coloration. These alterations can influence in a negative way the acceptance of prato cheeses by the consumer, since cheeses with characteristics different from the prato cheese produced from freshly milked milk. So, the control is necessary of the initial contamination by psychrotrophic bacteria, storage time and temperature of milk is needed, even these are within the standards demanded by legislation, preventing thus the loss of yield and quality and alterations of the characteristics during ripening.

Keywords: Milk refrigeration. Milk quality. Prato cheese quality. Production yield. Proteolysis. Lipolysis.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	12
	INTRODUÇÃO GERAL	12
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Queijo prato	15
2.2	Maturação do queijo prato	17
2.3	Rendimento de queijos	21
2.4	Armazenamento do leite cru refrigerado	25
2.5	Bactérias psicrotróficas	28
2.5.1	Microrganismos psicrotróficos: consequências na qualidade do leite e produtos lácteos	34
3	CONCLUSÃO GERAL	42
	REFERÊNCIAS	44
	CAPÍTULO 2 Efeito do armazenamento do leite e da contagem de bactérias psicrotróficas na qualidade do leite	58
1	INTRODUÇÃO	61
2	MATERIAL E MÉTODO	63
2.1	Tratamentos e preparo do leite	63
2.2	Análises do leite	65
2.2.1	Análises microbiológicas	65
2.2.2	Análises físico-químicas	66
2.2.3	Análises enzimáticas	66
2.3	Delineamento experimental e análise estatística dos dados	67
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
3.1	Composição físico-química	68
3.2	Microbiologia	69
3.3	Concentração de ácidos graxos livres e atividade lipolítica	74
3.4	Frações de proteínas e atividade proteolítica	81
4	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	90
	CAPÍTULO 3 Influência do armazenamento e da contagem de bactérias psicrotróficas do leite na produção, nas características e no rendimento do queijo prato	98
1	INTRODUÇÃO	101
2	MATERIAL E MÉTODO	103
2.1	Tratamentos e preparo do leite	103
2.2	Análises do leite	105
2.2.1	Análises microbiológicas	105
2.2.2	Análises físico-químicas	106

2.2.3	Análises enzimáticas	106
2.3	Fabricação dos queijos prato.....	107
2.4	Tempo de coagulação da fabricação dos queijos prato.....	108
2.5	Análises dos queijos prato	108
2.6	Cálculo do rendimento dos queijos prato.....	109
2.7	Delineamento experimental e análise estatística dos dados	109
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
3.1	Matéria-prima para a fabricação de queijos.....	111
3.1.1	Composição físico-química	111
3.1.2	Microbiologia	112
3.1.3	Concentração de ácidos graxos livres e atividade lipolítica.....	114
3.1.4	Frações de proteínas e atividade proteolítica	117
3.2	Tempo de coagulação do leite	120
3.3	Composição e características físicas dos queijos prato	122
3.4	Rendimento dos queijos prato	127
4	CONCLUSÃO	137
	REFERÊNCIAS	138
	CAPÍTULO 4 Efeito das condições do armazenamento do leite e da contagem de bactérias psicotróficas na maturação do queijo prato	145
1	INTRODUÇÃO	148
2	MATERIAL E MÉTODO	150
2.1	Tratamentos e preparo do leite	150
2.2	Análises do leite.....	152
2.2.1	Análises microbiológicas.....	152
2.2.2	Análises físico-químicas	152
2.2.3	Análises enzimáticas	153
2.3	Fabricação dos queijos prato.....	153
2.4	Análises dos queijos	155
2.5	Delineamento experimental e análise estatística dos dados	157
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	158
3.1	Matéria-prima para a fabricação de queijos.....	158
3.1.1	Composição físico-química	158
3.1.2	Microbiologia	159
3.1.3	Concentração de ácidos graxos livres e atividade lipolítica.....	161
3.1.4	Frações de proteínas e atividade proteolítica	164
3.2	Composição e características físicas dos queijos prato	167
3.3	Características dos queijos prato durante a maturação	172
3.3.1	pH.....	172
3.3.2	Concentração de ácidos graxos livres.....	174
3.3.3	Índices de proteólise.....	177
3.3.4	Perfil de textura	184

3.3.5	Cor.....	194
4	CONCLUSÃO.....	200
	REFERÊNCIAS.....	201

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A indústria queijeira do Brasil está conseguindo elaborar produtos que vêm obtendo, gradativamente, melhor aceitação no mercado. Entretanto, a indústria pode vir a ter prejuízos e baixa competitividade devido à baixa qualidade de seus produtos, a qual pode ser consequência da qualidade do leite.

Devido à importância da qualidade do leite para a indústria laticinista e à constatação da baixa qualidade do produto no Brasil, foi elaborada a Instrução Normativa nº51, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, editada em 2002 e em vigor desde 2005, que fixou os requisitos mínimos para a produção, a identidade e a qualidade, e regulamentando a coleta e o transporte do leite. Em 2011, alguns regulamentos da Instrução Normativa nº51 (BRASIL, 2002) foram revogados pela Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011), dentre estes o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru, Refrigerado e seu Transporte a Granel.

Uma das grandes contribuições que Instrução Normativa nº51 (BRASIL, 2002) trouxe para a melhoria da qualidade do leite foi a regulamentação da conservação, da coleta e do transporte de leite cru refrigerado, a qual também é regulamentada pela legislação em vigor. A Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2011) estabelece que a temperatura máxima de conservação do leite é de 7 °C, na propriedade rural/tanque comunitário e de 10 °C, no estabelecimento processador.

A refrigeração trouxe várias vantagens tanto para a indústria como para o produtor, uma vez que a qualidade do leite pode ser mantida por mais tempo, devido à baixa temperatura, não ocorrendo devolução para o produtor devido à alta acidez, um problema que era frequente na indústria. Entretanto, a manutenção do leite cru sob refrigeração favorece o crescimento de bactérias

psicrotróficas. Esses microrganismos são capazes de se multiplicar a temperaturas inferiores a 7 °C, independente de sua temperatura ótima de crescimento. A maioria das bactérias psicrotróficas não suporta temperaturas de pasteurização e ultra-alta temperatura (UAT), porém, muitas são capazes de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes que podem resultar em problemas tecnológicos, tais como a formação de sabores estranhos, a coagulação e a redução do rendimento de produtos derivados do leite.

As perdas econômicas podem ser significativas para as indústrias de queijos em razão das alterações da qualidade do produto e da redução no rendimento de fabricação provocadas pelas atividades de proteases e lipases produzidas por bactérias psicrotróficas no leite cru refrigerado. Entretanto, não se tem conhecimento da influência do armazenamento e da contagem de bactérias psicrotróficas na qualidade, no rendimento e no comportamento do queijo prato durante a maturação, os quais são necessários para a melhoria da qualidade e o ajuste no processo de elaboração.

Neste contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da temperatura e do tempo de refrigeração e da contagem de bactérias psicrotróficas do leite na sua qualidade, na fabricação e na qualidade de queijo prato, bem como o seu comportamento durante a maturação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Queijo prato

Queijo é um produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias, especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

Segundo a legislação, o queijo prato é definido como um queijo maturado, obtido por coagulação enzimática do leite, complementada pela ação de bactérias lácticas específicas. O produto deve ter consistência elástica, textura macia e compacta, podendo apresentar pequenas olhaduras bem distribuídas. Além disso, deve ser maturado por, no mínimo, 25 dias (BRASIL, 1997).

Sob a denominação de queijo prato estão incluídas as variedades lanche ou *sandwich*, bola ou esférico e cobocó. Os pesos variam de 0,4 a 5 kg, de acordo com a variedade correspondente. É classificado como um queijo de massa semicozida, gordo e de média umidade (BRASIL, 1997), devendo apresentar 45,0 e 59,9 g 100⁻¹ de gordura no extrato seco e 36,0 e 45,9 g 100⁻¹ de umidade (BRASIL, 1996).

Furtado e Lourenço Neto (1994) afirmam que o queijo prato começou a ser fabricado no Brasil na década de 1920, na região do sul de Minas Gerais, por imigrantes dinamarqueses. Acredita-se que sua tecnologia de fabricação tenha se baseado, principalmente, na de queijos como o danbo dinamarquês e o gouda holandês. Entretanto, de acordo com Furtado e Amorim (2000), a tecnologia foi

adaptada às condições locais, o que explica as diferenças de sabor e textura em relação aos queijos que lhe deram origem.

Ao longo dos últimos 80 anos, o queijo prato vem passando por inúmeras modificações, seja em sua tecnologia de fabricação ou na maneira como é consumido (FURTADO; AMORIM, 2000). Atualmente, este produto vem sendo consumido de forma indireta, principalmente em sanduíches, o que requer características sensoriais e características tecnológicas, como derretimento, elasticidade, etc. Dentre as características sensoriais do queijo prato, destacam-se seu sabor suave e consistência macia (AUGUSTO, 2003). É considerado um tipo de queijo de melhor padrão tecnológico e comercial (HENRIQUE, 2005), além de ser um dos queijos com protocolo de fabricação mais bem definido dentro da indústria brasileira (VIANNA, 2006).

Segundo Furtado e Lourenço Neto (1994), o queijo prato é fabricado com leite pasteurizado, admitindo-se a pasteurização lenta (63 °C/30 minutos) e a rápida (72-75 °C/ 15-20 segundos). Na temperatura de coagulação do leite (32–35 °C) adicionam-se a cultura láctica, o cloreto de cálcio, o corante urucum e o coalho. Após a coagulação, a massa é cortada e agitada por, aproximadamente, 20 minutos, com a finalidade de promover a dessoragem dos grãos. Em seguida, retiram-se 30% do soro e inicia-se o aquecimento gradativo da mistura soro/massa, com adição de água a 80 °C, até que a mistura alcance 40 °C. A mistura é mantida nesta temperatura, sob agitação, até a obtenção do ponto de massa. As etapas seguintes são dessoragem, enformagem, prensagem, salga em salmoura e maturação.

O fermento láctico mesofílico empregado na obtenção de queijo prato pode ser acidificante ou acidificante e aromatizante. Para a produção de um queijo de massa fechada e aroma mais suave, o fermento láctico utilizado na fabricação é composto, basicamente, de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Entretanto, quando se objetiva produzir queijo

com sabor mais pronunciado, indica-se a utilização de fermento composto por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetilactis*, microrganismos estes que produzem, além do ácido láctico, aroma e gás carbônico, conferindo ao queijo sabor e olhaduras típicas (FURTADO; AMORIM, 2000).

2.2 Maturação do queijo prato

A maturação é um processo enzimático que envolve uma série de modificações bioquímicas (proteólise, glicólise, lipólise e metabolismo de citrato) nos principais constituintes do coágulo, que ocorrem durante o processamento do queijo (MORENO et al., 2002).

De acordo com Brasil (1997), o queijo prato deve ser maturado por, no mínimo, 25 dias. Entretanto, segundo Minussi, Furtado e Mosquim (1995) e Perry (2004), antes de ser consumido, ele deve ser maturado por um período entre 45 e 60 dias, para adquirir suas melhores características, as quais são resultado de uma série de eventos que ocorrem durante a maturação. Este período é considerado muito longo e muitas indústrias não submetem o produto a tal tratamento, algumas por não disporem de estrutura física e outras por razões econômicas.

O queijo prato apresenta características próprias, as quais são adquiridas por meio do processo de maturação. Nesta etapa do processamento, realizada em condições de temperatura e umidade controladas, 12°C e 70-85% UR (umidade relativa), ocorrem reações bioquímicas (SILVA, 1998).

Ocorrem três eventos principais na maturação de queijos: glicólise, proteólise e lipólise. Estas reações são responsáveis pela mudança de textura que ocorre no coágulo do queijo durante a maturação e são também grandemente

responsáveis pelo aroma do queijo, embora numerosas mudanças secundárias ocorram concomitantemente (FOX et al., 1993).

O processo de maturação é complexo, envolvendo mudanças microbiológicas e bioquímicas na massa que resultam em sabor, aroma e textura características de cada variedade (MCSWEENEY, 2004).

Dos processos bioquímicos envolvidos durante a maturação de queijos, a proteólise é a mais complexa e, possivelmente, a mais importante para o desenvolvimento das características sensoriais dos queijos (FARKYE, 1995; FERNÁNDEZ; FOX, 1998; FOX, 1998; SOUZA; ARDÖ; MCSWEENEY, 2001; VISSER, 1993).

Segundo Fox (1989), na maturação do queijo prato, a proteólise é, sem dúvida, o evento mais importante. Ela contribui para o desenvolvimento de aromas desejáveis e indesejáveis, os quais são formados pela liberação de aminoácidos e peptídeos, por meio da hidrólise, ou via catabolismo de aminoácidos, transformando-os em aminas, ácidos, tióis e tioésteres. Estes compostos responsáveis pelo sabor são liberados durante a mastigação. Contribuem também para mudanças na textura pela quebra da cadeia de proteínas, aumento do pH (via formação de NH_3) e aumento na capacidade de ligar água pela formação de novos grupos amínicos e carboxílicos.

As principais fontes de enzimas responsáveis pela proteólise incluem o coalho residual, as enzimas naturais do leite, especialmente a plasmina, as enzimas produzidas pelos microrganismos do fermento e as produzidas por microrganismos contaminantes, não presentes no fermento (FOX, 1989).

Em queijos de massa lavada, a proteólise ocorre, inicialmente, pela ação da atividade residual do coalho, especialmente a quimosina, responsável pela formação da maior parte das substâncias nitrogenadas solúveis, com a liberação de peptídeos de alto e médio peso molecular e baixa quantidade de aminoácidos.

A α_1 -caseína é a fração da caseína degradada mais rapidamente durante a maturação. Sua degradação é favorecida pelo pH do queijo e pela proximidade do pH ótimo de atuação do coalho, bem como pelo conteúdo de sal. A β -caseína é hidrolisada mais lentamente e aproximadamente 50% desta fração da caseína permanecem intactos após seis meses de maturação (WALSTRA; NOOMEN; GEURTS, 1999).

A textura desejável em queijos é desenvolvida durante a maturação e pode ser dividida em duas fases. A primeira fase acontece entre os dias 7 e 14 após a fabricação do queijo, quando a textura “borrachenta” do queijo jovem é transformada em macia e homogênea. O enfraquecimento da caseína acontece quando 20% das ligações Phe24-Val25, das α_1 -caseínas, são hidrolisadas formando o peptídeo α_1 -I-caseína, o qual está presente no estágio inicial de maturação em todos os tipos de queijos. A segunda fase envolve mudança mais gradual na textura, a qual envolve a hidrólise das α_1 -caseínas restantes e de outras caseínas, levando meses ou semanas para acontecer. A hidrólise das proteínas é controlada principalmente pela proporção residual de quimosina e plasmina, pelas proteinases bacterianas, pela relação sal e umidade e pela temperatura de estocagem (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987).

A proteólise, como índice de maturação, envolve a caracterização, a separação e a quantificação dos compostos nitrogenados do queijo durante a maturação. O índice de extensão de maturação é caracterizado pela proporção de moléculas de proteínas que são decompostas, predominantemente, em peptídeos grandes. O índice de profundidade de maturação refere-se ao grau destes produtos quebrados em componentes menores, entre os quais estão os aminoácidos. A determinação analítica do índice de extensão baseia-se na precipitação isoelétrica da caseína a pH 4,6 em uma amostra diluída de queijo, seguida pela quantificação do nitrogênio solúvel pelo método de Kjeldahl. A

profundidade é quantificada pelo nitrogênio medido pelo nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12% (WALSTRA; NOOMEN; GEURTS, 1999).

A lipólise é um evento limitado a poucas variedades de queijos, provavelmente pela utilização de leite cru na fabricação e o período prolongado de estocagem refrigerada (FOX, 1998). Em queijos como gouda, cheddar e suíço, a lipólise é, geralmente, baixa, mas é extensiva em queijos maturados por fungos e em algumas variedades italianas de queijo duro. Nos queijos de massa lavada, a lipólise é limitada e ocorre caso seja desejada. A ausência desse evento está relacionada à qualidade bacteriológica do leite que é submetido à termização ou à pasteurização e à ausência de crescimento microbiano na superfície do queijo durante a maturação.

Em condições controladas de fabricação, a lipólise pode ocorrer e é resultante da ação das lipases das bactérias lácticas do fermento e, possivelmente, lipases termorresistentes de organismos psicrotróficos. As enzimas atuam sobre os triacilglicerídeos, produzindo ácidos graxos a partir de mono e diacilglicerídeos formados por ação das lipases do leite e/ou de outras lipases microbianas. A lipólise nos queijos é influenciada pelo aumento de temperatura, população elevada de bactérias psicrotróficas e homogeneização do leite (WALSTRA; NOOMEN; GEURTS, 1999).

A fermentação da lactose em ácido láctico pelas bactérias lácticas do fermento é uma reação importante na fabricação de todas as variedades de queijos (FOX et al., 1996). A concentração da lactose residual na coalhada depende do método de fabricação, do tipo e da atividade do fermento e da concentração do sal na fase aquosa (FOX; LUCEY; COGAN, 1990). A maior proporção de lactose presente no leite (cerca de 98%) é removida com o soro como lactose ou lactato ao final da fabricação (FOX, 1998).

A lactose presente na massa é metabolizada rapidamente a L- lactato por ação da cultura láctica nas primeiras 12 horas da etapa inicial da maturação

(FOX, 1998). A atividade da cultura láctica e a sua capacidade em fermentar a lactose residual são influenciadas pela relação sal/umidade na massa (FOX; MCSWEENEY, 1996).

A qualidade dos queijos é grandemente influenciada pela fermentação da lactose residual. Em queijos de massa lavada, a fermentação da lactose produz ácido láctico e pouco ácido acético com a redução do pH do queijo a 5,1-5,2. Ao final da fermentação (cerca de 10 horas), a concentração do ácido láctico no queijo fresco é de 3% e parte deste ácido encontra-se não dissociado, com efeito bacteriostático maior com a diminuição do pH. As alterações de pH, juntamente com o teor de sal, inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis e auxiliam na formação de uma crosta protetora no queijo (WALSTRA; NOOMEN; GEURTS, 1999).

O pH dos queijos de massa lavada pode aumentar durante a maturação, dependendo do conteúdo de lactose residual na massa do queijo. Nos queijos de massa lavada, em que parte do soro é substituída por água, ocorre remoção parcial da lactose com delactosagem e a lactose residual é metabolizada rápida e totalmente, ocorrendo depois um aumento do pH, em função de compostos resultantes da proteólise do queijo (FOX et al., 2000).

2.3 Rendimento de queijos

Um dos principais fatores que garantem a viabilidade econômica da produção de queijos é a quantidade de queijo obtida a partir do leite e é uma indicação da eficiência das operações de fabricação (SLYKE; PRICE, 1979). Furtado e Lourenço Neto (1994) consideram adequado o rendimento, para o queijo prato, de 9,0 e 9,5 L.kg⁻¹.

O rendimento em queijos é definido como a quantidade de queijo com determinado teor de umidade, produzido a partir de um peso fixo de leite com

um dado conteúdo de gordura, sendo um indicativo da eficiência das operações de fabricação (FURTADO, 2005). É recomendável que o rendimento real seja comparado ao teórico para estimar a sua eficiência (EMMONS, 1993).

Diferenças na eficiência do rendimento em queijos foram observadas em razão dos diferentes tipos de equipamentos e operações de fabricação. Elaborar queijos de igual composição em recipientes de mesma capacidade é difícil, tanto em condições experimentais como comerciais. Assim, há necessidade de um ajuste ou da correção do rendimento para uma composição padrão de queijo. Dessa forma, o rendimento real ou observado deve ser ajustado em razão das variações de composição do queijo, sendo mais comum o ajuste dos teores de umidade e sal do queijo (LAU; BARBANO; RASMUSSEM, 1990).

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, necessário para fabricar um quilograma de determinado tipo de 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 do 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).

Diversas fórmulas têm sido sugeridas para estimar o rendimento em queijo, e a eficiência da operação pode ser medida comparando-se os resultados de produção com os rendimentos teóricos. A recuperação de gordura e caseína pode ser otimizada para o sistema e o conteúdo de umidade pode ser manipulado por alteração na tecnologia de processamento (PHELAN, 1981).

Diversos fatores afetam o rendimento de fabricação de queijos. Segundo Emmons (1993), o rendimento em queijo varia em razão do tipo de queijo, da composição do leite, da composição do queijo (umidade, sal) e das perdas de gordura e de proteínas no soro. A composição do leite é influenciada pela raça

do animal, a variação entre animais de mesma raça, o estágio de lactação, as mudanças de estação, o tipo de alimentação (ração total – volumoso e concentrado), a idade do animal, as doenças (especialmente mastite) e os procedimentos de ordenha (LAWRENCE et al., 1993).

As condições de processamento afetam o rendimento, bem como a perda dos componentes do queijo. Os fatores envolvidos têm um efeito pequeno no rendimento, individualmente, porém, se extrapolado para uma grande produção, o efeito custo/benefício é bastante significativo. Dentre estes podem ser citados: a estocagem, a padronização e a concentração do leite, o meio de crescimento utilizado na preparação da cultura láctica, o tipo de cultura, a termização e a pasteurização, a homogeneização, a adição de cálcio, o tipo de coagulante, a firmeza do coágulo, o tipo de tanque, o sistema de manuseio da coalhada, a lavagem da coalhada, a proporção de sal adicionada e a perda de umidade durante a maturação (LAWRENCE et al., 1993).

De acordo com Furtado (2005), os fatores que influenciam o rendimento de fabricação podem ser divididos em dois grupos. Os fatores diretos compreendem a composição do leite, a composição do queijo e as perdas de gordura e de proteína do leite para o soro, durante o corte e a agitação da coalhada. Os teores de proteínas e de gordura no leite são fundamentais para o rendimento. O teor de umidade afeta de forma marcante o rendimento de fabricação do queijo; quanto maior a umidade, maior o rendimento. Entretanto, o valor elevado de umidade provoca reações como aceleração da maturação, alteração na consistência do produto e diminuição de sua vida útil.

Entre os fatores indiretos estão a estocagem prolongada do leite cru em baixas temperaturas, que pode acarretar mudanças físico-químicas na caseína micelar e o aumento da contagem de psicrotróficos, microrganismos capazes de produzir lipases e proteases termorresistentes que podem degradar a gordura e as proteínas do leite. Outro fator que pode influenciar o rendimento é a mastite,

uma doença infecciosa em que ocorrem aumento das células somáticas no leite e alterações na sua composição e qualidade. O tipo de coalho, as condições de pasteurização do leite e a perda de sais de cálcio durante o tratamento térmico do leite também podem interferir no rendimento em queijos (FURTADO, 2005).

Existem vários estudos que mostram a interferência do armazenamento e da contagem de microrganismos psicrotróficos no rendimento de queijos.

Barbosa et al. (2009) verificaram a diminuição do rendimento do queijo minas frescal, do minas padrão e da muçarela, quando os mesmos foram fabricados com leite inoculado com 10^5 UFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas fluorescens* e armazenado, a 4 °C, por 24, 48 e 72 horas.

Moura (1997) relatou 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, 10^6 UFC.mL⁻¹ de *P. fluorescens*.

Em pesquisa realizada por Cardoso (2006) foi constatada 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 minas frescal foi fabricado com leite refrigerado armazenado por quatro dias. O leite cru que resultou nessas perdas de rendimento apresentava uma população de 10^8 UFC.mL⁻¹ de bactérias psicrotróficas e a população de bactérias psicrotróficas proteolíticas e lipolíticas era superior a 10^7 UFC.mL⁻¹.

Amorim (2007) verificou, em seu estudo, que a estocagem refrigerada de leite cru interferiu no aumento do rendimento industrial da fabricação de queijo prato pela maior retenção de água. Entretanto, este armazenamento influenciou de forma negativa a qualidade sensorial do queijo. Apesar disso, ainda não foi elucidado como o armazenamento e a contagem de bactérias psicrotróficas influenciam o rendimento e a qualidade do queijo prato.

2.4 Armazenamento do leite cru refrigerado

A qualidade do leite no Brasil tem melhorado substancialmente, a partir de 2001. As condições favoráveis relacionadas às oportunidades de exportação permitiram a implementação do Programa de Melhoria da Qualidade do Leite (BRASIL, 2002).

A Instrução Normativa nº51 trata dos regulamentos técnicos para a produção, a identidade e a qualidade do leite, e estabelece novas exigências para o leite cru. Entre elas incluem-se as determinações do teor de gordura e de proteína, a contagem de células somáticas, a contagem total de bactérias e a detecção de resíduos de antibióticos. Além destes requerimentos relacionados à qualidade higiênica e de composição da matéria-prima, também foram exigidas a refrigeração do leite e a coleta em caminhões com tanques isotérmicos (coleta a granel) (BRASIL, 2002).

Como esta Instrução Normativa ocorreu a implementação de melhorias, como a coleta do leite cru refrigerado e o seu transporte a granel (MARTINS, 2004). Essas duas medidas de impacto direto sobre a estrutura de produção leiteira (resfriamento do leite na fazenda e a sua coleta a granel) alteraram as condições na grande maioria das regiões, resultando no quase desaparecimento da coleta em latão e do recebimento de leite não refrigerado. Não há dúvida de que esta foi a medida que, isoladamente, trouxe maior e mais rápido impacto sobre a melhoria da qualidade do leite (SANTOS; FONSECA, 2003).

Alguns anexos da Instrução Normativa nº51 (BRASIL, 2002) foram revogados pela Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2011), a qual estabelece que a temperatura máxima de conservação do leite cru refrigerado é de 7 °C na propriedade rural/tanque comunitário e de 10 °C no estabelecimento processador. Em se tratando de tanque de refrigeração por expansão direta, este deve ser dimensionado de modo que permita refrigerar o leite até temperatura

igual ou inferior a 4°C, no tempo máximo de 3 horas após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade e, em se tratando de tanque de refrigeração por imersão, deve ser dimensionado de modo a permitir refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 7°C, no tempo máximo de três horas após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade.

A refrigeração do leite imediatamente após a ordenha visa diminuir a multiplicação de bactérias mesófilas que causam a acidificação (BOOR et al., 1998; FAGUNDES et al., 2006; PRATA, 2001). Embora promova uma queda na taxa de multiplicação bacteriana, inclusive dos microrganismos mesófilos, a redução da temperatura de estocagem e do transporte do leite é seletiva para as bactérias psicrotólicas que, em períodos prolongados em temperaturas iguais ou menores que 7°C, passam de inexpressivos a dominantes, apresentando um considerável potencial deteriorativo, capaz de promover mudanças sensoriais indesejáveis no leite (KRAFT; REY, 1979; MORITA, 1975; PRATA, 2001; SANTOS; FONSECA, 2002).

Além disso, algumas falhas higiênicas durante a produção podem ser mascaradas com essa prática de refrigeração do leite, especialmente aquelas relacionadas à presença e ao desenvolvimento de microrganismos mesófilos (SOARES, 2004). Dessa forma, a eficiência da refrigeração em manter a qualidade do leite é maximizada se associada a outros fatores, especialmente de ordem higiênica, uma vez que Fonseca e Santos (2000) ressaltam que a microbiota inicial influencia grandemente essa qualidade do leite cru e, conseqüentemente, dos produtos com ele fabricados.

Mesmo nas temperaturas de refrigeração propostas pela legislação brasileira para a conservação do leite na fonte de produção e no estabelecimento industrial pode ocorrer perda de qualidade da matéria-prima, se um controle efetivo de contaminação inicial não for realizado (MARTINS et al., 2004).

Além disso, na grande maioria das propriedades leiteiras, a temperatura de refrigeração oscila entre 5°C a 10°C, o que configura um “resfriamento marginal do leite” (SANTOS; LARANJA, 2001), contribuindo para a multiplicação de microrganismos psicrotróficos, resultando na queda de qualidade do leite e de derivados. Kumerasan, Annalvilli e Sivakumar (2007) e Sorhaug e Stepaniak (1997) indicam que, reduzindo a temperatura de estocagem de 7 °C para 2 °C, reduz-se de modo significativo o desenvolvimento de psicrotróficas e de atividades proteolíticas e lipolíticas. Dessa forma, é necessário respeitar a temperatura de armazenamento do leite exigida pela legislação.

Além da temperatura de refrigeração do leite, a Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011), estabelece que o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e o seu recebimento no estabelecimento que vai beneficiá-lo (pasteurização, esterilização, etc.) deve ser, no máximo, de 48horas, recomendando-se como ideal um período de tempo não superior a 24horas. Esse tempo em que o mesmo fica armazenado favorece o desenvolvimento dos microrganismos psicrotróficos (COUSIN, 1982; SILVEIRA et al., 1998; THOMAS; THOMAS, 1973b) e, assim, quanto maior o tempo de armazenamento, maior será o desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos.

Com a estocagem do leite a 5°C nas propriedades, a população de microrganismos psicrotróficos é duplicada em cerca de 8 horas, em uma progressão geométrica de razão igual a 9 para cada 24 horas de armazenamento (SANTOS; BERGMAN, 2003). Assim, o armazenamento do leite por longos períodos em temperaturas de refrigeração tem resultado em novos problemas de qualidade para a indústria de laticínios. Devido a isso, vários fatores devem ser considerados antes de se estabelecer o período máximo de estocagem do leite em tanques de refrigeração, como a sua temperatura de refrigeração, o número, a

atividade e o tipo de microrganismos psicrotróficos inicialmente presentes no leite (FAIRBAIRN; LAW, 1986; THOMAS; THOMAS, 1973b).

Considerando esses fatores, o leite obtido em boas condições de higiene pode ser estocado a 10°C por apenas um dia, enquanto períodos de estocagem de dois a três dias requerem temperaturas de, no máximo, 4°C para a manutenção de sua qualidade, sem alterar as suas propriedades sensoriais (FAIRBAIRN; LAW, 1986).

O tipo e a frequência de microrganismos do leite cru são determinados pela eficiência nas condições de higiene de produção, tempo e temperatura de estocagem e armazenamento (BRAMLEY; MCKINNON, 1990; COUSIN, 1982). Portanto, o leite produzido sob condições adequadas de higiene e refrigerado a temperaturas iguais ou inferiores a 4 °C apresenta baixa contagem de psicrotróficos (COUSIN, 1982).

2.5 Bactérias psicrotróficas

No Brasil, o leite *in natura* apresenta, de maneira geral, altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos e coliformes, indicando, assim, uma deficiência na higiene de produção (MOURA et al., 1999).

Os microrganismos que, normalmente, contaminam o leite crescem numa ampla faixa de temperatura, podendo ser divididos em psicrófilos, mesófilos e termófilos (SILVA, 1991).

As bactérias termofílicas são definidas como aquelas cuja temperatura ótima de crescimento situa-se entre 45°C a 65°C. O leite cru, normalmente, contém poucas bactérias termófilas, embora elas possam estar presentes em número suficiente para se desenvolverem no leite mantido a temperaturas elevadas (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF, 1994).

Os mesófilos constituem o grupo que inclui a maioria dos microrganismos acidificantes do leite e podem ser caracterizados por se desenvolverem entre temperaturas de 20°C a 45°C, com a temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 40°C (JAY, 2002).

Os psicrófilos constituem o grupo de bactérias que encontram em na faixa de 0°C a 20°C sua temperatura ótima de crescimento (COLLINS, 1981; SANTANA, 2001).

Na área de microbiologia de alimentos, os organismos capazes de se desenvolver na faixa de temperatura considerada adequada para os psicrófilos, mesmo que essa temperatura não seja ótima para o seu crescimento, são denominados psicrotróficos (COLLINS, 1981; SANTANA, 2001).

O termo psicrotrófico tem confundido os microbiologistas desde o começo do século, devido à utilização de termos sinônimos. Segundo Sorhaung e Stepaniak (1997), bactérias psicrotróficas são todas aquelas que conseguem crescer em temperaturas em torno de 7°C, independente de sua temperatura ótima de crescimento, a qual pode ser de 20°C a 30°C. Um grande número de espécies antes consideradas estritamente mesófilas já foi incluído também entre os psicrotróficos (SILVEIRA et al., 1998).

No leite “in natura”, não refrigerado, há um predomínio de microrganismos mesófilos, dos quais os mais importantes são estreptococos e coliformes, responsáveis pelo processo indesejável de fermentação láctica. Com a adoção de refrigeração no leite nas propriedades leiteiras, vem ocorrendo o predomínio de microrganismos psicrotróficos (SANTOS; LARANJA, 2001; SORHAUNG; STEPANIAK, 1997).

Antunes et al. (2002) relataram a presença de microrganismos psicrotróficos representando 23% da microbiota do leite *in natura*, os quais, em condições de refrigeração, multiplicam-se mais rapidamente do que a microbiota

mesofílica, tornando-se predominantes, geralmente, após dois a três dias de armazenamento sob refrigeração.

No Brasil, alguns estudos evidenciaram valores altos nas contagens de psicotróficos, em leite cru refrigerado. Há propriedades em que as contagens de bactérias psicotróficas são muito altas, especialmente em tanques coletivos (ARCURI et al., 2008). Estes autores analisaram amostras de leite coletadas de 20 tanques coletivos e 23 tanques individuais. As contagens de bactérias psicotróficas nas amostras para os dois tipos de tanques de refrigeração variaram entre 10^2 e 10^7 UFC.ml⁻¹.

Em um estudo realizado por Pinto, Martins e Vanetti (2006), as contagens de psicotróficos variaram entre $2,0 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹ e $1,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, nas amostras coletadas em tanques individuais; entre $8,9 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹ e $3,2 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹, nos tanques coletivos e entre $5,6 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ e $6,4 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹, nas amostras coletadas no silo industrial.

Silva (2003) também encontrou contagens altas de bactérias psicotróficas em amostras de leite cru coletadas em silos industriais de processadores de leite UAT dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goiás. Nessas amostras, as contagens de bactérias psicotróficas variaram entre $1,4 \times 10^6$ e $8,8 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹.

Cunha, Carvalho e Abreu (1996), trabalhando com leite cru tipo B refrigerado na região de Lavras, MG, encontraram resultados variando de $3,0 \times 10^2$ a $3,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹, nas contagens de psicotróficos.

Essas pesquisas evidenciam que grande parte do leite analisado apresentou contagem de unidades formadoras de colônia de bactérias psicotróficas superior ao estabelecido pela legislação em relação à contagem total de microrganismos. Na Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2011) é estabelecida a contagem padrão em placas (CPP) máxima de 3×10^5 UFC.mL⁻¹.

¹até 2016, para as regiões sul, sudeste e centro-oeste e para as regiões norte e nordeste, de 6×10^5 UFC.mL⁻¹.

Apesar da importância dos psicotróficos, o Ministério da Agricultura não estipula um padrão de qualidade e identidade do leite baseado na contagem de unidades formadoras de colônia destes microrganismos. A legislação que exigiu a qualidade do leite em relação às bactérias psicotróficas foi o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1997), a qual determina o controle da contaminação da microbiota psicotrófica de tal forma que sua contagem não exceda a 10% do número total de mesófilos aeróbios.

Contagens totais por si só podem ser um indicador de qualidade higiênica do leite cru, entretanto, a contagem de bactérias psicotróficas é um indicador complementar que pode contribuir para explicar os problemas sazonais no processamento do leite (CEMPÍRKOVÁ, 2002).

Por esse motivo, estes microrganismos ganharam especial importância em vários países, com a introdução da refrigeração do leite nas propriedades e a granelização do leite (SILVA, 2005).

Com base nos dados da literatura, parece imprudente a fabricação de produtos a partir do leite em que a contagem de psicotróficos tenha excedido a 10^6 UFC.mL⁻¹, pois, neste caso, é grande a possibilidade da presença de enzimas degradativas extracelulares (NÖRNBERG, 2009). Segundo Cromie (1992), quando o número de microrganismos psicotróficos atinge 10^7 UFC.mL⁻¹, começa a haver alterações no leite. Por outro lado, Ranis e Lewis (1995) afirmam que, mesmo em produtos finais que tenham uma contagem bacteriana dentro dos padrões legais, as transformações na qualidade dos mesmos podem ocorrer.

Para Thomas e Thomas (1973a), contagem de microrganismos psicotróficos menor que 10^4 UFC.mL⁻¹ pode ser considerada como padrão satisfatório para leite cru coletado de tanque refrigeradores. Contagens entre 10^4

e 10^5 UFC.mL⁻¹ indicam a necessidade de melhorias na higiene de ordenha ou na higienização dos equipamentos utilizados e, acima de 10^5 UFC.mL⁻¹, são um indício definitivo de condições insatisfatórias de produção ou refrigeração do leite na fazenda.

Em geral, os microrganismos psicotróficos presentes no leite e em derivados são oriundos do solo, da água e da vegetação, ou seja, resultam de contaminação secundária. Entretanto, a principal fonte de contaminação de leite e derivados com bactérias psicotróficas continua sendo os utensílios e os equipamentos, que não foram eficientemente higienizados, utilizados no manuseio de leite nas fazendas e nas usinas de beneficiamento (ALVIM, 1992).

Santana (2001) constatou que os principais pontos de contaminação por psicotróficos e microrganismos proteolíticos na cadeia de produção do leite das fazendas estudadas foram devido à má higienização dos tanques ou à presença de água residual e da sanitização inadequada dos tetos das vacas.

De acordo com os mesmos autores, a água contaminada ou não tratada pode ser fonte de uma grande variedade de microrganismos saprófitos originários do solo ou vegetação, como *Pseudomonas* spp., coliformes e outras bactérias gram-negativas.

Estes microrganismos podem ser bastonetes, cocos, víbrios, formadores ou não de esporos, gram-negativos ou positivos, aeróbios ou anaeróbios (SORHAUNG; STEPANIAK, 1997). Em países de clima temperado, a maioria dessas bactérias é de bastonetes gram-negativos, não esporulados, oxidase positivo (ARCURI, 2003; MUIR, 1996; SORHAUNG; STEPANIAK, 1997).

Entre as bactérias gram-negativas, destacam-se *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Chrombacterium* e *Microbacterium* (ENEROTH et al., 1998; SORHAUNG; STEPANIAK, 1997). Outros gêneros, como *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Aerobacter*, *Bacillus* e *Alcaligenes*, e o

grupo coliformes também é citado como de importantes psicrotóxicos no leite (COUSIN, 1982).

Existe um grupo de microrganismos denominados psicrotóxicos termodúricos que, além de se multiplicarem sob refrigeração, sobrevivem à pasteurização. Espécies mais frequentes deste grupo pertencem ao gênero *Bacillus*. Sua origem está relacionada a água, aos tetos/úberes, ao solo e aos equipamentos mal higienizados. Não só suas enzimas, mas o próprio microrganismo continua viável, em alguns casos, por toda a cadeia produtiva, desde a sua ordenha até o produto final.

Suhren (1989) afirma que, entre os organismos psicrotóxicos, o gênero mais frequentemente isolado do leite refrigerado é *Pseudomonas*. Desmaures e Gueguen (1997) realizaram, durante dois anos, monitoramento mensal da qualidade microbiológica do leite cru, obtido em boas condições higiênicas e armazenado em tanques de refrigeração de fazendas especializadas. Dentre as bactérias isoladas, o gênero mais comumente encontrado foi *Pseudomonas*. Pinto, Cardoso e Vanetti (2004) e Wiedmann et al. (2000) também relatam que este gênero foi o principal envolvido na produção de enzimas no leite cru da microbiota psicrotóxica existente.

As *Pseudomonas* são caracterizadas por serem bastonetes gram-negativos que apresentam motilidade, geralmente aeróbicos, não fermentadores, isto é, não utilizam carboidratos como fonte de energia ou utilizam outras vias metabólicas que não a fermentação (MUIR, 1996).

O gênero *Pseudomonas* inclui espécies que se caracterizam por apresentar alta diversidade genética (MARTINS et al., 2003) e mecanismos fisiológicos de adaptação e crescimento a baixas temperaturas (JAY, 2002), sendo as espécies *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putida* e *P. putrefaciens* as que têm papel relevante na diminuição da qualidade do leite fluido e dos demais derivados lácteos. No leite “in natura”, a *P. fluorescens* é predominante sobre as

demais espécies (DESMASURES; GUEGUEN, 1997; ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000).

Bramley e McKinnon (1990), Craven e Macauley (1992) e Garg (1990) observaram, em seus trabalhos com leite refrigerado, a presença de *Pseudomonas fluorescens*, sendo esta a espécie que mais produziu lipases e proteases.

Arcuri et al. (2008) analisaram amostras de leite coletadas de 20 tanques coletivos e 23 tanques individuais e verificaram que *Pseudomonas* foi o gênero mais isolado e *P. fluorescens* foi a espécie predominante. A maioria dos isolados bacterianos apresentou atividade proteolítica e/ou lipolítica a temperaturas de refrigeração de 4°C, 7°C e 10°C, evidenciando seu alto potencial de deterioração do leite e dos produtos lácteos. Os resultados ressaltam que maior atenção deve ser dada aos procedimentos que impeçam a contaminação do leite por esses microrganismos.

2.5.1 Microrganismos psicrotróficos: consequências na qualidade do leite e produtos lácteos

O grupo de bactérias psicrotróficas é extremamente importante em produtos que são conservados ou armazenados em condições de refrigeração por períodos relativamente longos. O problema torna-se ainda mais sério quando se considera o uso intensivo da refrigeração (SILVEIRA et al., 1998).

O crescimento de bactérias psicrotróficas à temperatura de refrigeração é caracterizado por uma fase de adaptação ou latência, chamada *fase lag*, em que a taxa de crescimento é insignificante. A duração desta fase varia muito em função da temperatura em que o leite é mantido, sendo mais longa em temperaturas mais baixas (FOSTER, 1965). Após esta fase há uma fase logarítmica também longa e lenta (ARCURI, 2003).

O controle do grupo de bactérias psicotróficas tem fundamental importância no prolongamento da vida útil do leite e seus derivados. Embora a pasteurização elimine a maioria dos microrganismos presentes no leite, salienta-se que, quando o leite é armazenado sob frio, os microrganismos psicotróficos, desenvolvem atividades metabólicas, como hidrólise de proteínas e gorduras (SANTANA, 2001). A degradação desses componentes do leite contribui para a redução de sua qualidade, especialmente nos caracteres organolépticos normais (sabor e odor).

Além disso, uma importante característica dos psicotróficos encontrados no leite e em produtos derivados é a sua capacidade de síntese de enzimas extracelulares. Ainda que, durante a pasteurização do leite, a grande maioria dos psicotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas termorresistentes produzidas por esses microrganismos (ADAMS; BARACH; SPECK, 1976; CROMIE, 1992; CUNHA; BRANDÃO, 2000; MUIR, 1996; SANTOS; FONSECA, 2003).

Adams et al. (1975 citados por MOURA et al., 1999), trabalhando com psicotróficos isolados de leite cru, relataram que estes produzem proteases resistentes a 149°C, por 10 segundos e que de 70% a 90% das amostras de leite cru analisadas apresentaram microrganismos psicotróficos capazes de produzir estas enzimas. A destruição de proteases bacterianas pode ser possível quando estas são submetidas à temperatura de 55 °C, durante 1 hora, antes do processo de pasteurização, podendo ocorrer uma reativação de 3% da atividade proteolítica (SHAH, 1994). Adams, Barach e Speck (1976) verificaram que, a 149 °C, a protease MC 60 (usada como modelo de protease) foi, aproximadamente, 400 vezes mais resistente ao calor que o esporo PA 3679 e 4.000 vezes mais resistente que o esporo de *B. stearothermophilus*, microrganismos indicadores do processo de esterilização do leite UAT. O tratamento a 149 °C, por 4 segundos, destruiu menos que 10% das proteases.

As enzimas de origem microbiana podem estar localizadas dentro das bactérias (intracelulares), associadas à parede celular (periplasmáticas) ou ser excretadas para o meio (extracelulares) (SANTOS, FONSECA, 2003). As enzimas intracelulares e aquelas associadas com a parede celular podem ser liberadas no leite quando ocorre a lise celular das bactérias, após o tratamento térmico e, dessa forma, em conjunto com as enzimas extracelulares, apresentar ação sobre os componentes do leite (KOHLMANN et al., 1991).

Dentre as enzimas extracelulares produzidas por muitas bactérias psicrotróficas, as proteases e as lipases são consideradas as mais importantes em relação à deterioração de leite e de produtos lácteos; em menor importância estão as fosfolipases e outras enzimas metabólicas (ARCURI, 2003).

A produção das lipases, proteases e fosfolipases por bactérias psicrotróficas geralmente apresenta seu valor máximo no final da fase exponencial ou na fase estacionária de multiplicação celular. A maioria das culturas lácteas atinge este estágio quando a população excede 10^7 UFC.mL⁻¹ (MUIR, 1990; STEAD, 1987). Por exemplo, *Pseudomonas* spp. produz estas enzimas à temperatura de refrigeração, na maioria das vezes, no fim da fase exponencial de crescimento celular, segundo Sorhaug e Stepaniak (1997).

Cousin (1982) relatou que as enzimas proteolíticas decorrentes de *Pseudomonas* spp. são sintetizadas a 4°C, mas a concentração é aumentada em temperaturas entre 20° C a 30°C.

A consequência da alta termoestabilidade das proteases e lipases elaboradas pelas bactérias psicrotróficas é que elas continuam agindo nos produtos elaborados, causando degradações do material proteico e lipídico, principalmente nos produtos leite UAT, queijo e manteiga, que ficam armazenados por longos períodos. As proteases promovem quebra das proteínas, promovendo, com isso, uma queda de rendimento na produção de queijos pelo

comprometimento da coagulação e alterações como sabor amargo (ORDÓÑEZ-PEREDA et al., 2005).

Portanto, essas enzimas têm grande importância na qualidade e na vida de prateleira de produtos lácteos, como queijos, leite longa vida e creme de leite (SWAISGOOD; BOSOGLU, 1984).

A velocidade das reações bioquímicas depende da temperatura de estocagem do leite. Os microrganismos psicotróficos evidenciam atividades bioquímicas, mesmo em temperaturas próximas a 0°C (COUSIN, 1982; THOMAS; THOMAS, 1973b).

De acordo com Gomes (1988), as proteases produzidas por bactérias psicotróficas, mesmo em concentrações ínfimas, podem hidrolisar as proteínas do leite. Não é necessária a presença de grandes populações de microrganismos psicotróficos para que haja a produção de quantidades significativas de proteases (COUSIN, 1982; KOHLMANN et al., 1991). Adams, Barach e Speck (1976) detectaram degradação da K-caseína antes de a população bacteriana atingir 10^4 UFC.mL⁻¹.

A contagem de bactérias psicotróficas e a temperatura de armazenamento influenciam a produção das proteases. Quantidades relativamente altas de proteases são produzidas à temperatura de refrigeração (4°C a 7°C). Alguns autores observaram que a estocagem do leite a 2°C inibe a produção de proteases por *Pseudomonas* spp. (COUSIN, 1982; SHAH, 1994).

Pinto (2004) estudou a atividade proteolítica e a estabilidade de amostras de leite inoculadas com 10^4 UFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas fluorescens*, durante 24 horas, a 2°C, 4°C, 7°C e 10°C. Constatou-se que, em temperaturas de 2°C e 4°C, ocorreu o controle do crescimento de *Pseudomonas fluorescens* com 24 horas de incubação. Após este tempo, a população dessa bactéria foi de, aproximadamente, 10^4 UFC.mL⁻¹ a 2°C; 10^5 UFC.mL⁻¹, a 4°C; 10^6 UFC.mL⁻¹, a 7°C

e de 10^7 UFC.mL⁻¹a 10°C. A maior proteólise ocorreu no início da fase estacionária de crescimento.

A κ -caseína é a mais susceptível ao ataque das proteases dos microrganismos, em especial por enzimas produzidas por *Pseudomonas* (COUSIN, 1982), enquanto a β -caseína e a α -caseína são menos susceptíveis. Essas enzimas agem sobre a caseína e de forma semelhante à quimosina, liberando o caseinomacropéptido (CMP), porém, apresentam menor especificidade (DATTA; DEETH, 2001).

As proteínas do soro, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina, são, geralmente, menos susceptíveis à sua ação (ARCURI, 2003; COUSIN, 1982; LAW, 1979). Assim, ocorre uma decomposição da caseína quantitativamente maior que das proteínas do soro.

A κ -caseína é importante para a estabilidade da micela e, assim, esta proteína, ao ser hidrolisada, provoca desestabilização da mesma, levando à coagulação do leite. Esta alteração bioquímica está associada com a gelatinização do leite longa vida (LAW; ANDREWS; SHARPE, 1977; MUIR, 1996).

A hidrólise de proteínas do leite pelas proteinases provenientes de psicrotóxicos determina a coagulação do leite, a alteração de sabor e a redução do rendimento no processamento de derivados (ADAMS; BARACH; SPECK, 1976; FAIRBAIR; LAW, 1986; ORDÓÑEZ-PEREDA et al., 2005; SILVEIRA, 1998), principalmente na fabricação de queijos, pouca consistência do coágulo formado durante fabricação dos mesmos (COUSIN, 1982; FAIRBAIRN; LAW, 1986; KOHLMANN et al., 1991; PRATA, 2001; THOMAS; THOMAS, 1973b).

Cousin (1982) sugere que os psicrotóxicos têm efeitos sobre o rendimento do queijo e que a redução do rendimento resulta tanto na degradação de lipídeos como de proteínas.

Hicks et al. (1982) concluíram que a redução no rendimento resultou tanto da degradação lipolítica como proteolítica do leite cru e estas corresponderam a 45% e a 55% da perda de matéria seca, respectivamente. Assim o rendimento de queijos também pode ser reduzido em função da atividade de enzimas lipolíticas sobre os triacilgliceróis com consequente liberação de ácidos graxos no soro e aumento das perdas de gordura (CROMIE, 1992; MOURA, 1997; STOFER; HICKS, 1983).

O aumento na acidez do leite contaminado por psicrotróficos durante a estocagem, segundo Hicks et al. (1982), levou à produção de queijos de acidez também elevada, o que também resulta em diminuição do rendimento de queijos.

A degradação proteolítica da caseína também pode causar maior retenção de água na massa de queijos fabricados com leite estocado sob refrigeração, com consequente aumento da umidade dos produtos, colocando-os, frequentemente, em desacordo com os limites legais (HICKS et al., 1986; MOURA, 1997; STOFER; HICKS, 1983; VASSILIADOU; ALICHANIDIS, 1984; YAN; LANGLOIS; O'LEARY, 1983).

O produto da hidrólise de frações de caseínas resulta no surgimento de peptídeos responsáveis pelo sabor amargo (FAIRBAIRN; LAW, 1986) e consequentes defeitos sensoriais (CELESTINO; IYER; ROGINSKI, 1996). A continuação da proteólise resulta em sabores e odores pútridos associados a produtos de degradação de baixo peso molecular, tais como amônia, aminas e sulfetos (ARCURI, 2003; COUSIN, 1982; KRAFT; REY, 1979).

Entretanto, é importante ressaltar que os defeitos de sabor e aroma em queijos são resultantes, principalmente, da ação de lipases e não das proteases, isto porque, segundo Fox (1989), as proteases são solúveis em água e são perdidas no soro, enquanto as lipases são adsorvidas pelos glóbulos de gordura, ficando retidas na massa do queijo.

As lipases presentes no leite podem ser de origem endógena, cuja temperatura ótima é de 37°C e pH 8, sendo esta termoestável e de origem microbiana, cuja atuação ótima é em pH alcalino e temperaturas entre 40 e 50°C. Os gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter* e *Serratia* produzem enzimas lipolíticas termorresistentes, das quais *P. fragi* e *P. fluorescens* são as principais produtoras (SHAH, 1994).

As lipases produzidas por *Pseudomonas* têm massa molecular de 30 kDa a 50 kDa, com pH ótimo de atividade entre 7,0 e 9,0 (CHEN; DANIEL; 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 psicotróficos são, frequentemente, 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 (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003).

Outra enzima produzida por alguns psicotróficos, como *Bacillus cereus* e algumas espécies *Pseudomonas*, é a fosfolipase C, que é importante na deterioração do leite (COUSIN, 1982; MUIR, 1990). Esta enzima degrada a membrana dos glóbulos de gordura, facilitando a ação das lipases sobre os triacilglicerídeos do leite (COUSIN, 1982; GARG, 1990; SHAH, 1994).

Derivados lácteos, como cremes, queijos e manteigas, são os principais alvos da ação das lipases, as quais são capazes de provocar o fenômeno da rancidez na manteiga em dois dias (COUSIN, 1982; LAW, 1979).

Embora o leite já contenha ácidos graxos livres, resultantes de uma síntese incompleta na glândula mamária, o grande número deles é proveniente da hidrólise dos triacilgliceróis por lipases. Esta hidrólise provoca o aumento da

fração de ácidos graxos de cadeia curta (C-4 a C-8), conferindo aos produtos lácteos sabor e odor de ranço. Ácidos graxos de peso molecular maior (C-10 a C-12) produzem sabor e odor de sabão. Ácidos graxos insaturados liberados durante a lipólise podem ser oxidados a cetonas e a aldeídos, produzindo sabor oxidado ou metálico (ARCURI, 2003; GOMES, 1988; MOURA, 1999; ORDÓÑEZ-PEREDA et al., 2005).

Sabores indesejáveis, como ranço, amargo, sujo, sabão, metálico, oxidado ou adstringente, atribuídos à atividade lipolítica de psicrotróficos, podem tornar o leite e os produtos derivados inaceitáveis para o consumidor (CHAMPAGNE et al., 1994; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003; COUSIN, 1982).

3 CONCLUSÃO GERAL

O leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas apresenta alterações na sua qualidade, quando é armazenado por 24, 48 e 72 horas, nas temperaturas de 4°C, 7°C e 10 °C. Maiores alterações são observadas no leite inoculado com maior contagem de bactérias psicotróficas, quando é armazenado em temperaturas mais elevadas e em maior tempo de estocagem, condições que favorecem a obtenção de um leite com contagem de bactérias mais elevada.

Quanto menor o tempo de estocagem, menor temperatura e contaminação inicial, menor é o aumento da contagem de bactérias psicotróficas, atividade lipolítica e proteolítica, e menores alterações em relação à gordura e à proteína do leite, sendo, assim, necessário o controle de tais variáveis durante o armazenamento.

As alterações verificadas na qualidade do leite influenciam substancialmente a composição e o rendimento do queijo prato. Ocorrem alteração durante a produção dos queijos devido à alteração no tempo de coagulação do leite, alteração das características físico-químicas e queda significativa do rendimento.

Além disso, com o armazenamento do leite sob refrigeração e com a inoculação de bactérias psicotróficas, ocorrem alterações nas características do queijo prato durante a maturação, diferente das alterações ocorridas no queijo produzido com leite recém-ordenhado.

Essas alterações são devido à qualidade do leite após armazenamento, principalmente pela ação enzimática e pela baixa temperatura, resultando em queijos mais úmidos, com menor teor de proteína e gordura. Estes queijos, durante a maturação, apresentam maiores índices proteolíticos devido à umidade, ao maior teor de ácidos graxos livres pela ação das enzimas lipolíticas,

ao aumento do pH devido à proteólise e à alteração na cor. Essas alterações podem influenciar de forma negativa a aceitação dos queijos prato pelo consumidor, uma vez que foram obtidos queijos com características diferentes das do queijo prato produzido com leite recém-ordenhado. Portanto, faz-se necessário verificar a aceitação destes queijos para constatar como o armazenamento e a contagem de bactérias psicrotólicas do leite podem influenciar.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 59, n. 5, p. 823-827, May 1976.
- ALVIM, T. C. **Efeito da qualidade do leite na detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alto desempenho: filtração gélida (GF-HPLC)**. 1992. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1992.
- AMORIM, H. E. **Influência do tempo de estocagem de leite cru refrigerado sobre a presença de CMP (Caseinomacropéptido)**. 2007. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.
- ANTUNES, V. C. et al. Contagem total de microrganismos mesófilos e de psicotróficos no leite cru e pasteurizado, transportado via latão ou granelizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 198-201, 2002.
- ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. (Ed.). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Templo, 2003. p. 105-115.
- ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, nov. 2008.
- AUGUSTO, M. M. M. **Influência do tipo de coagulante e do aquecimento no cozimento da massa na composição, rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo prato**. 2003. 190 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BARBOSA, J. B. et al. Avaliação de rendimento da produção dos queijos Minas Frescal, Minas Padrão e Mussarela fabricados com leite inoculado com *Pseudomonas fluorescens*. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v. 64, n. 371, p. 27-34, 2009.

BOOR, K. J. et al. Microbiological and chemical quality of raw milk in New York State. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 6, p. 1743-1748, June 1998.

BRAMLEY, A. J.; MCKINNON, C. H. Dairy microbiology: the microbiology of milk. In: _____. **The microbiology of raw milk**. 2nd ed. London: Elsevier Science, 1990. p. 163-207.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de maio 1952, alterado pela ultima vez pelo Decreto nº 2.244 de 4 de junho de 1997. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 5 jun. 1997. Seção 1, p. 11555.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 50.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 358, de 4 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 4 set. 1997. Seção 1, p. 19690.

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**, Brasília, n. 172, p. 8-13, 20 set. 2002. Seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6-11.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicotrófica no rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 2006. 57 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Werribee, v. 51, n. 2, p. 59-63, 1996.

CEMPÍRKOVÁ, R. Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. **Veterinary Medicine Czech**, Praha, v. 47, n. 8, p. 227-233, 2002.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 34, n. 1, p. 1-30, Sept. 1994.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n. 1, p. 157-160, 1981.

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

CRAVEN, H. M.; MACAULEY, B. J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage: III., effects of milk processor. **Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 47, n. 1, p. 50-55, Jan. 1993.

CROMIE, R. Psychrotrophics and their enzyme residues in cheese milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 47, n. 2, p. 96-100, 1992.

CUNHA, L. T.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Determinação das condições físico químicas e microbiológicas de leite B cru refrigerado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15., 1996, Poços de Caldas. **Resumos...** Lavras: UFLA, 1996. p. 73.

CUNHA, M. F.; BRANDÃO, S. C. C. A coleta a granel pode aumentar os riscos com as bactérias psicrotóxicas. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, p. 71-73, jul./ago. 2000.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk: a review. **Food and Bioproducts Processing**, Davis, v. 79, n. 4, p. 197-210, 2001.

DEMASURE, N.; GUEGUEN, M. Monitoring the microbiology of high quality Milk by monthly sampling over 2 years. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, n. 2, p. 271-280, May 1997.

EMMONS, D. B. Definition and expression of cheese yield. In: _____. **Factors affecting the yield of cheese**. Brussels: IDF, 1993. p. 12-25. (Bulletin of the International Dairy Special Issue, 9301).

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Dairy Journal**, Barking, v. 10, n. 5/6, p. 325-331, 2000.

ENEROTH, A. et al. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 9, p. 829-834, Sept. 1998.

FAGUNDES, M. C. et al. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 568-572, mar./abr. 2006.

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

FARKYE, N. Contribution of milk: clotting enzymes and plasmin to cheese ripening. In: MALIN, E. M.; TUNICK, M. H. (Ed.). **Chemistry of structure: function relationships in cheese**. New York: Plenum, 1995. p. 195-207.

FERNÁNDEZ, M.; FOX, P. F. Fractionation of low molecular mass peptides in cheese. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 55, n. 1, p. 25-28, 1998.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. Franca: Lemos, 2000. 175 p.

FOSTER, E. M. **Microbiología de la leche**. México: Herrero, 1965. 178 p.

FOX, P. F. Developments in the biochemistry of cheese ripening. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 25., 1998, Aarhus. **Proceedings...** Aarhus: Dairy Science and Technology, 1998. p. 11-38.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 6, p. 1379-1400, 1989.

FOX, P. F. et al. Biochemistry of cheese ripening. In: _____. **Cheese: chemistry physics and microbiology**. London: Elsevier, 1993. v. 1, p. 389-438.

FOX, P. F. et al. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 39, p. 163-328, 1996.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 2000. 587 p.

FOX, P. F.; LUCEY, J. A.; COGAN, T. M. Glycolysis and related reactions during manufacture and ripening. **Critical Reviews in Food in Science and Nutrition**, Cleveland, v. 29, n. 4, p. 237-253, 1990.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Proteolysis in cheese during ripening. **Food Reviews International**, Madison, v. 12, n. 4, p. 457-509, 1996.

FRANK, J. F. Milk and dairy products. In: DOYLE, P.; BEUCHAT, R.; MONTVILLE, J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: [s.n.], 1997. p. 101-116.

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

FURTADO, M. M.; AMORIM, A. C. B. Os pioneiros laticinistas dinamarqueses e a história do queijo Prato. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 4, n. 25, p. 18-22, 2000.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

GARG, S. K. Psychrotrophs in milk: review. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v. 43, n. 3, p. 433-440, 1990.

GOMES, M. I. F. V. **Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana**. 1988. 85 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1988.

HENRIQUE, V. S. M. **Comportamento da fase aquosa e efeito do pH sobre a proteólise e propriedades funcionais do queijo prato**. 2005. 133 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

HICKS, C. L. et al. Effect of milk quality and low temperature storage on cheese yield: a summation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 69, n. 3, p. 649-657, 1986.

HICKS, C. L. et al. Psychrotrophic bacteria reduce cheese yield. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, n. 4, p. 331-334, 1982.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos: 1.**, técnicas de análisis microbiológico. Zaragoza: Acribia, 1994. 804 p.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 2002. 262 p.

KOHLMANN, K. L. et al. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3275-3283, Oct. 1991.

KRAFT, A. A.; REY, C. R. Psychrotrophic bacteria in foods: an update. **Food Technology**, Chicago, v. 33, n. 1, p. 66-71, 1979.

KUMARESAN, G.; ANNALVILLI, R.; SIVAKUMAR, K. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. **Journal of Applied Sciences Research**, Madison, v. 3, n. 11, p. 1383-1387, 2007.

LAU, K. Y.; BARBANO, D. M.; RASMUNSEN, R. R. Influence of pasteurization on fat and nitrogen recoveries and cheddar cheese yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 3, p. 561-570, 1990.

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

LAW, B. A.; ANDREWS, A. T.; SHARPE, A. E. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw Milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 44, n. 1, p. 145-148, Jan. 1977.

LAWRENCE, R. C.; CREAMER, L. K.; GILLES, J. Symposium: cheese ripening technology. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n. 8, p. 1748-1760, 1987.

LAWRENCE, R. C. et al. Cheese yield potential of milk. In: _____. **Factors affecting the yield of cheese**. Brussels: International Dairy Federation, 1993. p. 109-120.

MARTINS, M. C. Competitividade da cadeia produtiva do leite no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v. 3, n. 3, p. 38-51, jul./set. 2004.

MARTINS, M. L. et al. Detecção de proteases bacterianas em leite por métodos imunológicos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 61, jul./ago. 2004.

MARTINS, M. L. et al. Diversidade genética de bactérias psicrotróficas proteolíticas isoladas de leite cru granelizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, n. 333, p. 54-60, jul./ago. 2003.

MCSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 2/3, p. 127-144, 2004.

MINUSSI, R. C.; FURTADO, M. M.; MOSQUIM, M. A. C. V. Avaliação de métodos para aceleração da maturação do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 291, p. 31-42, 1995.

MORENO, I. et al. Propriedades físicas e composição química e bioquímica durante a maturação de queijo Prato de diferentes origens. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 270-273, 2002.

MORITA, R. Y. Psychrophilic bacteria. **Bacteriological Reviews**, Washington, v. 39, n. 2, p. 145-167, 1975.

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

MOURA, C. J. et al. Lipólise e avaliação sensorial em queijo tipo parmesão fabricado com leite resfriado e inoculado com pseudomonas fluorescens. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 308, p. 3-8, 1999.

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

NÖRNBERG, M. de F. B. L. **Atividade proteolítica, aderência e produção de biofilmes por microrganismos psicrotróficos em leite bovino**. 2009. 89 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ORDÓÑEZ-PEREDA, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 2, 279 p.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PHELAN, J. A. Standardisation of milk for cheesemaking at factory level. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 34, n. 4, p. 152-156, 1981.

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

PINTO, C. L. O.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Bactérias psicotróficas proteolíticas e potencial determinador a temperaturas de refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 110-117, jul./ago. 2004.

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

PRATA, L. F. **Fundamentos de ciência do leite**. São Paulo: UNESP; FUNEP, 2001. 287 p.

RANIS, S.; LEWIS, M. J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 20, n. 3, p. 517-524, 1995.

SANTANA, E. H. W. **Contaminação do leite por microrganismos aeróbios mesófilos, psicotróficos e psicotróficos proteolíticos em diferentes pontos do processo de produção leiteira**. 2001. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2001.

SANTOS, D.; BERGMANN, G. P. Influência da temperatura durante o transporte sobre a qualidade microbiológica do leite cru: III., psicotróficos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 110, p. 86-91, jul. 2003.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. da. Bactérias psicotróficas e a qualidade do leite. **Revista CBQL**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 12-15, 2002.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. da. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2003.

SANTOS, M. V.; LARANJA, F. L. F. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, mar. 2001.

SHAH, N. P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 49, n. 8, p. 432-437, July 1994.

SILVA, A. T. **Maturação do queijo tipo prato**: influência da adição de enzimas proteolíticas no processo. 1998. 119 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

SILVA, M. H. **Efeito do resfriamento e estocagem sobre alguns grupos de microrganismos e propriedades físico-químicas do leite**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 104 p.

SILVA, P. D. L. da. **Avaliação, identificação e atividade enzimática de bactérias psicotróficas presentes no leite cru refrigerado**. 2005. 119 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT**: fatores determinantes para sedimentação e geleificação. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SILVEIRA, I. A. et al. Influência de microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado: uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 21-27, 1998.

SLYKE, L. L. van; PRICE, W. V. **Cheese**. Ohio: Riggeview, 1979. 67 p.

SOARES, P. V. **Estimativa rápida da carga de microrganismos psicrotróficos em leite cru refrigerado**. 2004. 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SORHAUNG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 8, p. 35-41, Feb. 1997.

SØRHOUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 35-41, Feb. 1997.

SOUZA, M. J.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4/7, p. 327-345, July 2001.

STEAD, D. Production of extracellular lipases and proteinases during prolonged growth of strains of psychrotrophic bacteria in whole milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 54, n. 4, p. 535-543, 1987.

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

SUHREN, G. Producer microorganisms. In: MCKELLER, R. G. (Ed.). **Enzymes of psychrotrophs in raw food**. Ranton: CRC, 1989. p. 3-34.

SWAISGOOD, H. E.; BOSOGLU, F. Heat inactivation of the extracellular lipase from *Pseudomonas fluorescens* MC 50. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 32, n. 1, p. 7-10, Jan. 1984.

THOMAS, S. B.; THOMAS, B. F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk: part 1. **Dairy Industries**, Gravesend, v. 38, n. 1, p. 11-15, 1973a.

THOMAS, S. B.; THOMAS, B. F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk: part 2. **Dairy Industries**, Gravesend, v. 38, n. 2, p. 61-70, 1973b.

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

VIANNA, P. C. B. **Efeito da contagem de células somáticas do leite sobre a microbiota de maturação e características sensoriais do queijo prato**. 2006. 71 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 329-350, 1993.

WALSTRA, P.; NOOMEN, A.; GEURTS, T. J. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 2nd ed. Maryland: Aspen, 1999. 82 p.

WIEDMANN, M. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 5, p. 2085-2095, Nov. 2000.

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

CAPÍTULO 2

EFEITO DO ARMAZENAMENTO DO LEITE E DA CONTAGEM DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS NA QUALIDADE DO LEITE

RESUMO

O armazenamento do leite sob refrigeração e o conseqüente crescimento das bactérias psicrotróficas e a atuação de suas enzimas podem provocar alterações nas características do leite. Devido a este fato, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do armazenamento e da contagem de bactérias psicrotróficas na qualidade do leite, a fim de obter dados para verificar até que ponto estas variáveis influenciam as características do leite utilizado para produção de derivados. Para tanto, foram realizadas inoculações no leite com baixa e alta contagem de bactérias psicrotróficas, o qual foi armazenado nas temperaturas de 4°C, 7°C e 10°C, por 24, 48 e 72 horas. O leite foi analisado em cada intervalo de tempo nas respectivas temperaturas. Foi verificado um aumento da contagem das bactérias psicrotróficas com o aumento do tempo e da temperatura, sendo mais expressivo quando o leite foi inoculado com alta contagem de bactérias psicrotróficas. Em relação à qualidade, foi verificado que, após o armazenamento, não houve alteração dos valores encontrados para o leite cru e para o leite armazenado, em relação à densidade relativa a 15°C, gordura, proteína total, índice crioscópico, extrato seco desengordurado e estabilidade. Entretanto, o leite armazenado a 10°C apresentou ligeira elevação da acidez. As alterações na qualidade deram-se em relação à hidrólise da proteína com o aumento de proteínas solúveis e hidrólise da gordura com um aumento da quantidade de ácidos graxos livres. Essas alterações foram acompanhadas pelo aumento da atividade proteolítica e lipolítica no leite. O aumento da atividade das enzimas proteolíticas foi influenciado pelo aumento da contagem de bactérias psicrotróficas. Assim, a contagem inicial de bactérias psicrotróficas, o tempo e a temperatura de armazenamento do leite influenciam de forma direta a qualidade final do leite, sendo necessário, então, o controle dessas variáveis.

Palavras-chave: Refrigeração do leite. Qualidade. Proteólise. Lipólise.

ABSTRACT

Milk storage under refrigeration and the consequent growth of psychrotrophic bacteria and the acting of their enzymes can bring about alterations in the characteristics of milk, mainly during ripening. Due to this fact, this work was conducted with the objective of evaluating the effect of storage and of the count of psychrotrophic bacteria upon milk quality in order to obtain data to verify to what extent these variables influence the characteristics of the milk utilized for production of dairy products. For this purpose, inoculations in the milk with high and low counts of psychrotrophic bacteria were conducted, this milk was stored at the temperatures of 4°C, 7°C and 10°C, for 24, 48 and 72 hours. The milk was analyzed at each time interval at the respective temperatures. An increase of the count of the psychrotrophic bacteria with increasing time and temperature was found, its being more expressive when the milk was inoculated with a high count of psychrotrophic bacteria. In relation to the quality, it was found that, after storage, there was no alteration of the values found for the raw milk and for the stored milk in relation to the relative density at 15°C, fat, total protein, cryoscopic index, nonfat dry extract and stability. However, the milk stored at 10°C presented a slight rise of acidity. The alterations in the quality took place in relation to protein hydrolysis with increasing soluble proteins and fat hydrolysis with increased amount of free fatty acids. Those alterations were accompanied by the increase of the proteolytic and lipolytic activity in milk. The increase of the activity of proteolytic activities was influenced by the increase of the count of psychrotrophic bacteria. So, the initial count of psychrotrophic bacteria, the storage time and temperature of milk influence in a direct way the final quality of milk, then, the control of these variables being necessary.

Keywords: Milk refrigeration. Quality. Proteolysis. Lipolysis.

1 INTRODUÇÃO

A refrigeração do leite cru é uma prática adotada em diversos países e que visa manter sua qualidade, devido ao controle do crescimento de bactérias, principalmente da multiplicação de bactérias mesófilas, que estão relacionadas com a acidificação do leite (BOOR et al., 1998; FAGUNDES et al., 2006; PRATA, 2001). Esse controle traz várias vantagens, tanto para a indústria como para o produtor, uma vez que a qualidade do leite pode ser mantida por mais tempo, devido à baixa temperatura, não ocorrendo devolução para o produtor devido à alta acidez.

Embora promova uma queda na taxa de multiplicação bacteriana, principalmente dos microrganismos mesófilos, a redução da temperatura de estocagem e de transporte do leite é seletiva para as bactérias psicotróficas que, em períodos prolongados em temperaturas iguais ou menores que 7°C, passam de inexpressivos a dominantes, apresentando um considerável potencial deteriorativo, capaz de promover mudanças sensoriais indesejáveis (PRATA, 2001; SANTOS; FONSECA, 2003b).

Uma importante característica dos psicotróficos encontrados no leite e em produtos derivados é a sua capacidade de síntese de enzimas extracelulares. Ainda que, durante a pasteurização do leite, a grande maioria dos psicotróficos seja destruída, este tratamento térmico tem pouco efeito sobre a atividade das enzimas termorresistentes produzidas por estes microrganismos (CUNHA; BRANDÃO, 2000; MUIR, 1996; SANTOS; FONSECA, 2003a).

Apesar da importância dos psicotróficos na qualidade do leite, não é estipulado, pela legislação brasileira, um padrão de qualidade e identidade do leite, baseado na contagem de unidades formadoras de colônia desses microrganismos. Contagens totais, por si só, podem ser um indicador de qualidade higiênica do leite cru, entretanto, a contagem de bactérias

psicrotróficas é um indicador complementar que pode contribuir para explicar os problemas sazonais no processamento do leite (CEMPÍRKOVÁ, 2002).

Nesse contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do armazenamento e da contagem de bactérias psicrotróficas na qualidade do leite, a fim de obter dados para verificar como estas variáveis influenciam as características do leite utilizado para a produção de derivados.

2 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi desenvolvido nas instalações da planta piloto no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Leite e Produtos Lácteos do Setor de Laticínios e no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, localizados no Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

2.1 Tratamentos e preparo do leite

Em três ocasiões diferentes, compondo, assim, três repetições do experimento como as outras etapas subsequentes, foi coletado leite recém-ordenhado, o qual foi submetido ao processo de termização, a $65^{\circ}\text{C}.15\text{s}^{-1}$, em um trocador de calor em placas, com o objetivo de destruir as bactérias psicotróficas presentes. Após o processo de termização do leite, realizou-se teste fosfatase e peroxidase, para verificar se o perfil enzimático do leite termizado correspondia ao do leite cru, segundo técnicas descritas por Brasil (2006). Todos os leites apresentaram atividade da fosfatase e peroxidase positiva.

Posteriormente, o leite foi inoculado com $2,78 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ e $5,78 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ de *Pseudomonas fluorescens*, devido à importância da contagem inicial de bactérias psicotróficas no leite e das diferentes contagens já encontradas no leite em trabalhos anteriores (ARCURI et al., 2008; CUNHA; CARVALHO; ABREU, 1996; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; SILVA, 2003). No presente estudo, o leite inoculado com $2,78 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ foi considerado o leite com baixa contagem inicial de psicotróficos e o leite inoculado com $5,78 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ foi considerado com alta contagem inicial de psicotróficos.

A cultura de *Pseudomonas fluorescens* NCTC 10038, utilizada para inoculação, foi adquirida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, na forma liofilizada. Foi realizada a reidratação do liofilizado em caldo nutritivo e incubação por 48 horas, à temperatura de 28°C, sendo repicada a cada 48 horas, para manutenção de sua atividade, segundo recomendação de Gobetti e Rossi (1992). A determinação da concentração de células de *Pseudomonas fluorescens* presentes no caldo nutritivo foi feita por contagem em placas, utilizando, como meio de cultura, o ágar padrão (PCA) incubado por 48 horas à temperatura de 28°C (GOBETTI; ROSSI, 1992), para posterior inoculação.

O leite inoculado com duas contagens de bactérias psicrotólicas foi dividido em volumes iguais e armazenado em recipientes plásticos previamente esterilizados, em diferentes temperaturas (4°C, 7°C e 10°C) e tempos (0, 24, 48 e 72 horas).

As temperaturas de armazenamento foram determinadas devido ao fato de a Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2011) estabelecer que a temperatura máxima de conservação o leite cru refrigerado é de 7°C, na propriedade rural/tanque comunitário e 10°C, no estabelecimento processador. Em se tratando de tanque de refrigeração por expansão direta, deve ser dimensionado de modo que permita refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 4°C, no tempo máximo de 3 horas, após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade e, em se tratando de tanque de refrigeração por imersão, ser dimensionado de modo que permita refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 7°C, no tempo máximo de três horas após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade.

Os tempos de armazenamento foram determinados, uma vez que a Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2011) estabelece que o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e o seu recebimento no estabelecimento que vai

beneficiá-lo (pasteurização, esterilização, etc.) deve ser, no máximo, de 48 horas, recomendando-se como ideal um período de tempo não superior a 24 horas. Entretanto, na indústria beneficiadora, ele pode ser armazenado por período superior a 48 horas.

2.2 Análises do leite

As amostras de leite foram coletadas em frascos previamente esterilizados e imediatamente submetidos às análises microbiológicas, enzimáticas e físico-químicas.

2.2.1 Análises microbiológicas

Foram realizadas análises microbiológicas para a contagem de bactérias mesofílicas viáveis, após a incubação, a 32°C, por 48 horas e para a contagem de bactérias psicrotróficas, após incubação a 7°C por 10 dias (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992) do leite recém-ordenhado, para verificar a qualidade microbiológica do mesmo.

O leite termizado foi submetido à análise de contagem de bactérias psicrotróficas para verificar a eficiência da destruição desses microrganismos, segundo a mesma metodologia.

Para acompanhamento do crescimento das bactérias psicrotróficas no leite armazenado sob diferentes tempos e temperaturas, foi realizada análise de contagem de bactérias psicrotróficas, segundo a mesma metodologia.

2.2.2 Análises físico-químicas

Com o objetivo de verificar possíveis alterações durante o armazenamento, foram realizadas as seguintes análises do leite recém-ordenhado e do leite inoculado com bactérias psicrotróficas armazenado em diferentes temperaturas (4°C, 7°C e 10°C) e tempos (0, 24, 48 e 72 horas): análise de gordura pelo método butirométrico de Gerber, densidade a 15°C, acidez titulável, extrato seco total, extrato seco desengordurado (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 2005), teste de estabilidade a 72% v/v, índice crioscópico (BRASIL, 2006), determinação dos ácidos graxos livres (WOLFSCHOON-POMBO; CARVALHO; FISCHER, 1986), nitrogênio total do leite pelo método de micro Kjeldahl (AOAC, 2005), nitrogênio solúvel em tampão de acetato a pH 4,6 e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12% (v/v), de acordo com Bynum e Barbano (1985), seguido por Micro Kjeldahl conforme (AOAC, 2005). O fator utilizado para conversão dos teores de nitrogênio para proteína foi de 6,38.

2.2.3 Análises enzimáticas

O leite recém-ordenhado e o leite inoculado com bactérias psicrotróficas armazenado em diferentes temperaturas (4°C, 7°C e 10°C) e tempos (24, 48 e 72 horas) foi submetido às análises de atividade proteolítica, pela técnica descrita por Bendicho et al. (2002), com modificações segundo Cardoso (2006) e atividade lipolítica pelo método descrito por Rajmohan, Dodd e Waites (2002), com modificações segundo Cardoso (2006).

2.3 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O delineamento experimental utilizado neste experimento foi um fatorial 2x3x4 inteiramente casualizado, sendo duas contagens de bactérias psicotróficas na inoculação do leite, três temperaturas de armazenamento do leite (4°C, 7°C e 10°C) e quatro tempos de armazenamento (0, 24, 48 e 72horas), com três repetições (três coletas e inoculações).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando-se um nível de significância de $p>0,05$. O teste de Scott-Knott foi utilizado para verificar quais tratamentos diferiam entre si, quando a ANOVA indicou existir diferença significativa.

Para verificar se existe correlação linear entre contagem de bactérias psicotróficas, atividade enzimática, concentração de ácidos graxos e proteína solúvel, foi realizada uma análise de correlação linear de Pearson, considerando-se um nível de significância $p>0,05$.

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição físico-química

A composição físico-química média do leite recém-ordenhado pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 Valores médios de composição físico-química do leite cru, antes do armazenamento

Parâmetros	
Densidade relativa a 15°C	1,031 g.mL ⁻¹
Acidez	0,14 g de ácido láctico.100mL ⁻¹
Gordura	3,16g.100g ⁻¹
Extrato seco total	11,85 g.100g ⁻¹
Extrato seco desengordurado	8,69 g.100g ⁻¹
Estabilidade ao alizarol 72 % (v/v)	Estável
Proteína total	3,41 g.100g ⁻¹
Índice crioscópico	540°H

Os resultados de densidade relativa a 15°C, acidez, gordura, proteína total, índice crioscópico e extrato seco desengordurado estão em conformidade com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado (BRASIL, 2011). O leite apresentou-se estável ao alizarol 72% (v/v).

Foi verificado que, após armazenamento, não houve alteração dos valores encontrados para o leite cru e para o leite armazenado, em todos os tratamentos, em relação à densidade relativa a 15°C, gordura, proteína total, índice crioscópico e extrato seco desengordurado, estabilidade. Entretanto, o leite armazenado a 10°C apresentou elevação da acidez de 0,14g de ácido láctico. 100mL⁻¹ de leite de ácido láctico para 0,16g de ácido láctico.100mL⁻¹ de

leite. Mesmo assim, o leite ainda está de acordo com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o qual exige que a acidez do leite deve estar entre 0,14 e 0,18g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite (BRASIL, 2011).

Esse aumento da acidez durante o armazenamento sob resfriamento também foi reportado por Sanvido (2007). Ao armazenar o leite a 5°C por quatro dias, este autor verificou um aumento da acidez de 0,156g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite para 0,16g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite.

3.2 Microbiologia

O leite recém-ordenhado apresentou contagem de mesófilos de 3,5 log UFC.mL⁻¹ e de psicrotrófico de 0,6 log UFC.mL⁻¹. Após a termização, a contagem de mesófilos foi de 2,9 log UFC.mL⁻¹ e a de psicrotrófico, de 0 log UFC.mL⁻¹, o que indica a eficiência do processo de termização no controle da contagem de bactérias psicrotróficas.

Na Tabela 2 pode ser observada a contagem de bactérias psicrotróficas do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotróficas, após armazenamento a 4°C, 7°C e 10°C, por 0, 24, 48 e 72 horas.

Tabela 2 Contagem média de bactérias psicrotróficas (log UFC.mL⁻¹) no leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicrotróficos			
Tempo de armazenamento	Temperatura de armazenamento		
(horas)	4°C	7°C	10°C
0	2,78 ^{aA}	2,78 ^{aA}	2,78 ^{aA}
24	2,79 ^{bA}	2,98 ^{bB}	3,29 ^{bC}
48	2,84 ^{cA}	3,34 ^{cB}	3,37 ^{cC}
72	2,99 ^{dA}	3,46 ^{dB}	4,59 ^{dC}
Leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos			
Tempo de armazenamento	Temperatura de armazenamento		
(horas)	4°C	7°C	10°C
0	5,78 ^{aA}	5,78 ^{aA}	5,78 ^{aA}
24	6,04 ^{bA}	6,31 ^{bB}	6,34 ^{bC}
48	6,61 ^{cA}	6,84 ^{cA}	7,44 ^{cB}
72	6,87 ^{dA}	6,99 ^{dB}	8,78 ^{dC}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$), do leite inoculado com 2,78 log UFC.mL⁻¹ e 5,78 log UFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas fluorescens*

Como pode ser observado na Tabela 2, o leite inoculado com baixa contagem (2,78 log UFC.mL⁻¹) apresentou contagem de psicrotróficos, no final do tempo de armazenamento, de 2,99 log UFC.mL⁻¹, 3,46 log UFC.mL⁻¹ e 4,49 log UFC.mL⁻¹, nas temperaturas de armazenamento de 4°C, 7°C e 10°C, respectivamente. O leite inoculado com alta contagem de bactérias psicrotróficas (5,78 log UFC.mL⁻¹), ao final do armazenamento de 72 horas, apresentou contagem de bactérias psicrotróficas de 6,87 log UFC.mL⁻¹, 6,99 log UFC.mL⁻¹ e 8,78 log UFC.mL⁻¹ nas temperaturas de armazenamento de 4°C, 7°C e 10°C, respectivamente.

Após armazenamento, algumas amostras apresentaram contagem de bactérias psicrotróficas, de acordo Cousin (1982), que verificou, em seu estudo, que a contagem de bactérias gram-negativas em leite estocado sob refrigeração pode atingir valores de 10³ a 10⁶ UFC.mL⁻¹ (3 a 6 log UFC.mL⁻¹), antes do processamento, como foi verificado no presente estudo quando, após 72 horas, o

leite inoculado com baixa contagem foi armazenado a 7°C e a 10°C. Por outro lado, o leite inoculado com altas contagens superou os valores descritos pelo autor, isso devido à contagem inicial elevada de bactérias psicrotróficas.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) da contagem de bactérias psicrotróficas entre os tempos de armazenamento (0, 24, 48 e 72 horas), tanto do leite inoculado com baixa contagem de psicrotróficos quanto no leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos, independentemente da temperatura, tendo a contagem de microrganismos psicrotróficos sido crescente na medida em que se aumentava o tempo de estocagem (Gráfico 1).

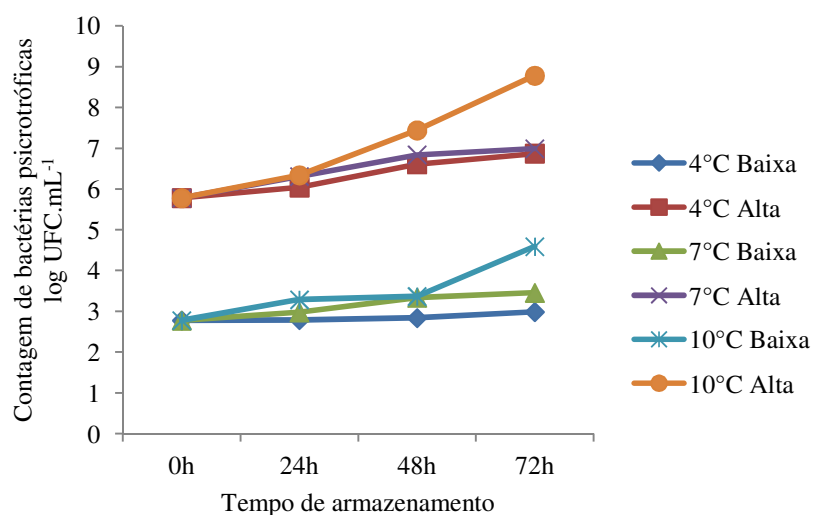


Gráfico 1 Crescimento de bactérias psicrotróficas durante a estocagem, em diferentes tempos e temperaturas, do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotróficas

Comparando-se a contagem de psicrotróficos no mesmo tempo e em diferentes temperaturas, pode-se observar que ela influenciou de forma significativa ($p < 0,05$). O leite armazenado a 4°C apresentou contagem de microrganismos psicrotróficos menor ($p < 0,05$) do que o leite armazenado a 7°C

e a 10°C, após o armazenamento por 24, 48 e 72 horas, independente da contagem inicial de psicotróficos, ou seja, ocorreu influência da temperatura no crescimento das bactérias.

Resultados semelhantes foram encontrados por Izidoro et al. (2013) e Santos et al. (2013). Ao armazenarem o leite em diferentes tempos e temperaturas, estes autores verificaram que, independentemente do momento, as contagens foram mais altas, na medida em que se elevou a temperatura de incubação do leite. Pinto (2004) também observou o aumento da população de *P. fluorescens* com o aumento da temperatura de incubação.

Haryani et al. (2003) observaram que a temperatura de refrigeração influenciou o crescimento de bactérias psicotróficas contaminantes naturais em amostras de leite provenientes de duas fontes de produção diferentes. O tempo para que a população de psicotróficos atingisse 10^7 UFC mL⁻¹ ($7 \log \cdot \text{mL}^{-1}$) a 2°C, 4°C e 7°C, foi de nove, sete e quatro dias, respectivamente.

Foi observado um aumento crescente da contagem desse grupo de microrganismos, à medida que aumentaram o tempo e a temperatura de armazenamento dos leites inoculados com baixa ou alta contagem de psicotróficos (Gráfico 1). Isto sugere que a refrigeração do leite cru, que é de, no máximo, 7°C, podendo ganhar 3°C durante o transporte, chegando até a unidade de processamento com cerca de 10°C, conforme previsto na legislação (BRASIL, 2011), não é suficiente para a manutenção da qualidade microbiológica da matéria-prima.

Entretanto, é importante ressaltar que, além do tempo e da temperatura de armazenamento, uma contagem inicial baixa de psicotróficos no leite é de fundamental importância para garantir a sua qualidade e uma menor população de bactérias psicotróficas durante o armazenamento, como foi verificado no presente estudo. Isso porque, após 72 horas de armazenamento a 10°C, o leite com contaminação inicial de $2,78 \log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ apresentou um aumento da

população de psicotróficos equivalente a, aproximadamente, dois ciclos logarítmicos, enquanto o leite com contaminação inicial de $5,78 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ e armazenado nas mesmas condições apresentou um aumento de três ciclos logarítmicos.

Apesar do aumento da contagem de psicotróficos observado no leite, os valores encontrados foram inferiores aos encontrados por Pinto (2004), que 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. Cousin e Marth (1977), ao estudarem o crescimento de bactérias psicotróficas em amostras de leite cru, observaram que, com apenas dois dias, a 7°C , a contagem de psicotróficos aumentou dois ciclos logarítmicos e a 10°C , 3 ciclos logarítmicos. Durante o período quatro dias de estocagem, Cardoso (2006) observou um aumento de dois ciclos logarítmicos na população de bactérias psicotróficas proteolíticas e de, aproximadamente, três ciclos logarítmicos na população de bactérias psicotróficas lipolíticas.

Portanto, estes resultados indicam e confirmam a importância do controle da contaminação inicial do leite cru por psicotróficos, principalmente por espécies de *Pseudomonas* e a necessidade de manutenção da matéria-prima no estabelecimento industrial, em temperaturas inferiores a 10°C e em menor tempo de armazenamento.

As contagens de psicotróficos apresentadas pelo leite inoculado com alta e baixa contagem de psicotróficos, após armazenamento por 72 horas, nas temperaturas de 4°C , 7°C e a 10°C , podem provocar algumas alterações indesejáveis e comprometer a utilização dos mesmos na fabricação dos produtos derivados. Com base nos dados da literatura, parece imprudente a fabricação de produtos a partir do leite em que a contagem de psicotróficos tenha excedido a

6 log UFC.mL⁻¹, pois, neste caso, é grande a possibilidade da presença de enzimas degradativas extracelulares (NÖRNBERG, 2009).

Segundo Cromie (1992), quando o número de microrganismos psicotróficos atinge 10⁷UFC.mL⁻¹(7 log UFC.mL⁻¹), começa a haver alterações no leite.

Por outro lado, Ranis e Lewis (1995) afirmam que, mesmo em produtos finais que tenham uma contagem bacteriana dentro dos padrões legais, as transformações na qualidade dos mesmos podem ocorrer. Essa alteração pode ser devido à produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas.

De acordo com Wiedmann et al. (2000), estirpes de *Pseudomonas*spp. isoladas de leite cru apresentaram atividade de proteases e lipases. Segundo estes autores, as estirpes pertencentes a estes grupos constituem organismos representantes da microbiota deterioradora, de particular preocupação para a indústria de laticínios e de alimentos, por produzirem enzimas hidrolíticas que atuam sobre constituintes importantes do leite, do ponto de vista tecnológico, as proteínas e os lipídios.

3.3 Concentração de ácidos graxos livres e atividade lipolítica

Na Tabela 3 pode ser observada a atividade lipolítica do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, após armazenamento a 4°C, 7°C e 10°C, por 0, 24, 48 e 72 horas.

Tabela 3 Atividade lipolítica (unidades de enzimas lipolíticas) no leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento		
	4°C	7°C	10°C
0	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}
24	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}	16,69 ^{bB}
48	16,57 ^{bA}	16,73 ^{bA}	16,93 ^{bA}
72	16,89 ^{cA}	16,98 ^{bA}	17,09 ^{bA}
Leite inoculado com alta contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento		
	4°C	7°C	10°C
0	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}
24	16,37 ^{aA}	16,98 ^{bA}	17,00 ^{aA}
48	16,75 ^{bA}	17,65 ^{cA}	18,21 ^{bA}
72	17,00 ^{bA}	18,02 ^{dB}	18,94 ^{bC}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula na coluna, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$)

O leite apresentou atividade lipolítica inicial de 16,17, em unidades de enzimas lipolíticas. Resultados semelhantes foram encontrados por Cardoso (2006), cujo leite analisado apresentou 16,09 unidades de enzimas lipolíticas, o que atribuiu à atividade enzimática, pela presença de lipases naturais no leite, as quais, segundo Chen, Daniel e Coolbear (2003), têm a propriedade de hidrolisar triacilgliceróis, constituintes da gordura, em ácidos graxos de cadeia curta, incluindo os ácidos butírico, caproico, caprílico e cáprico, principais responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis no leite. Observa-se que, durante o armazenamento, ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$), dependendo do tempo e da temperatura de armazenamento (Tabela 3).

Quando o leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos foi armazenado a 4 °C e a 7°C, houve um aumento significativo da atividade lipolítica, após 48 horas de armazenamento. Já no leite armazenado a 10°C foi

verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre a atividade lipolítica inicial e com 24 horas de armazenamento. Após este tempo, a atividade lipolítica manteve-se constante, ou seja, não houve diferença significativa entre os tempos de 24, 48 e 72 horas de armazenamento a 10°C.

No leite inoculado com alta contagem de psicotróficos armazenado a 4 °C e a 10°C houve um aumento significativo da atividade lipolítica, após 24 horas de armazenamento. Já no leite armazenado a 7°C, a atividade lipolítica deferiu significativamente em todos os tempos de armazenamento. Apesar de o tempo de armazenamento influenciar de forma diferente as temperaturas, pode-se afirmar que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade lipolítica inicial do leite para a atividade lipolítica após 72 horas de armazenamento nas temperaturas de 4 °C, 7 °C e 10°C.

Comparando-se as diferentes temperaturas de armazenamento em tempos iguais, no leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos, no final do armazenamento, constata-se que não houve diferença significativa entre a atividade lipolítica nas temperaturas de 4 °C, 7 °C e 10°C.

Por outro lado, o leite inoculado com alta contagem de bactérias psicotróficas apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nas diferentes temperaturas analisadas e aumento crescente em relação às mesmas, apresentando um aumento na atividade lipolítica de 5,13%, 11,44% e 17,13%, após armazenamento por 72 horas, nas temperaturas de 4 °C, 7 °C e 10°C, respectivamente. Cardoso (2006) também verificou que a atividade proteolítica e lipolítica no leite cru refrigerado aumentou durante a estocagem a 10°C. Wang e Jayarao (2001), ao analisarem a atividade lipolítica do leite com isolados de *P. fluorescens*, também verificaram interferência da temperatura de armazenamento na atividade lipolítica, a qual pode ter sido influenciada pela contagem de bactérias psicotróficas no leite, uma vez que, quando ele apresentou maior contagem de psicotróficos, apresentou, conseqüentemente, maiores valores de

atividade lipolítica (Gráfico 2). Isso foi confirmado estatisticamente pelo teste de correlação linear, uma vez que os valores do coeficiente de correlação e o nível de significância entre a contagem de psicotróficos e a atividade lipolítica do leite foram de 0,640 e 0,001, respectivamente. Isso indica que existe uma correlação linear positiva ($p < 0,01$) e, assim, quanto maior a contagem de bactérias psicotróficas no leite, maior é a atividade lipolítica do mesmo. Entretanto, 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.

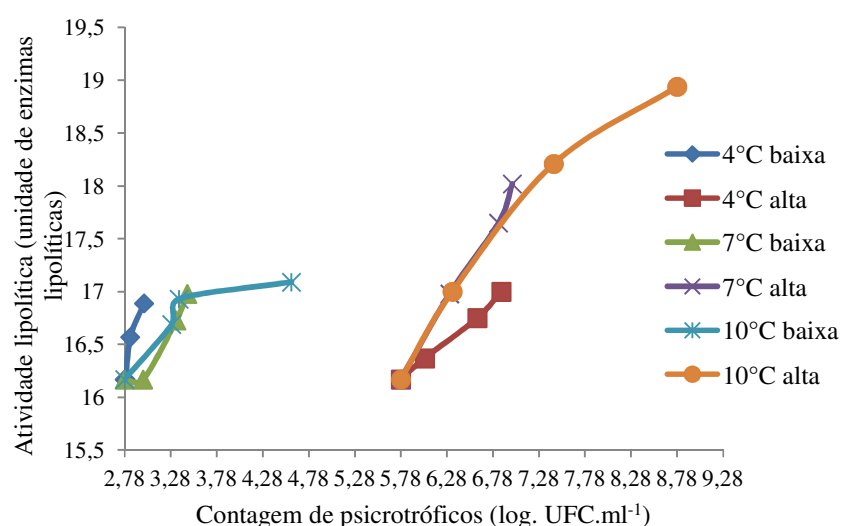


Gráfico 2 Atividade de enzimas lipolíticas, de acordo com a contagem de psicotróficos do leite armazenado em diferentes tempos e temperaturas

Segundo Cousin (1982), as lipases apresentam atividade ótima numa ampla faixa de temperatura (22 a 70°C), e as lipases produzidas por *Pseudomonas fluorescens* são ativas à temperatura de refrigeração (4 a 7°C).

Durante a estocagem de amostras de leite cru sob refrigeração, Celestino, Iyer e Roginski (1996) observaram o aumento do número de bactérias psicotróficas com atividades proteolíticas e lipolíticas, tendo a lipólise sido constatada pelo aumento do conteúdo de ácidos graxos livres.

Na Tabela 4 pode ser observada a concentração de ácidos graxos do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, após armazenamento a 4 °C, 7 °C e 10 °C, por 0, 24, 48 e 72 horas.

Tabela 4 Concentração de ácidos graxos (mmol.100g^{-1}) no leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento		
	4°C	7°C	10°C
0	1,32 ^{aA}	1,32 ^{aA}	1,32 ^{aA}
24	1,69 ^{bA}	3,03 ^{bB}	2,97 ^{bB}
48	1,76 ^{bA}	3,13 ^{bB}	3,06 ^{bB}
72	1,82 ^{bA}	5,44 ^{cB}	4,18 ^{cC}
Leite inoculado com alta contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento		
	4°C	7°C	10°C
0	1,32 ^{aA}	1,32 ^{aA}	1,32 ^{aA}
24	1,87 ^{bA}	3,16 ^{bB}	5,03 ^{bC}
48	1,98 ^{bA}	4,23 ^{cB}	5,29 ^{bC}
72	2,40 ^{cA}	4,70 ^{dA}	5,89 ^{bB}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula na coluna, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p>0,05$)

A concentração inicial de ácidos graxos livres no leite foi de 1,32 mmol.100g^{-1} , que é superior à encontrada por Moura et al. (1999), ao analisar leite pasteurizado; por Wolfschoon-Pombo, Carvalho e Fischer (1986), quando

analisaram leites cru de plataforma e por Gomes (1988), analisando leite pasteurizado.

Após armazenamento de 72 horas em diferentes temperaturas ocorreu um aumento significativo do teor de ácido graxos livres ($p < 0,05$) (Tabela 4), com valor máximo de $5,89 \text{ mmol} \cdot 100\text{g}^{-1}$ no leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos e armazenado por 72 horas a 10°C . Outros autores também verificaram aumento na concentração de ácidos graxos livres durante o armazenamento do leite sob refrigeração (DOWNEY, 1980; MOURA et al., 1999).

Comparando-se a concentração de ácidos graxos livres nas diferentes temperaturas no mesmo tempo, pode-se observar que houve uma diferença significativa entre a concentração de ácidos graxos livres do leite armazenado a 4°C e a 10°C , para os tempos de 24, 48 e 72 horas de armazenamento. Assim, tanto o tempo de armazenamento quanto a temperatura influenciaram de forma significativa ($p < 0,05$) a concentração de ácidos graxos livres do leite inoculado com alta e baixa contagem de psicrotróficos ao longo do armazenamento.

A ação das lipases produzidas pelas *Pseudomonas fluorescens*, segundo Moura et al. (1999), pode ser responsabilizada por esse incremento dos ácidos graxos livres ocorrido durante o período de armazenamento, como foi verificado no presente estudo.

Foi constatada correlação linear positiva entre a atividade lipolítica e a concentração de ácidos graxos livres, tanto do leite inoculado com baixa contagem de psicrotróficos quanto do leite com alta contagem de psicrotróficos, uma vez que foram obtidos índices de correlação linear e níveis de significância para cada nível de contaminação de 0,640 e 0,001, e 0,816 e 0,001, respectivamente. Assim, quanto maior a atividade lipolítica, maior o aumento da concentração de ácidos graxos livres (Gráfico 3).

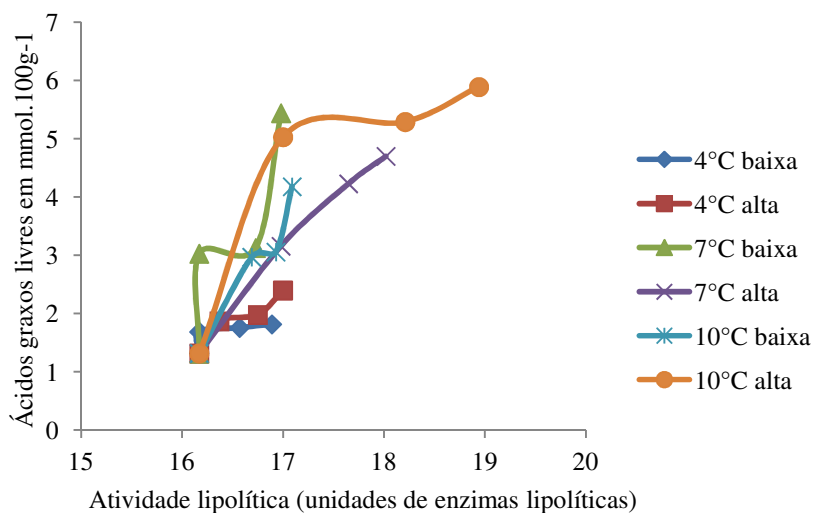


Gráfico 3 Concentração de ácidos graxos livres, de acordo com a atividade de enzimas lipolíticas do leite armazenado em diferentes tempos e temperaturas

A atividade lipolítica é influenciada pela contagem de microrganismos psicrotrofos. Consequentemente, pode ocorrer o aumento de ácidos graxos livres. Celestino, Lyer e Roginski (1996) e Downey (1980), pesquisando lipólise em leites resfriados a 4°C, verificaram um aumento considerável dos teores de ácidos graxos livres no leite, atribuindo este aumento ao desenvolvimento de microrganismos psicrotrofos nos leites analisados.

As amostras de leite que contêm cepas microbianas lipolíticas podem, ainda, sofrer reações indesejáveis, produzindo *off-flavors* e mau odor do leite, indicando o fim de sua vida útil (OUATTARA et al., 2004).

Embora o leite já contenha ácidos graxos livres, resultantes de uma síntese incompleta na glândula mamária, o grande número deles é proveniente da hidrólise dos triglicéridos por lipases. Esta hidrólise provoca o aumento da fração de ácidos graxos de cadeia curta (C-4 a C-8), conferindo aos produtos lácteos sabor e odor de ranço. Ácidos graxos de peso molecular maior (C-10 a

C-12) produzem sabor e odor de sabão. Ácidos graxos insaturados liberados durante a lipólise podem ser oxidados a cetonas e a aldeídos, produzindo sabor oxidado ou metálico (ARCURI, 2003; GOMES, 1988; MOURA et al., 1999; ORDÓÑEZ-PEREDA et al., 2005).

3.4 Frações de proteínas e atividade proteolítica

Outro fator que influencia a qualidade do leite e de produtos lácteos é a ação de proteases, as quais, dentre as enzimas extracelulares produzidas por muitas bactérias psicrotróficas, são as mais importantes em relação à deterioração de leite, juntamente com as lipases (ARCURI, 2003). Na Tabela 5 está representada a atividade proteolítica do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotróficas e armazenado em diferentes tempos e temperaturas.

Tabela 5 Atividade proteolítica (unidades de enzimas proteolíticas) do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrófilas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicrófilas			
Tempo de armazenamento	Temperatura de armazenamento		
(horas)	4°C	7°C	10°C
0	1,96 ^{aA}	1,96 ^{aA}	1,96 ^{aA}
24	1,96 ^{aA}	2,77 ^{aA}	1,96 ^{bA}
48	2,06 ^{bA}	3,86 ^{aA}	3,28 ^{bA}
72	2,33 ^{cA}	5,06 ^{bB}	3,35 ^{cB}
Leite inoculado com alta contagem de psicrófilas			
Tempo de armazenamento	Temperatura de armazenamento		
(horas)	4°C	7°C	10°C
0	1,96 ^{aA}	1,96 ^{aA}	1,96 ^{aA}
24	2,12 ^{aA}	2,77 ^{aA}	3,49 ^{bA}
48	2,79 ^{bA}	3,09 ^{aA}	3,95 ^{bA}
72	3,61 ^{cA}	6,43 ^{bB}	7,60 ^{cB}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula na coluna, não diferem pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$)

A atividade proteolítica inicial do leite foi de 1,96 unidades de enzimas, a qual está relacionada com as proteases naturais do leite. A ocorrência de proteólise pela atividade de proteases nativas termoestáveis é relacionada, principalmente, com a atividade de plasmina, uma serina protease e seu precursor inativo, o plasminogênio (BASTIAN; BROWN, 1996; HUMBERT et al., 1982). Entretanto, foi verificada o aumento da atividade proteolítica durante o armazenamento, dependente do tempo e temperatura (Tabela 5).

Nas temperaturas de 4°C, 7°C e 10°C, tanto no leite inoculado com baixa contagem de psicrófilas quanto no leite inoculado com alta contagem de psicrófilas, a atividade proteolítica apresentou aumento significativo ($p < 0,05$), durante o armazenamento até 72 horas.

Comparando-se as diferentes temperaturas e o mesmo tempo de armazenamento, pode-se verificar que, nos tempos de 24 e de 48 horas, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) da atividade proteolítica do leite inoculado com baixa e alta contagem de psicrófilas. Entretanto, com 72 horas

de armazenamento, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade proteolítica, de acordo com a temperatura de armazenamento. No leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos foi verificado um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade proteolítica entre as temperaturas de 4°C, 7°C e 10°C, e no leite inoculado com alta contagem de psicotróficos, entre as temperaturas de 7°C e 10°C.

Segundo Cousin (1982), as enzimas proteolíticas decorrentes de *Pseudomonas* spp. são sintetizadas a 4°C, mas a concentração é aumentada em temperaturas mais elevadas. Resultados semelhantes foram apresentados por Wang e Jayarao (2001), ao observarem que isolados de *P. fluorescens* exibiram maior percentual de atividade proteolítica a 7°C (80%) e a 22°C (90,9%).

Assim, a temperatura de armazenamento influencia a produção das proteases. Quantidades relativamente altas de proteases são produzidas à temperatura de refrigeração (4°C a 7°C). Alguns autores observaram que a estocagem do leite a 2°C inibe a produção de proteases por *Pseudomonas* ssp. (COUSIN, 1982; SHAH, 1994). Embora as proteases apresentem maior atividade de 30°C a 45°C, elas também são significativamente ativas a 4°C (COUSIN, 1982).

No presente estudo, houve um aumento significativo da atividade proteolítica ($p < 0,05$), mesmo quando o leite apresentou contagem de $2,99 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, após 72 horas de armazenamento a 4°C. Outros autores também constataram atividade proteolítica na presença de baixa contagem de bactérias proteolíticas. Wiking et al. (2002) detectaram aumento significativo da proteólise a 4 °C e 8°C, após 72 horas de estocagem, mesmo na presença de baixa contagem de bactérias psicotróficas, sugerindo que, possivelmente, a proteólise ocorreu por atividade do sistema plasmina/plasminogênio.

Plasmina, plasminogênio e ativadores de plasminogênio encontram-se associados, principalmente, às micelas de caseína (BASTIAN; BROWN, 1996).

Essa associação pode ser afetada pela atividade de proteases de *Pseudomonas* ssp. (FAJARDDO-LIRA; NIELSEN, 1998) e isto resulta na liberação de plasmina ligada à caseína para o soro, aumentando, assim, sua atuação no mesmo, o que pode comprometer de forma negativa o processo de fabricação de queijos (FOX, 1989). Portanto, as proteases bacterianas atuam tanto diretamente na degradação das proteínas, como indiretamente pela liberação da plasmina.

Adams, Barach e Speck (1976) concluíram que um grau de proteólise detectável não requer alta população de psicotróficos ao registrarem um decréscimo de 10% a 20% na concentração de κ -caseína, após dois dias de estocagem a 5°C, na presença de 10^5 UFC.mL⁻¹ (5 log UFC.mL⁻¹) de *Pseudomonas* ssp.

Por outro lado, 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.

Costa et al. (2002), estudando a espécie de microrganismos psicotróficos *Pseudomonas fluorescens*, constataram aumento significativo na produção de proteases em leite estocado a 6°C, após 72 horas, quando a concentração celular era de, aproximadamente, 10^7 UFC.mL⁻¹ (7 log UFC.mL⁻¹). Os autores constataram que a protease se encontrava associada à membrana bacteriana e apresentava termorresistência significativa.

Haryani et al. (2003) constataram pouca correlação entre a contagem de psicotróficos, o grau de proteólise ou a atividade proteolítica. Isso também foi corroborado por Izidoro et al. (2013), uma vez que verificaram que não houve relação de linearidade entre a população de microrganismos psicotróficos, a percentagem de bactérias proteolíticas e a atividade metabólica proteolítica. Entretanto, no presente estudo foi verificada correlação linear significativa entre a contagem de psicotróficos e a atividade proteolítica, uma vez que se

obtiveram índice de correlação e nível de significância de 0,392 e 0,003, respectivamente. Assim, quanto maior a contagem de psicotróficos, mais elevada a atividade proteolítica, como pode ser observado no Gráfico 4.

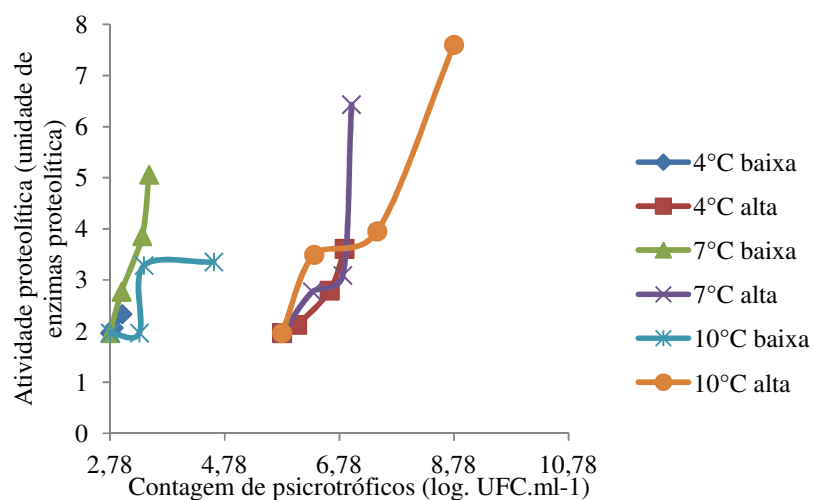


Gráfico 4 Atividade de enzimas proteolíticas, de acordo com a contagem de psicotróficos do leite armazenado em diferentes tempos e temperaturas

A hidrólise de proteínas do leite pelas proteinases provenientes de psicotróficos determina a coagulação do leite, a alteração de sabor e a redução do rendimento no processamento de derivados (ADAMS; BARACH; SPECK, 1976; FAIRBAIRN; LAW, 1986; ORDÓÑEZ-PEREDA et al., 2005; SILVEIRA et al., 1998), principalmente na fabricação de queijos, e pouca consistência do coágulo formado durante fabricação dos mesmos (COUSIN, 1982; FAIRBAIRN; LAW, 1986; KOHLMANN et al., 1991; PRATA, 2001; THOMAS; THOMAS, 1973).

A κ -caseína é a mais susceptível ao ataque das proteases dos microrganismos, em especial por enzimas produzidas por *Pseudomonas*

(COUSIN, 1982), enquanto a β -caseína e a α -caseína são menos susceptíveis (DATTA; DEETH, 2001). As proteases são capazes de hidrolisar toda a caseína disponível no leite em peptídeos solúveis (MOURA et al., 1999; VIDAL-MARTINS; ROSSI JÚNIOR; REZENDE-LAGO, 2005), aumentando, assim, a concentração dos mesmos no leite.

Na Tabela 6 podem ser observados os teores médios de proteína solúvel e nitrogênio não proteico do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas e armazenado em diferentes tempos e temperaturas.

Tabela 6 Teor médio de proteína solúvel (PS) ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) e nitrogênio não proteico (NNP) ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos						
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento					
	4°C		7°C		10°C	
	PS	NNP	PS	NNP	PS	NNP
0	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}
24	0,67 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,88 ^{bB}	0,05 ^{bB}	0,79 ^{bB}	0,05 ^{bB}
48	0,77 ^{bA}	0,05 ^{bA}	0,98 ^{cB}	0,06 ^{cA}	0,82 ^{bA}	0,05 ^{bB}
72	0,77 ^{bA}	0,05 ^{bA}	1,01 ^{cB}	0,06 ^{cB}	0,86 ^{bC}	0,05 ^{bC}
Leite inoculado com alta contagem de psicotróficos						
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento					
	4°C		7°C		10°C	
	PS	NNP	PS	NNP	PS	NNP
0	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}
24	0,69 ^{aA}	0,04 ^{bA}	0,81 ^{bB}	0,05 ^{bB}	1,60 ^{bC}	0,09 ^{bC}
48	0,82 ^{bA}	0,05 ^{cA}	1,04 ^{cB}	0,06 ^{cB}	1,68 ^{cC}	0,10 ^{cC}
72	0,84 ^{bA}	0,05 ^{cA}	1,12 ^{dB}	0,07 ^{dB}	1,68 ^{cC}	0,10 ^{cC}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula na coluna, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p>0,05$)

A proteína solúvel do leite, antes do armazenamento, foi de 0,66 $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Após armazenamento, o leite inoculado com baixa contagem de

psicrotróficos apresentou 1,01 g.100g⁻¹ de proteína solúvel, enquanto o leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos apresentou 1,68 g.100g⁻¹ de proteína solúvel.

Foi verificado um aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de proteína solúvel do leite inoculado com baixa e alta contagem de psicrotróficos durante 72 horas de armazenamento, nas temperaturas de 4 °C, 7 °C e 10°C.

Esses dados estão de acordo com os de Moura et al. (1999) que verificaram que, com o aumento do tempo de armazenamento, houve elevação no teor de nitrogênio solúvel a pH 4,6 no leite, coincidindo com o aumento na contagem de *Pseudomonas*.

Pinto (2004) observou que uma inoculação inicial de, aproximadamente, 10⁶UFC.mL⁻¹ (6 log UFC.mL⁻¹) levou à hidrólise das frações de caseína. Este resultado está de acordo com o que foi relatado por Cousins, Sharpe e Law (1977), segundo os quais uma contaminação por bactérias psicrotróficas superior a 2,0 x 10⁶UFC.mL⁻¹ (6,31 log UFC.mL⁻¹) já compromete a integridade das frações de caseína, com conseqüente decréscimo na produção de queijos, de aproximadamente 5%, ocasionando impactos econômicos negativos à indústria de laticínios.

As proteases são capazes de hidrolisar toda a caseína disponível no leite em peptídeos solúveis. As proteases de origem psicrotrófica têm atividade hidrolítica em várias frações da caseína, apresentando, no entanto, baixa atividade degradativa sobre as proteínas do soro (SANTOS; LARANJA, 2001).

A proteína solúvel do leite pode ser degradada pela ação da plasmina, principalmente com o aumento da atividade da mesma, pela ação das enzimas proteolíticas das bactérias psicrotróficas sobre a caseína. Com a atividade da plasmina sobre as proteínas solúveis pode ocorrer a liberação de peptídeos solúveis e de nitrogênio solúvel ao ácido tricloroacético a 12% (v/v), considerado como nitrogênio não proteico.

O teor de nitrogênio não proteico aumentou significativamente ($p < 0,05$) de acordo com o aumento do tempo e da temperatura de armazenamento, tanto do leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos quanto do leite inoculado com alta contagem de psicotróficos, mostrando, assim, a atuação de enzimas, principalmente da plasmina, durante a refrigeração do leite e não das enzimas produzidas pelas bactérias psicotróficas.

Segundo Alvim (1992), Datta e Deeth (2001) e Gebre-Egziabher, Humberte e Blankenagel (1980), a atividade das enzimas proteolíticas produzidas por psicotróficos expressa-se, principalmente, sobre as caseínas, mais especificamente sobre as porções glicolisadas e hidrofílicas da κ -caseína. Essa atividade é muito similar à ação da quimosina (coalho) sobre as frações proteicas do leite no processo de fabricação dos queijos, pois resulta na liberação de moléculas de GMP, como foi comprovado por alguns autores.

4 CONCLUSÃO

O leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas apresenta alterações na sua qualidade, quando é armazenado por 24, 48 e 72 horas, nas temperaturas de 4°C, 7°C e 10°C. Maiores alterações são observadas no leite inoculado com maior contagem de bactérias psicotróficas, quando é armazenado em temperaturas mais elevadas e em maior tempo de estocagem, condições que favoreceram a obtenção de um leite com contagem de bactérias mais elevada.

Quanto menor o tempo de estocagem, menor a temperatura e a contaminação inicial, menor será o aumento da contagem de bactérias psicotróficas, atividade lipolítica e proteolítica, e menores alterações em relação à gordura e à proteína do leite, sendo, assim, necessário o controle de tais variáveis durante o armazenamento. Isso porque não é possível recuperar um leite de qualidade insatisfatória. Além de diminuir a vida de prateleira do produto, pode vir a ocasionar problemas tecnológicos e econômicos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. M.; BARACH, J. T.; SPECK, M. L. Effect of psychrotrophic bacteria from raw milk on milk proteins and stability of milk proteins to ultrahigh temperature treatment. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 59, n. 5, p. 823-827, May 1976.
- ALVIM, T. C. **Efeito da qualidade do leite na detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alto desempenho: filtração gélida (GF-HPLC)**. 1992. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1992.
- ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicrotólicas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. (Ed.). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Templo, 2003. p. 105-115.
- ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotólicas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, nov. 2008.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official method of analysis**. 18th ed. Washington, 2005. 82 p.
- BASTIAN, E. D.; BROWN, R. J. Plasmin in milk and dairy products: un update. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 5, p. 435-437, May 1996.
- BOOR, K. J. et al. Microbiological and chemical quality of raw milk in New York State. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 6, p. 1743-1748, June 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6-11.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 68**, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

BYNUM, D. G.; BARBANO, D. M. Whole milk reverse osmosis retentates for Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 1, p. 1-10, Jan. 1985.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 2006. 57 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

COSTA, L. M. et al. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 52, n. 2, p. 1-13, 2002.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Werribee, v. 51, n. 2, p. 59-63, 1996.

CEMPÍRKOVÁ, R. Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. **Veterinary Medicine Czech**, Praha, v. 47, n. 8, p. 227-233, 2002.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 45, 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**, Champaign, 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**, Gravesend, v. 42, p. 12-17, 1977.

CROMIE, R. Psychrotrophics and their enzyme residues in cheese milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 47, n. 2, p. 96-100, 1992.

CUNHA, L. T.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Determinação das condições físico-químicas e microbiológicas de leite B cru refrigerado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15., 1996, Poços de Caldas. **Resumos...** Lavras: UFLA, 1996. p. 73.

CUNHA, M. F.; BRANDÃO, S. C. C. A coleta a granel pode aumentar os riscos com as bactérias psicrotóxicas. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, p. 71-73, jul./ago. 2000.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk: a review. **Food and Bioproducts Processing**, Davis, v. 79, n. 4, p. 197-210, 2001.

DOWNEY, W. K. Review of the progress of dairy science: flavor impairment from pre and post manufacture lipolysis in milk and dairy products . **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 47, n. 2, p. 237-252, June 1980.

FAGUNDES, M. C. et al. Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 568-572, mar./abr. 2006.

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

FAJARDO-LIRA, C. E.; NIELSEN, S. S. Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 4, p. 901-908, Apr. 1998.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 6, p. 1379-1400, 1989.

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

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

GOBETTI, M.; ROSSI, J. Peptidases profiles of *Pseudomonas fluorescens* identification and properties. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 75, n. 4, p. 924-934, Apr. 1992.

GOMES, M. I. F. V. **Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana**. 1988. 85 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1988.

HARYANI, S. et al. Production of proteinases by psychrotrophic bacteria in raw milk stored at low temperature. **Australian Journal of Dairy Technology**, Werribee, v. 58, n. 1, p. 15-20, 2003.

HUMBERT, G. et al. Proteinase activity in bovine raw milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, p. 2271-2277, 1982.

IZIDORO, T. B. et al. Atividade proteolítica de bactérias psicrotróficas em leites estocados em diferentes temperaturas. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 60, n. 4, p. 452-457, jul./ago. 2013.

KOHLMANN, K. L. et al. Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3275-3283, Oct. 1991.

MOURA, C. J. et al. Lipólise e avaliação sensorial em queijo tipo parmesão fabricado com leite resfriado e inoculado com *Pseudomonas fluorescens*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 308, p. 3-8, 1999.

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

NÖRNBERG, M. de F. B. L. **Atividade proteolítica, aderência e produção de biofilmes por microrganismos psicrotróficos em leite bovino**. 2009. 89 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

ORDÓÑEZ-PEREDA, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 2, 279 p.

OUATTARA, G. C. et al. Fatty acids released from milk fat by lipoprotein lipase and lipolytic psychrotrophs. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 69, n. 8, p. C659-C664, 2004.

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

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

PRATA, L. F. **Fundamentos de ciência do leite**. São Paulo: UNESP; FUNEP, 2001. 287 p.

R DEVELOPMENTE CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: Foundation for Statistical Computing, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

RANIS, S.; LEWIS, M. J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 20, n. 3, p. 517-524, 1995.

SANTOS, J. M. et al. Crescimento de micro-organismos psicotróficos em leite cru refrigerado. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 24, n. 3, p. 297-300, jul./set. 2013.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. da. Bactérias psicotróficas e a qualidade do leite. **Revista CBQL**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 12-15, 2003a.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. da. Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2003b.

SANTOS, M. V.; LARANJA, F. L. F. Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, mar. 2001.

SANVIDO, G. B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de esticagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira**. 2007. 94 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

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

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e geleificação**. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SILVEIRA, I. A. et al. Influência de microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado: uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 21-27, 1998.

THOMAS, S. B.; THOMAS, B. F. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk: part 2. **Dairy Industries**, Gravesend, v. 38, n. 2, p. 61-70, 1973.

VIDAL-MARTINS, A. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; REZENDE-LAGO, N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 396-400, 2005.

WANG, L.; JAYARAO, B. M. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1421-1429, June 2001.

WIEDMANN, M. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 5, p. 2085-2095, Nov. 2000.

WIKING, L. et al. Effects of storage conditions on lipolysis, proteolysis and sensory attributes in high quality raw milk. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 57, n. 4, p. 190-194, May 2002.

WOLFSCHOOM-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, v. 41, n. 244, p. 8-12, mar./abr. 1986.

CAPÍTULO 3

**INFLUÊNCIA DO ARMAZENAMENTO E DA CONTAGEM DE
BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS DO LEITE NA PRODUÇÃO, NAS
CARACTERÍSTICAS E NO RENDIMENTO DO QUEIJO PRATO**

RESUMO

A estocagem do leite sob refrigeração pode ocasionar a diminuição do rendimento na fabricação de queijos, devido à seleção das bactérias psicrotróficas, em períodos prolongados a temperaturas iguais ou menores que 7°C, além de alterações na qualidade dos queijos. Nesse contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da temperatura e do tempo de refrigeração e da contagem total de bactérias psicrotróficas do leite nas características e no rendimento do queijo prato. O crescimento de bactérias psicrotróficas no leite cru, inoculado com baixa e alta contagem das mesmas, durante a estocagem a 4°C, 7°C e 10 °C, por até 72horas, promoveu alterações na qualidade do leite, a qual influenciou substancialmente a composição e o rendimento do queijo prato. A maior influência verificada foi da atividade proteolítica e lipolítica no leite após armazenamento sob refrigeração, mesmo quando apresentou baixas contagens de bactérias psicrotróficas e foi armazenado a 4 °C, por 24 horas. Ocorreu alteração durante a produção dos queijos devido à alteração no tempo de coagulação do leite, à alteração das características físico-químicas e à queda significativa do rendimento. Sendo assim, é importante não só o controle da contagem de bactérias psicrotróficas, mas também o controle do tempo e da temperatura de armazenamento do leite, uma vez que a indústria pode enfrentar alterações na qualidade do queijo prato e prejuízos com a queda de rendimento de sua fabricação.

Palavras-chave: Qualidade do queijo prato. Resfriamento do leite. Rendimento de fabricação.

ABSTRACT

Milk storage under refrigeration can cause the decrease of the yield in cheese-making, due to the selection of psychrotrophic bacteria, in extended periods at temperatures equal or lower than 7°C, in addition to the alterations in the quality of cheeses. Under this context, this work was conducted with the objective of evaluating the influence of refrigeration time and temperature and of the total count of milk psychrotrophic bacteria upon the characteristics and on the yield of prato cheese. The growth of psychrotrophic bacteria in raw milk, inoculated with a low and high count of these bacteria during the storage at 4°C, 7°C and 10 °C for up to 72hours, promoted alteration in the milk quality, which markedly the composition and the yield of prato cheese. The greatest influence found was that of the proteolytic and lipolytic activity in milk after storage under refrigeration even when it presented low counts of psychrotrophic bacteria and was stored at 4 °C for 24 hours. Alteration occurred during the cheese production due to the alteration in the coagulation time of milk, to the alteration of the physicochemical characteristics and to the significant fall of yield. In such case, it is important not only the control of the count of psychrotrophic bacteria, but also the control of the time and temperature of milk storage, since the industry can face alterations in the prato cheese quality and losses with the yield fall of its making.

Keywords: Prato cheese quality. Milk cooling. Making yield.

1 INTRODUÇÃO

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 da 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).

O rendimento industrial é de grande importância econômica para a indústria de queijo. Vários fatores podem afetá-lo, tais como a 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 a contagem de células somáticas e de bactérias psicrotóxicas no leite cru (FURTADO, 2005; LUCEY; KELLY, 1994).

A estocagem do leite sob refrigeração pode ocasionar a diminuição do rendimento na fabricação de queijos, devido à seleção das bactérias psicrotóxicas, em períodos prolongados em temperaturas iguais ou menores que 7°C (PRATA, 2001; SANTOS; FONSECA, 2003).

Esses microrganismos são capazes de se multiplicar a 7 °C ou menos, independente de sua temperatura ótima de crescimento. A maioria das bactérias psicrotóxicas não suporta temperaturas de pasteurização e ultra-alta temperatura (UAT), porém, muitas são capazes de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas termorresistentes que podem resultar em problemas tecnológicos, tais como formação de sabores estranhos, coagulação e redução do rendimento de produtos derivados do leite.

Em muitos estudos foi demonstrado que a estocagem do leite sob refrigeração influencia de forma negativa o rendimento de diversos queijos (BARBOSA et al., 2009; CARDOSO, 2006; MOURA, 1997; VIDIGAL, 2012).

Amorim (2007) verificou que a estocagem refrigerada de leite cru interferiu no rendimento industrial da fabricação de queijo prato. Contudo, ainda não foi elucidado como o armazenamento (tempo e temperatura) e a contagem de bactérias psicrotróficas influenciam o rendimento e as características do queijo prato.

A determinação da influência do armazenamento e da contagem de psicrotróficas na qualidade e no rendimento do queijo prato é de extrema importância para verificar como estas variáveis influenciam o rendimento e a qualidade do queijo prato, uma vez que este é um dos queijos mais produzidos no Brasil.

Neste contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da temperatura e do tempo de refrigeração e da contagem total de bactérias psicrotróficas do leite nas características e no rendimento do queijo prato.

2 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi desenvolvido nas instalações da planta piloto, no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Leite e Produtos Lácteos do Setor de Laticínios, e no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, localizados no Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

2.1 Tratamentos e preparo do leite

Em três ocasiões diferentes, compondo, assim, três repetições do experimento como as outras etapas subsequentes, foi coletado leite recém-ordenhado, o qual foi submetido ao processo de termização a $65^{\circ}\text{C} \cdot 15\text{s}^{-1}$, em um trocador de calor em placas, com o objetivo de destruir as bactérias psicotróficas presentes. Após o processo de termização, realizou-se teste fosfatase e peroxidase para verificar se o perfil enzimático do leite termizado correspondia ao do leite cru, segundo técnicas descritas por Brasil (2006). Todos os leites apresentaram atividade da fosfatase e peroxidase positiva.

Posteriormente, o leite foi inoculado com $2,78 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $5,78 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de *Pseudomonas fluorescens*, devido à importância da contagem inicial de bactérias psicotróficas no leite e das diferentes contagens já encontradas no leite em trabalhos anteriores (ARCURI et al., 2008; CUNHA; CARVALHO; ABREU, 1996; PINTO; MARTINS, VANETTI, 2006; SILVA, 2003). No presente estudo, o leite inoculado com $2,78 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ foi considerado o leite com baixa contagem inicial de psicotróficos e o inoculado com $5,78 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ foi considerado o leite com alta contagem inicial de psicotróficos.

A cultura de *Pseudomonas fluorescens* NCTC 10038, utilizada para a inoculação, foi adquirida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, na forma liofilizada. Foi realizada a reidratação do liofilizado em caldo nutritivo e incubação por 48 horas, à temperatura de 28°C, sendo repicada a cada 48 horas para manutenção de sua atividade, segundo recomendação de Gobetti e Rossi (1992). A determinação da concentração de células de *Pseudomonas fluorescens* presentes no caldo nutritivo foi feita por contagem em placas, utilizando como meio de cultura o ágar padrão (PCA), incubado por 48 horas à temperatura de 28°C (GOBETTI; ROSSI, 1992), para posterior inoculação.

O leite inoculado com duas contagens de bactérias psicrotóficas foi dividido em volumes iguais e armazenado em recipientes plásticos previamente esterilizados, em diferentes temperaturas (4°C, 7°C e 10 °C) e tempos (0, 24, 48 e 72 horas).

As temperaturas de armazenamento foram determinadas devido ao fato de a Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2011) estabelecer que a temperatura máxima de conservação do leite cru refrigerado é de 7°C, na propriedade rural/tanque comunitário e de 10°C, no estabelecimento processador. Em se tratando de tanque de refrigeração por expansão direta, deve ser dimensionado de modo que permita refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 4°C, no tempo máximo de três horas após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade e, em se tratando de tanque de refrigeração por imersão, ser dimensionado de modo tal que permita refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 7°C, no tempo máximo de três horas após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade.

Os tempos de armazenamento foram determinados uma vez que a Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2011) estabelece que o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e seu recebimento no estabelecimento que vai beneficiá-

lo (pasteurização, esterilização, etc.) deve ser, no máximo, de 48 horas, recomendando-se como ideal um período de tempo não superior a 24 horas. Entretanto, na indústria beneficiadora, ele pode ser armazenado por período superior a 48 horas.

2.2 Análises do leite

As amostras de leite foram coletadas em frascos previamente esterilizados e imediatamente submetidos às análises microbiológicas, enzimáticas e físico-químicas.

2.2.1 Análises microbiológicas

Foram realizadas análises microbiológicas para a contagem de bactérias mesofílicas viáveis, após a incubação, a 32°C, por 48 horas e para a contagem de bactérias psicotróficas, após incubação a 7°C, por 10 dias (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992), do leite recém-ordenhado, para verificar a sua qualidade microbiológica.

O leite termizado foi submetido à análise de contagem de bactérias psicotróficas para verificar a eficiência da destruição desses microrganismos, segundo a mesma metodologia.

Para acompanhar o crescimento das bactérias psicotróficas no leite armazenado sob diferentes tempos e temperaturas, foi realizada análise de contagem de bactérias psicotróficas, segundo a mesma metodologia.

2.2.2 Análises físico-químicas

Com o objetivo de verificar possíveis alterações durante o armazenamento, foram realizadas as seguintes análises do leite recém-ordenhado e do leite inoculado com bactérias psicotróficas armazenado em diferentes temperaturas (4°C, 7°C e 10°C) e tempos (0, 24, 48 e 72 horas): análise de gordura pelo método butirométrico de Gerber, densidade a 15°C, acidez titulável, extrato seco total, extrato seco desengordurado (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 2005), teste de estabilidade a 72% v/v, índice crioscópico (BRASIL, 2006), determinação dos ácidos graxos livres (WOLFSCHOON-POMBO; CARVALHO; FISCHER, 1986), nitrogênio total do leite pelo método de micro Kjeldahl (AOAC, 2005), nitrogênio solúvel em tampão de acetato a pH 4,6 e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12% (v/v), de acordo com Bynum e Barbano (1985); seguido por Micro Kjeldahl conforme (AOAC, 2005). O fator utilizado para a conversão dos teores de nitrogênio para proteína foi de 6,38.

2.2.3 Análises enzimáticas

O leite recém-ordenhado e o leite inoculado com bactérias psicotróficas armazenado em diferentes temperaturas (4 °C, 7 °C e 10 °C) e tempos (24, 48 e 72 horas) foram submetidos às análises de atividade proteolítica pela técnica descrita por Bendicho et al. (2002), com modificações segundo Cardoso (2006) e atividade lipolítica pelo método descrito por Rajmohan, Dodd e Waites (2002), com modificações segundo Cardoso (2006).

2.3 Fabricação dos queijos prato

Após o armazenamento do leite, foram conduzidas as fabricações dos queijos prato com 40L de leite para cada tratamento, em tanques de fabricação de queijo com capacidade de 50L. Os processos de fabricação foram idênticos para cada tratamento e repetição, e a tecnologia utilizada foi segundo Furtado e Lourenço Neto (1994).

No tanque de fabricação, o leite foi pasteurizado a 65°C/30min e, posteriormente, realizou-se teste fosfatase e peroxidase para verificar a eficiência da pasteurização, segundo técnicas descritas por Brasil (2006). Todos os leites apresentaram atividade da fosfatase negativa e peroxidase positiva.

O leite pasteurizado foi resfriado a 35 °C e adicionado de fermento láctico mesofílico composto por *Lactococcus lactis* sp. *lactis* e *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* (1% (v/v) (Lyofast MOS 0,62®, Sacco). Procedeu-se à pré-fermentação por 30 minutos.

Posteriormente, foram adicionados cloreto de cálcio (0,4 mL.L⁻¹ de solução a 50%), corante à base de urucum (0,8 mL.L⁻¹) e coalho bovino (Abomasum®, Sacco), em quantidade suficiente para que ocorresse a coagulação no tempo de 40 minutos, a 35 °C, para todos os tratamentos. Após a coagulação, o gel foi cortado em cubos de cerca de 0,5 cm de aresta, os quais permaneceram em repouso por 5 minutos. Em seguida, a mistura soro/coágulo foi agitada por 20 minutos, com aumento gradativo da velocidade de agitação. Foi realizada a primeira dessoragem, com a retirada de 30% do soro e adicionada água a 80 °C, aumentando-se a temperatura da mistura soro/coágulo em 1 °C a cada 3 minutos, até atingir 42 °C. Prosseguiu-se com a agitação por, aproximadamente, 45 minutos, até o ponto da massa.

Atingido o ponto da massa, foram realizadas a dessoragem e a pré-prensagem por 30 minutos, com presença de soro e enformagem em formas

retangulares de 0,5 kg, que foram encaminhadas para a prensagem. A prensagem foi realizada da seguinte forma: 1ª prensagem – 9 kg, durante 30 minutos; 2ª prensagem – 12 kg, por 30 minutos; 3ª prensagem – 15 kg, por 2 horas e 4ª prensagem – 15 kg, por 2 horas.

Após a prensagem, os queijos foram salgados por imersão em salmoura 20%, durante 12 horas e secos, por 24 horas, a 12 °C. Depois de secos, os queijos foram embalados a vácuo em plástico termo encolhível e pesados.

2.4 Tempo de coagulação da fabricação dos queijos prato

Foi verificado o tempo de coagulação do leite, o qual foi mensurado do momento da adição do coalho até o ponto de corte da massa, com o objetivo de verificar se as condições de armazenamento e de contagem de bactéria psicotróficas o influenciam.

2.5 Análises dos queijos prato

Após um dia de fabricação, amostras de queijos prato de cada tratamento foram submetidas a análises de umidade pelo método gravimétrico e calculadas por diferença (100% - porcentagem de extrato seco total); de proteína total pelo método micro Kjeldahl, na qual foi utilizado o fator 6,38 para estimativa do teor de proteína total; teor de cinzas; de pH, com o auxílio de um potenciômetro da marca Tecnal (modelo Tec-3MP) previamente calibrado; do teor de gordura pelo método butirométrico de Gerber (AOAC, 2005) e do teor de sal pelo método de Volhard modificado, descrito por Kosikowski (1982). Os teores de gordura no extrato seco (GES) foram calculados dividindo-se os teores de gordura do queijo pelo seu teor de extrato seco total. Os teores de sal na umidade dos queijos foram determinados pela fórmula: $\text{sal/umidade (\%)} = (\text{sal/sal} + \text{umidade}) \times 100$.

2.6 Cálculo do rendimento dos queijos prato

O rendimento econômico da fabricação dos queijos, 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 ao teor de umidade dos queijos para $42 g.100^{-1}$, utilizando a fórmula descrita por Furtado (2005).

Também foram calculadas as cifras de perda de gordura, proteína e sólidos totais do leite no soro, de acordo com Furtado (2005) e cifras de transição de gordura, proteína e sólidos totais, utilizando-se cálculo matemático segundo Furtado e Wolfschonn-Pombo (1979). Esses cálculos foram baseados na composição físico-química do leite e do soro de cada fabricação, bem como na composição físico-química dos queijos obtidos e o seu rendimento em kg.

Para tanto, foram realizadas análises do soro do leite proveniente de cada tratamento: gordura, pelo método butirométrico de Gerber, densidade a 15 °C, extrato seco total e nitrogênio total pelo método de micro Kjeldahl (AOAC, 2005). O fator utilizado para a conversão do teor de nitrogênio para proteína foi de 6,38. As amostras do soro foram coletadas durante a dessoragem parcial da massa, ou seja, antes do aquecimento da massa com adição de água.

2.7 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O delineamento experimental utilizado neste experimento foi um fatorial $2 \times 3 \times 4$ inteiramente casualizado, sendo duas contagens de bactérias psicrotróficas na inoculação do leite, três temperaturas de armazenamento do leite (4°C, 7°C e 10°C) e quatro tempos de armazenamento (0, 24, 48 e 72 horas), com três repetições (três coletas e inoculações), tendo o queijo

produzido com leite recém-ordenhado, ou seja, no tempo 0h de armazenamento, sido considerado o controle.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando-se um nível de significância $p < 0,05$. O teste de Scott-Knott foi utilizado para verificar quais tratamentos diferiam entre si, quando a ANOVA indicou existir diferença significativa.

Para verificar se existe correlação linear entre o rendimento, as características do queijo prato e as características do leite, foi realizada uma análise de correlação linear de Pearson, considerando-se um nível de significância $p > 0,05$.

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Matéria-prima para a fabricação de queijos

3.1.1 Composição físico-química

A composição físico-química média do leite recém-ordenhado pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 Valores médios de composição físico-química do leite cru antes do armazenamento

Parâmetros	
Densidade relativa a 15°C	1,031 g.mL ⁻¹
Acidez	0,14 g de ácido láctico.100mL ⁻¹
Gordura	3,16g.100g ⁻¹
Extrato seco total	11,85 g.100g ⁻¹
Extrato seco desengordurado	8,69 g.100g ⁻¹
Estabilidade ao alizarol 72 % (v/v)	Estável
Proteína total	3,41 g.100g ⁻¹
Índice crioscópico	540°H

Os resultados de densidade relativa a 15°C, acidez, gordura, proteína total, índice crioscópico e extrato seco desengordurado estão em conformidade com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado (BRASIL, 2011). O leite apresentou-se estável ao alizarol 72% (v/v).

Foi verificado que, após armazenamento, não houve alteração dos valores encontrados para o leite cru e para o leite armazenado em todos os tratamentos, em relação à densidade relativa a 15°C, gordura, proteína total, índice crioscópico e extrato seco desengordurado, estabilidade. Entretanto, o

leite armazenado a 10°C apresentou elevação da acidez de 0,14g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite de ácido láctico para 0,16g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite, mesmo assim, o leite ainda está de acordo com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o qual exige que a acidez do leite deve estar entre 0,14 e 0,18g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite (BRASIL, 2011).

Esse aumento da acidez durante o armazenamento sob resfriamento também foi reportado por Sanvido (2007). Ao armazenar o leite a 5°C, por 4 dias, este autor verificou aumento da acidez de 0,156g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite para 0,16g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite.

3.1.2 Microbiologia

O leite recém-ordenhado apresentou contagem de mesófilos de 3,5 log UFC.mL⁻¹ e de psicrotrófico de 0,6 log UFC.mL⁻¹. Após a termização, a contagem de mesófilos foi de 2,9 log UFC.mL⁻¹ e de psicrotrófico de 0 log UFC.mL⁻¹, o que indica a eficiência do processo de termização no controle da contagem de bactérias psicrotróficas.

Na Tabela 2 pode ser observada a contagem de bactérias psicrotróficas do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotróficas após armazenamento a 4°C, 7°C e 10°C, por 0, 24, 48 e 72 horas.

Tabela 2 Contagem média de bactérias psicotróficas (log UFC.mL⁻¹) no leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento	Temperatura de armazenamento		
(horas)	4°C	7°C	10°C
0	2,78 ^{aA}	2,78 ^{aA}	2,78 ^{aA}
24	2,79 ^{bA}	2,98 ^{bB}	3,29 ^{bC}
48	2,84 ^{cA}	3,34 ^{cB}	3,37 ^{cC}
72	2,99 ^{dA}	3,46 ^{dB}	4,59 ^{dC}
Leite inoculado com alta contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento	Temperatura de armazenamento		
(horas)	4°C	7°C	10°C
0	5,78 ^{aA}	5,78 ^{aA}	5,78 ^{aA}
24	6,04 ^{bA}	6,31 ^{bB}	6,34 ^{bC}
48	6,61 ^{cA}	6,84 ^{cA}	7,44 ^{cB}
72	6,87 ^{dA}	6,99 ^{dB}	8,78 ^{dC}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$), do leite inoculado com 2,78 log UFC.mL⁻¹ e 5,78 log UFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas fluorescens*

Como pode ser observado na Tabela 2, o leite inoculado com 2,78 log UFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas fluorescens* apresentou contagem de psicotróficos no final do tempo de armazenamento de 2,99 log UFC.mL⁻¹, 3,46 log UFC.mL⁻¹ e 4,49 log UFC.mL⁻¹, nas temperaturas de armazenamento de 4, 7 e 10 °C, respectivamente. O leite inoculado com 5,78 log UFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas fluorescens*, ao final do armazenamento de 72 horas, apresentou contagem de bactérias psicotróficas de 6,87 log UFC.mL⁻¹, 6,99 log UFC.mL⁻¹ e 8,78 log UFC.mL⁻¹, nas temperaturas de armazenamento de 4 °C, 7 °C e 10 °C, respectivamente.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) da contagem de bactérias psicotróficas entre os tempos de armazenamento (0, 24, 48 e 72 horas), tanto do leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos quanto no leite inoculado com alta contagem de psicotróficos, independentemente da temperatura, tendo a contagem de microrganismos psicotróficos sido crescente na medida em que se

aumentava o tempo de estocagem. Comparando-se a contagem de psicotróficos no mesmo tempo e em diferentes temperaturas, pode-se observar que ela influenciou de forma significativa ($p < 0,05$).

É importante ressaltar que, além do tempo e da temperatura de armazenamento, uma contagem inicial baixa de psicotróficos no leite é de fundamental importância para garantir a sua qualidade e um menor crescimento deles durante o armazenamento, como foi verificado no presente estudo. Após 72 horas de armazenamento a 10°C, o leite com contaminação inicial de 2,78 log UFC.mL⁻¹ apresentou um aumento da população de psicotróficos equivalente a, aproximadamente, a 2 ciclos logarítmicos, enquanto o leite com contaminação inicial de 5,78 log UFC.mL⁻¹ e armazenado nas mesmas condições apresentou um aumento de 3 ciclos logarítmicos.

As contagens de psicotróficos apresentadas pelo leite inoculado com alta e baixa contagem de psicotróficos, após armazenamento por 72 horas, nas temperaturas de 4°C, 7°C e a 10°C, podem trazer algumas alterações indesejáveis e comprometer a utilização dos mesmos na fabricação dos produtos derivados.

3.1.3 Concentração de ácidos graxos livres e atividade lipolítica

Na Tabela 3 pode ser observada a atividade lipolítica do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, após armazenamento a 4°C, 7°C e 10°C, por 0, 24, 48 e 72 horas.

Tabela 3 Atividade lipolítica (unidades de enzimas lipolíticas) no leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicrotróficos			
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento		
	4°C	7°C	10°C
0	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}
24	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}	16,69 ^{bB}
48	16,57 ^{bA}	16,73 ^{bA}	16,93 ^{bA}
72	16,89 ^{cA}	16,98 ^{bA}	17,09 ^{bA}
Leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos			
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento		
	4°C	7°C	10°C
0	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}
24	16,37 ^{aA}	16,98 ^{bA}	17,00 ^{aA}
48	16,75 ^{bA}	17,65 ^{cA}	18,21 ^{bA}
72	17,00 ^{bA}	18,02 ^{dB}	18,94 ^{bC}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula na coluna, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$)

O leite apresentou atividade lipolítica inicial de 16,17 em unidades de enzimas lipolíticas. Resultados semelhantes foram encontrados por Cardoso (2006), que relatou ter encontrado no leite 16,09 unidades de enzimas lipolíticas, atribuindo este valor à atividade enzimática pela presença de lipases naturais no leite, as quais, segundo Chen, Daniel e Coolbear (2003), têm a propriedade de hidrolisar triglicérides, constituintes da gordura, em ácidos graxos de cadeia curta, incluindo os ácidos butírico, caproico, caprílico e cáprico, principais responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis no leite. Entretanto, durante o armazenamento, ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$), dependendo do tempo e da temperatura de armazenamento (Tabela 3).

A atividade lipolítica pode ter sido influenciada pela contagem de bactérias psicrotróficas no leite, uma vez que, quando ele apresentou maior contagem de psicrotróficos, apresentou, conseqüentemente, maiores valores de

atividade lipolítica. Esse resultado foi confirmando estatisticamente pelo teste de correlação linear, uma vez que os valores do coeficiente de correlação e o nível de significância entre a contagem de psicotróficos e atividade lipolítica do leite foram de 0,640 e 0,001, respectivamente. Isso indica que existe correlação linear positiva ($p < 0,01$) e, assim, quanto maior a contagem de bactérias psicotróficas no leite, maior é a sua atividade lipolítica.

Durante a estocagem de amostras de leite cru sob refrigeração, Celestino, Iyer e Roginski (1996) observaram o aumento do número de bactérias psicotróficas com atividades proteolíticas e lipolíticas, tendo a lipólise sido constatada pelo aumento do conteúdo de ácidos graxos livres.

Na Tabela 4 pode ser observada a concentração de ácidos graxos do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, após armazenamento a 4 °C, 7 °C e 10 °C, por 0, 24, 48 e 72 horas.

Tabela 4 Concentração de ácidos graxos ($\text{mmol} \cdot 100\text{g}^{-1}$) no leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento		
	4°C	7°C	10°C
0	1,32 ^{aA}	1,32 ^{aA}	1,32 ^{aA}
24	1,69 ^{bA}	3,03 ^{bB}	2,97 ^{bB}
48	1,76 ^{bA}	3,13 ^{bB}	3,06 ^{bB}
72	1,82 ^{bA}	5,44 ^{cB}	4,18 ^{cC}
Leite inoculado com alta contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento		
	4°C	7°C	10°C
0	1,32 ^{aA}	1,32 ^{aA}	1,32 ^{aA}
24	1,87 ^{bA}	3,16 ^{bB}	5,03 ^{bC}
48	1,98 ^{bA}	4,23 ^{cB}	5,29 ^{bC}
72	2,40 ^{cA}	4,70 ^{dA}	5,89 ^{bB}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula na coluna, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$)

A concentração inicial de ácidos graxos livres no leite foi de 1,32 mmol.100g⁻¹, sendo superior ao encontrado por Moura et al. (1999), ao analisar leite pasteurizado; Wolfschoon-Pombo, Carvalho e Fischer (1986), quando analisaram leites cru de plataforma e Gomes (1988), analisando leite pasteurizado.

Após armazenamento de 72horas em diferentes temperaturas, ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) (Tabela 4), com valor máximo de 5,89 mmol.100g⁻¹ no leite inoculado com alta contagem de psicotróficos e armazenado, por 72horas, a 10 °C. Outros autores também verificaram um aumento na concentração de ácidos graxos durante o armazenamento do leite sob refrigeração (DOWNEY, 1980; MOURA et al., 1999).

Comparando-se a concentração de ácidos graxos nas diferentes temperaturas no mesmo tempo, pode-se observar que houve diferença significativa entre a concentração de ácidos graxos do leite armazenado a 4 °C e a 10 °C, para os tempos de 24, 48 e 72horas de armazenamento. Assim, tanto o tempo de armazenamento quanto a temperatura influenciaram de forma significativa ($p < 0,05$) a concentração de ácidos graxos do leite inoculado com alta e baixa contagem de psicotróficos, ao longo do armazenamento.

3.1.4 Frações de proteínas e atividade proteolítica

Outro fator que influencia a qualidade do leite e de produtos lácteos é a ação de proteases, as quais, dentre as enzimas extracelulares produzidas por muitas bactérias psicotróficas, são as mais importantes em relação à deterioração de leite, juntamente com as lipases (ARCURI, 2003). Na Tabela 5 está representada a atividade proteolítica do leite icocolado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas e armazenado em diferentes tempos e temperaturas.

Tabela 5 Atividade proteolítica (unidades de enzimas proteolíticas) do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicrotróficos			
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento		
	4°C	7°C	10°C
0	1,96 ^{aA}	1,96 ^{aA}	1,96 ^{aA}
24	1,96 ^{aA}	2,77 ^{aA}	1,96 ^{bA}
48	2,06 ^{bA}	3,86 ^{aA}	3,28 ^{bA}
72	2,33 ^{cA}	5,06 ^{bB}	3,35 ^{cB}
Leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos			
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento		
	4°C	7°C	10°C
0	1,96 ^{aA}	1,96 ^{aA}	1,96 ^{aA}
24	2,12 ^{aA}	2,77 ^{aA}	3,49 ^{bA}
48	2,79 ^{bA}	3,09 ^{aA}	3,95 ^{bA}
72	3,61 ^{cA}	6,43 ^{bB}	7,60 ^{cB}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula na coluna, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$)

A atividade proteolítica inicial do leite foi de 1,96 unidades de enzimas, a qual está relacionada com as proteases naturais do leite. Entretanto, foi verificado um aumento significativo da atividade proteolítica ($p < 0,05$), mesmo quando o leite apresentou contagem de $2,99 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, após 72 horas de armazenamento a 4 °C.

A κ -caseína é a mais susceptível ao ataque das proteases dos microrganismos, em especial por enzimas produzidas por *Pseudomonas* (COUSIN, 1982), enquanto a β -caseína e α -caseína são menos susceptíveis (DATTA; DEETH, 2001). As proteases são capazes de hidrolisar toda a caseína disponível no leite em peptídeos solúveis (MOURA et al., 1999; VIDAL-MARTINS; ROSSI JÚNIOR; REZENDE-LAGO, 2005), aumentando, assim, a concentração dos mesmos no leite.

Na Tabela 6 podem ser observados os teores médios de proteína solúvel e nitrogênio não proteico do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotróficas e armazenado em diferentes tempos e temperaturas.

Tabela 6 Teor médio de proteína solúvel (PS) ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) e nitrogênio não proteico (NNP) ($\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$) do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicrotróficos						
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento					
	4°C		7°C		10°C	
	PS	NNP	PS	NNP	PS	NNP
0	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}
24	0,67 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,88 ^{bB}	0,05 ^{bB}	0,79 ^{bB}	0,05 ^{bB}
48	0,77 ^{bA}	0,05 ^{bA}	0,98 ^{cB}	0,06 ^{cA}	0,82 ^{bA}	0,05 ^{bB}
72	0,77 ^{bA}	0,05 ^{bA}	1,01 ^{cB}	0,06 ^{cB}	0,86 ^{bC}	0,05 ^{bC}
Leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos						
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento					
	4°C		7°C		10°C	
	PS	NNP	PS	NNP	PS	NNP
0	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}
24	0,69 ^{aA}	0,04 ^{bA}	0,81 ^{bB}	0,05 ^{bB}	1,60 ^{bC}	0,09 ^{bC}
48	0,82 ^{bA}	0,05 ^{cA}	1,04 ^{cB}	0,06 ^{cB}	1,68 ^{cC}	0,10 ^{cC}
72	0,84 ^{bA}	0,05 ^{cA}	1,12 ^{dB}	0,07 ^{dB}	1,68 ^{cC}	0,10 ^{cC}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula na coluna, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p>0,05$)

A proteína solúvel do leite, antes do armazenamento, foi de 0,66 $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$; após armazenamento, o leite inoculado com baixa contagem de psicrotróficos apresentou 1,01 $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de proteína solúvel, enquanto o leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos apresentou 1,68 $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de proteína solúvel (Tabela 6). Foi verificado um aumento significativo ($p<0,05$) da concentração de proteína solúvel do leite inoculado com baixa e alta contagem

de psicrótróficos durante 72 horas de armazenamento, nas temperaturas de 4, 7 e 10 °C.

O teor de nitrogênio não proteico aumentou significativamente ($p < 0,05$) de acordo com o aumento do tempo e da temperatura de armazenamento, tanto do leite inoculado com baixa contagem de psicrótróficos quanto do leite inoculado com alta contagem de psicrótróficos, mostrando, assim, a atuação de enzimas, principalmente da plasmina, durante a refrigeração do leite e não das enzimas produzidas pelas bactérias psicrótróficas.

3.2 Tempo de coagulação do leite

Na Tabela 7 pode ser observado o tempo de coagulação do leite recém-ordenhado e inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrótróficas e armazenado em diferentes tempos e temperaturas.

Tabela 6 Tempo de coagulação do leite inoculado com *Pseudomonas fluorescens* após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicrotróficos na inoculação											
Parâmetro	Tratamento controle	Tratamentos									C.V. (%)
		4 °C			7 °C			10 °C			
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	
Tempo de coagulação (minutos)	37,7 ^a ±(0,4)	39 ^b ±(0,4)	41,3 ^d ±(0,5)	42 ^d ±(0,5)	40,3 ^c ±(0,5)	42,3 ^d ±(0,5)	45 ^f ±(0,5)	40,3 ^c ±(0,5)	43,3 ^e ±(0,5)	51,3 ^g ±(0,6)	1,14
Leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos na inoculação											
Parâmetro	Tratamento controle	Tratamentos									C.V. (%)
		4 °C			7 °C			10 °C			
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	
Tempo de coagulação (minutos)	37,7 ^a ±(0,5)	39 ^b ±(0,5)	42 ^d ±(0,5)	45 ^f ±(0,6)	40 ^c ±(0,5)	42,3 ^d ±(0,5)	50 ^g ±(0,6)	43,3 ^e ±(0,5)	43,7 ^e ±(0,5)	55,7 ^h ±(0,7)	1,25

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$)

Como se observa nos dados da Tabela 7, o tempo de coagulação do leite para a fabricação dos queijos prato variou de 37,7 minutos a 55,7 minutos. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo de coagulação conforme o aumento da temperatura e do tempo de estocagem, tanto do leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos, quanto no leite inoculado com alta contagem de psicotróficos.

O aumento do tempo de coagulação do leite na produção de queijo pode ser explicado pelas alterações que ocorrem nos constituintes do leite durante o armazenamento sob refrigeração, principalmente devido à solubilização parcial da caseína.

Segundo Furtado (2005), quando o leite cru é mantido sob refrigeração (3-5 °C), entre 24 e 48 horas, há uma tendência de as frações da caseína transferirem-se parcialmente da fase micelar para o soro. Ali, Andrews e Cheeseman (1980) observaram que quando houve maior transferência da caseína para a fase solúvel, o tempo de coagulação foi prolongado.

3.3 Composição e características físicas dos queijos prato

Nas Tabelas 8 e 9 pode ser observada a composição dos queijos prato fabricados com leite armazenado em diferentes condições e inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, respectivamente.

Tabela 8 Composição do queijo prato produzido com leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas e após armazenamento em diferentes tempos e temperaturas

Análise	Tratament o controle	Leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas									C.V. (%)
		Tratamentos									
		4 °C			7 °C			10 °C			
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	
Extrato seco total (g.100g ⁻¹)	58,46 ^c ±(0,24)	57,42 ^b ±(0,24)	57,17 ^b ±(0,24)	57,3 ^b ±(0,24)	54,24 ^a ±(0,23)	54,44 ^a ±(0,23)	54,65 ^a ±(0,23)	54,2 ^a ±(0,23)	54,45 ^a ±(0,23)	54,25 ^a ±(0,23)	0,42
Umidade (g.100g ⁻¹)	41,54 ^a ±(0,21)	42,58 ^b ±(0,21)	42,83 ^b ±(0,21)	42,7 ^b ±(0,21)	45,76 ^c ±(0,23)	45,56 ^c ±(0,23)	45,35 ^c ±(0,23)	45,8 ^c ±(0,23)	45,55 ^c ±(0,23)	45,75 ^c ±(0,23)	0,5
Proteína total (g.100g ⁻¹)	23,12 ^c ±(0,03)	22,9 ^c ±(0,03)	22,93 ^c ±(0,03)	22,9 ^c ±(0,03)	21,72 ^b ±(0,03)	21,49 ^b ±(0,03)	21,43 ^a ±(0,03)	20,43 ^a ±(0,03)	20,6 ^a ±(0,03)	20,28 ^a ±(0,03)	0,15
Cinzas (g.100g ⁻¹)	3,3 ^a ±(0,0)	3,07 ^a ±(0,0)	3,01 ^a ±(0,0)	3,03 ^a ±(0,0)	3,1 ^a ±(0,0)	3,27 ^a ±(0,0)	3,01 ^a ±(0,0)	3,04 ^a ±(0,0)	3,04 ^a ±(0,0)	3,31 ^a ±(0,0)	0,07
pH	5,33 ^a ±(0,01)	5,33 ^a ±(0,01)	5,36 ^a ±(0,01)	5,35 ^a ±(0,01)	5,32 ^a ±(0,01)	5,33 ^a ±(0,01)	5,32 ^a ±(0,01)	5,33 ^a ±(0,01)	5,32 ^a ±(0,01)	5,32 ^a ±(0,01)	0,25
Gordura (g.100g ⁻¹)	26,03 ^f ±(0,1)	25 ^e ±(0,1)	24,6 ^d ±(0,1)	24,26 ^c ±(0,1)	24,6 ^d ±(0,1)	24,36 ^c ±(0,1)	23,6 ^b ±(0,1)	24,3 ^c ±(0,1)	24,33 ^c ±(0,1)	23 ^a ±(0,1)	0,42
GES (g.100g ⁻¹)	44,53 ^d ±(0,22)	43,53 ^c ±(0,22)	43,02 ^b ±(0,21)	42,34 ^a ±(0,21)	45,35 ^c ±(0,23)	44,75 ^d ±(0,22)	43,18 ^a ±(0,21)	44,83 ^d ±(0,22)	44,69 ^d ±(0,21)	44,39 ^a ±(0,21)	0,5
Sal (g.100g ⁻¹)	1,65 ^c ±(0,00)	1,65 ^c ±(0,00)	1,65 ^c ±(0,00)	1,65 ^c ±(0,00)	1,51 ^a ±(0,00)	1,55 ^b ±(0,00)	1,65 ^c ±(0,00)	1,75 ^d ±(0,00)	1,75 ^d ±(0,00)	1,75 ^d ±(0,00)	0,1
S/U (g.100g ⁻¹)	3,82 ^d ±(0,01)	3,72 ^c ±(0,01)	3,71 ^c ±(0,01)	3,72 ^c ±(0,01)	3,21 ^a ±(0,01)	3,28 ^a ±(0,01)	3,51 ^b ±(0,01)	3,68 ^c ±(0,01)	3,7 ^c ±(0,01)	3,68 ^c ±(0,01)	0,26

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem, pelo teste Scott-Knott (p>0,05)

Tabela 9 Composição do queijo prato produzido com leite inoculado com alta contagem de bactérias psicrotróficas e após armazenamento em diferentes tempos e temperaturas

Análise	Tratamento controle	Leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos									C.V. (%)
		Tratamentos									
		4 °C			7 °C			10 °C			
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	
Extrato seco total (g.100g ⁻¹)	58,46 ^c ±(0,24)	57,44 ^b ±(0,24)	57,5 ^b ±(0,24)	57,4 ^b ±(0,24)	54,64 ^a ±(0,23)	54,65 ^a ±(0,23)	54,59 ^a ±(0,23)	54,19 ^a ±(0,23)	54,34 ^a ±(0,23)	54,31 ^a ±(0,23)	0,42
Umidade (g.100g ⁻¹)	41,54 ^a ±(0,21)	42,56 ^b ±(0,21)	42,41 ^b ±(0,21)	42,6 ^b ±(0,21)	45,36 ^c ±(0,23)	45,35 ^c ±(0,23)	45,41 ^c ±(0,23)	45,81 ^c ±(0,23)	45,66 ^c ±(0,23)	45,69 ^c ±(0,23)	0,5
Proteína total (g.100g ⁻¹)	23,12 ^f ±(0,03)	22,17 ^e ±(0,03)	22,77 ^f ±(0,03)	21,43 ^c ±(0,03)	21,08 ^c ±(0,03)	21,69 ^d ±(0,03)	20,69 ^b ±(0,03)	20,48 ^b ±(0,03)	20,55 ^b ±(0,03)	19,44 ^a ±(0,03)	0,16
Cinzas (g.100g ⁻¹)	3,03 ^a ±(0,00)	3,04 ^a ±(0,00)	3,0 ^a ±(0,00)	3,01 ^a ±(0,00)	3,24 ^a ±(0,00)	3,01 ^a ±(0,00)	3,02 ^a ±(0,00)	3,01 ^a ±(0,00)	3,01 ^a ±(0,00)	3,01 ^a ±(0,00)	0,09
pH	5,33 ^a ±(0,02)	5,32 ^a ±(0,02)	5,34 ^a ±(0,02)	5,36 ^a ±(0,02)	5,31 ^a ±(0,02)	5,32 ^a ±(0,02)	5,32 ^a ±(0,02)	5,31 ^a ±(0,02)	5,31 ^a ±(0,02)	5,32 ^a ±(0,02)	0,37
Gordura (g.100g ⁻¹)	26,03 ^g ±(0,06)	25 ^f ±(0,06)	24,47 ^c ±(0,06)	24,26 ^d ±(0,06)	24,56 ^f ±(0,06)	24,06 ^c ±(0,06)	23,23 ^b ±(0,06)	24,2 ^d ±(0,06)	24,06 ^c ±(0,06)	23 ^a ±(0,06)	0,25
GES (g.100g ⁻¹)	44,53 ^d ±(0,3)	43,52 ^b ±(0,3)	42,48 ^a ±(0,3)	42,27 ^a ±(0,3)	44,96 ^d ±(0,3)	44,03 ^c ±(0,3)	42,56 ^a ±(0,3)	44,65 ^d ±(0,3)	44,28 ^d ±(0,3)	42,34 ^a ±(0,3)	0,67
Sal (g.100g ⁻¹)	1,64 ^b ±(0,00)	1,65 ^b ±(0,00)	1,65 ^b ±(0,00)	1,65 ^b ±(0,00)	1,55 ^a ±(0,00)	1,64 ^b ±(0,00)	1,65 ^b ±(0,00)	1,75 ^c ±(0,01)	1,75 ^c ±(0,01)	1,75 ^c ±(0,01)	0,29
S/U (g.100g ⁻¹)	3,81 ^e ±(0,03)	3,73 ^d ±(0,03)	3,74 ^d ±(0,03)	3,72 ^d ±(0,03)	3,3 ^a ±(0,03)	3,5 ^b ±(0,03)	3,5 ^b ±(0,03)	3,67 ^c ±(0,03)	3,68 ^c ±(0,03)	3,68 ^c ±(0,03)	0,83

Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas não diferem, pelo teste Scott-Knott (p>0,05)

Os queijos prato apresentaram extrato seco entre 58,46 e 54,19g.100g⁻¹, ocorrendo uma diminuição de acordo com o tempo de armazenamento e a temperatura de estocagem. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os queijos prato fabricados com leite recém-ordenhado (controle) e os fabricados com leite armazenado, tanto inoculado com baixa quanto com alta contagem de bactérias psicotróficas (Tabelas 8 e 9).

Acompanhado da diminuição do extrato seco total dos queijos, ocorreu um aumento da umidade, a qual variou entre 41,54 g.100g⁻¹ e 45,81 g.100g⁻¹. A análise comparativa entre os queijos prato mostra que os valores de umidade encontrados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) tanto para os queijos produzidos com leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos (Tabela 8), quanto para os queijos produzidos com leite inoculado com alta contagem de psicotróficos (Tabela 8), cuja umidade foi maior que a do queijo prato produzido com leite recém-ordenhado (controle).

O queijo produzido com leite inoculado com baixa e alta contagem de psicotróficos armazenados a 4 °C apresentou teor de umidade menor ($p < 0,05$) que os produzidos com leite armazenado a 7°C e a 10 °C, os quais não diferiram entre si ($p > 0,05$). Assim, quando se aumentou a temperatura de estocagem, ocorreu um aumento na umidade dos queijos.

Alguns autores também verificaram o aumento da umidade dos queijos produzidos com leite refrigerado. Hicks et al. (1986) observaram um aumento do teor de umidade no queijo cheddar durante a estocagem do leite cru. Moura (1997) relatou um aumento de 2% no teor de umidade de queijo parmesão fabricado com leite estocado a 4 °C, por cinco dias.

A alteração do teor de umidade dos queijos é explicada pela degradação proteolítica da caseína, que também pode causar uma maior retenção de água na massa de queijos fabricados com leite estocado sob refrigeração, com consequente aumento da umidade dos produtos (HICKS et al., 1986; MOURA, 1997). Tal fato foi verificado no presente estudo, uma vez que houve aumento da atividade proteolítica e da quantidade de proteína

solúvel (Tabela 6) e, conseqüentemente, alteração na umidade dos queijos produzidos com os respectivos leites (Tabelas 8 e 9). Verificou-se correlação linear positiva ($p < 0,01$) entre a atividade proteolítica do leite com umidade dos queijos e, assim, quanto maior foi a atividade proteolítica no leite, maior foi a umidade dos queijos produzidos com eles.

O aumento da proteólise do leite levou também a uma diminuição do teor de proteína dos queijos produzidos, uma vez que o coeficiente de correlação linear e o nível de significância entre a atividade proteolítica do leite e o teor de proteína dos queijos foram de -0,6 e 0,001, respectivamente.

Os queijos produzidos com leite inoculado com baixa contagem de psicrótrófos e armazenados a 4 °C não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao teor de proteína total do queijo produzido com leite recém-ordenhado. Por outro lado, o teor de proteína dos queijos produzidos com leite inoculado com baixa contagem de psicrótrófos e armazenados a 7 °C e a 10 °C foi menor que o teor de proteína do queijo produzido com leite recém-ordenhado ($p < 0,05$).

Comparando-se os teores de proteína total dos queijos produzidos com leite inoculado com alta contagem de bactérias psicrótrófos e do queijo produzido com leite recém-ordenhado, foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os mesmos e diminuição destes valores.

O teor de gordura total dos queijos variou de 23 a 26,03 g.100g⁻¹, sendo verificada uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Ocorreu diminuição do teor de gordura dos queijos conforme aumentaram o tempo e a temperatura de armazenamento do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrótrófos (Tabelas 8 e 9).

A gordura no extrato seco variou de 44,95 a 42,27 g.100g⁻¹. A análise comparativa entre os queijos produzidos mostra que os valores de gordura no extrato seco encontrados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre alguns tratamentos, sendo essa variação devido aos diferentes valores encontrados de gordura e extrato seco dos queijos.

Os queijos prato apresentaram teor de sal de 1,51 a 1,75 g.100g⁻¹ e a análise comparativa entre mostra que estes valores encontrados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre alguns tratamentos. O mesmo ocorreu com o teor de sal na umidade, o qual variou entre 3,21 a 3,81 g.100g⁻¹. Essa variação pode ter ocorrido devido à diferença de umidade entre os queijos.

Como pode ser observado nas Tabelas 8 e 9, os queijos prato analisados apresentaram pH entre 5,31 e 5,36, tendo sido verificado que os mesmos não diferiram significativamente em relação a esse parâmetro ($p > 0,05$). O pH médio dos queijos prato analisados está de acordo com o que relataram Furtado e Lourenço Neto (1994), os quais afirmam que o pH médio esperado de um queijo prato é de 5,2 a 5,4.

3.4 Rendimento dos queijos prato

Na Tabela 10 pode ser observado o rendimento econômico e ajustado dos queijos prato fabricados com leite armazenado em diferentes condições e inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotólicas, respectivamente.

Tabela 10 Rendimento econômico e ajustado (l de leite.kg⁻¹ de queijo) dos queijos prato fabricados com leite armazenado em diferentes condições e inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas respectivamente

		Leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicotróficas									C.V. (%)
Análise	Tratamento controle	Tratamentos									
		4 °C			7 °C			10 °C			
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	
Rendimento	7,85 ^a	7,9 ^b	7,95 ^c	8,2 ^f	8,06 ^e	8,23 ^g	8,42 ⁱ	8 ^d	8,3 ^h	8,48 ^j	0,15
Varição (%)	± (0,01)	± (0,01)	± (0,01)	± (0,01)	± (0,01)	± (0,01)	± (0,01)	± (0,01)	± (0,01)	± (0,01)	
Rendimento ajustado	6,84 ^a	7,02 ^b	7,49 ^d	7,7 ^e	7,96 ^g	7,29 ^e	7,7 ^e	7,66 ^e	7,77 ^f	7,96 ^g	0,49
Varição (%)	± (0,03)	± (0,03)	± (0,04)	± (0,04)	± (0,04)	± (0,04)	± (0,04)	± (0,04)	± (0,04)	± (0,04)	
		Leite inoculado com alta contagem de bactérias psicotróficas									C.V. (%)
Análise	Tratamento controle	Tratamentos									
		4 °C			7 °C			10 °C			
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	
Rendimento	7,85 ^a	7,92 ^b	8,05 ^c	8,24 ^e	8,15 ^d	8,31 ^f	8,79 ^h	8,23 ^e	8,44 ^g	8,73 ^h	0,44
Varição (%)	-	-0,89	-2,55	-4,97	-3,82	-5,86	-11,97	-4,84	-7,52	-11,21	
Rendimento ajustado	6,84 ^a	6,91 ^a	7,39 ^b	7,72 ^c	7,55 ^b	7,52 ^b	8,2 ^c	7,88 ^d	7,92 ^d	8,67 ^f	1,22
Varição (%)	± (0,08)	± (0,08)	± (0,09)	± (0,09)	± (0,09)	± (0,09)	± (0,1)	± (0,1)	± (0,1)	± (0,11)	
Varição (%)	-	-1,02	-8,04	-12,87	-10,38	-9,94	-19,88	-15,20	-15,79	-26,75	

Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas não diferem, pelo teste Scott-Knott (p>0,05)

O rendimento econômico do queijo prato produzido com leite recém-ordenhado foi de 7,85 L de leite.kg⁻¹ de queijo e rendimento ajustado de 6,84 L de leite.kg⁻¹ de queijo (Tabela 10), os quais estão próximos ao rendimento do queijo prato obtido por alguns autores (RAMOS, 2013; SILVEIRA; ABREU, 2005; SPADOTI; DORNELAS; ROIG, 2003).

Foi verificada diminuição significativa ($p < 0,05$) do rendimento dos queijos prato produzidos a partir do leite inoculado e armazenado em diferentes tempos e temperaturas, em relação ao produzido com leite recém-ordenhado (Tabela 10), chegando a até 10,25 L de leite.kg⁻¹ de queijo. Estes valores diferem dos resultados obtidos por Amorim (2007), o qual verificou, em seu estudo, que a estocagem refrigerada de leite cru ocasionou aumento do rendimento industrial da fabricação de queijo prato, fato atribuído, pelo autor, à maior retenção de água no queijo.

Contudo, em vários estudos tem sido demonstrada redução no rendimento de queijos fabricados a partir de leite cru com contagem alta de psicotróficos obtida após estocagem sob refrigeração (AYLWARD; O'LEARY; LANGLOIS, 1980; BANKS, 1990; BANKS et al., 1988; COUSINS; SHARPE; LAW, 1977; ELLIS; MARTH, 1984; HICKS et al., 1982, 1986; MOURA, 1997; NELSON; MARSHALI, 1977; STOFER; HICKS, 1983; YAN; LANGLOIS; O'LEARY, 1983).

O menor rendimento econômico foi verificado na produção do queijo prato com leite armazenado a 7 °C e a 10 °C, por 72 horas, e inoculado com alta contagem de bactérias psicotróficas. Houve uma redução de até 11,97% do rendimento de queijo prato em relação ao tratamento controle (Tabela 10), quando ele foi elaborado com leite armazenado a 7 °C, por 72 horas e com contagem de bactérias psicotróficas de 6,99 log. UFC.mL⁻¹ (Tabela 2).

Os valores de perda de rendimento dos queijos prato produzidos com leite inoculado com bactérias psicotróficas e armazenados sob refrigeração

foram maiores do que as perdas verificadas por outros autores na produção de outros tipos de queijos com leite contendo maior contagem de bactérias psicrotróficas (AYLWARD; O'LEARY; LANGLOIS, 1980; BANKS et al., 1988; BARBOSA et al., 2009; CARDOSO, 2006; COUSINS; SHARPE; LAW, 1977; ELLIS; MARTH, 1984; MOURA; 1997; NELSON; MARSHALL, 1977; YAN; LANGLOIS; O'LEARY, 1983).

Segundo Lucey e Kelly (1994), a população de bactérias psicrotróficas deve ser superior a 10^6 UFC.mL⁻¹ (6 log. UFC.mL⁻¹) no leite cru refrigerado, para que haja uma redução no rendimento de queijos. Entretanto, no presente estudo, na produção de queijos prato com leite apresentando contagens menores que 6 log. UFC.mL⁻¹ de bactérias psicrotróficas, o rendimento econômico foi menor que na do queijo prato produzido com leite recém-ordenhado. A menor contagem de psicrotróficos após armazenamento do leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas foi de 2,79 log. UFC.mL⁻¹, quando o mesmo foi armazenado por 24 horas, à temperatura de 4 °C. Apesar de a contagem de psicrotróficos ser relativamente baixa, o queijo produzido com este leite ainda assim apresentou uma queda no rendimento de 0,64%.

Portanto, constatações de perdas no rendimento de queijos não dependem apenas do número de bactérias psicrotróficas no leite cru, mas também do tipo de bactérias psicrotróficas que predominam durante a estocagem desta matéria-prima e que determinam a taxa de proteólise e lipólise (CARDOSO, 2006). Entretanto, é importante ressaltar que quanto maior a contagem de bactérias psicrotróficas do leite, menor é o rendimento do queijo prato, como foi verificado pela análise de correlação linear, uma vez que o coeficiente de correlação e o nível de significância foram de 0,546 e 0,001, respectivamente.

A queda no rendimento de queijos produzidos com leite resfriado é explicada, segundo vários autores, pela atuação de enzimas proteolíticas

provenientes das bactérias psicrotróficas, como foi constatado no presente estudo. A correlação linear entre a atividade proteolítica do leite com o rendimento dos queijos expresso em litros de leite gasto para cada quilo produzido foi significativa ($p < 0,01$), com valor de coeficiente de correlação de 0,78, ou seja, quanto maior foi a atividade proteolítica do leite, menor foi o rendimento dos queijos.

Mesmo quando foi verificado que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a atividade proteolítica do leite recém-ordenhado e a do leite inoculado com baixa contagem de psicrotróficos e armazenado por 24 horas a 4 °C (Tabela 5), verificou-se queda de rendimento do queijo prato. Gomes (1996) afirma que as proteases produzidas por bactérias psicrotróficas, mesmo em concentrações ínfimas, podem hidrolisar as proteínas do leite e, embora as proteases apresentem maior atividade a 30-45°C, elas também são significativamente ativas a 4°C (COUSIN, 1982).

Proteases produzidas por psicrotróficos no leite degradam as micelas de caseína liberando produtos solúveis, tais como polipeptídeos e aminoácidos. A hidrólise das proteínas do leite durante o armazenamento foi verificada pelo aumento significativo ($p < 0,05$) do teor de proteína solúvel do leite inoculado com baixa e alta contagem de psicrotróficos durante 72 horas de armazenamento, nas temperaturas de 4, 7 e 10 °C (Tabela 6). A proteína solúvel pode ser perdida no soro em vez de formar parte do coágulo, reduzindo o rendimento de queijos (LUCEY; 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 psicrotróficos, resultando em uma redução de até 3,5% na proteína disponível para a fabricação de queijos.

No presente estudo, com o aumento da proteólise do leite foram verificados diminuição da taxa de transição de proteína do leite para o queijo e aumento da perda de proteína no soro durante a produção do queijo prato (Tabelas 11 e 12), uma vez que, na análise de correlação linear entre a atividade proteolítica do leite, taxa de transição e de perda de proteína, foi obtido coeficiente de correlação e nível de significância de -0,587 e 0,01, e 0,534 e 0,01, respectivamente. Em consequência deste fato, foi constatada uma diminuição do teor de proteína dos queijos prato produzidos com o leite armazenado e inoculado com bactérias psicrotróficas (Tabelas 8 e 9).

A queda de rendimento dos queijos pode também ser explicada pela atuação das enzimas lipolíticas. Cromie (1992), Moura (1997) e Stofer e Hicks (1983) afirmam que o rendimento de queijos também pode ser reduzido em função da atividade de enzimas lipolíticas sobre os triacilglicerídeos com consequente liberação de ácidos graxos no soro e aumento das perdas de gorduras.

No presente estudo foi verificado um aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade lipolítica durante o armazenamento do leite e ácidos graxos livres (Tabelas 4 e 5) e correlação linear positiva entre a atividade lipolítica do leite com a perda de rendimento, uma vez que foi obtido um coeficiente de correlação de 0,812 e nível de significância de 0,01. Assim, quanto maior foi a atividade lipolítica do leite, maior foi a quantidade de litros de leite gastos para cada quilo de queijo prato produzido.

Com a atividade lipolítica, ocorre a liberação de ácidos graxos de cadeia curta no leite, os quais podem ser transferidos para o soro. Segundo Moura (1997), 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 é de cadeia curta e solúvel na fase aquosa.

Com o aumento da atividade lipolítica e a liberação de ácidos graxos de cadeia curta para o soro podem ocorrer diminuição das taxas de transição e aumento da perda de gordura. Este fato foi constatado no presente estudo, uma vez que o coeficiente de correlação linear e o nível de significância entre atividade lipolítica, taxa de transição de gordura e perda de gordura foram de -0,567 e 0,01, e 0,589 e 0,01, respectivamente.

As taxas de transição gordura na produção dos queijos prato produzidos com leite inoculado com alta e baixa contagem de bactérias psicrotóficas diminuíram significativamente ($p < 0,05$) conforme aumentaram o tempo e a temperatura de armazenamento do leite e variaram entre 76,39% e 83,98%. As perdas de gordura aumentaram ($p < 0,05$) conforme o aumento do tempo e da temperatura de armazenamento do leite e variaram de 14,01% a 23,67% (Tabela 11 e 12).

A diminuição da taxa de transição e o aumento da perda de gordura na produção dos queijos prato conforme o aumento do tempo e a temperatura de armazenamento do leite foram acompanhados do menor teor de gordura dos mesmos, conforme pode ser verificado nas Tabelas 8 e 9.

Com a queda na taxa de transição de gordura e proteína do leite para o queijo prato, houve uma diminuição significativa do valor da taxa de transição de sólidos do leite para o queijo prato, conforme o aumento do tempo e da temperatura de armazenamento do leite e a inoculação com bactérias psicrotóficas. Por conseguinte, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da perda de sólidos no soro na produção dos queijos prato (Tabela 11).

O maior valor da taxa de transição de sólidos totais verificado ocorreu na produção do queijo prato com leite recém-ordenhado, sendo os menores valores correspondentes à produção dos queijos com leite inoculado com alta e

baixa contagem de bactérias psicrotróficas, armazenados a 10 °C, por 72 horas, respectivamente (Tabelas 11 e 12). O aumento da perda de sólidos totais do leite para o soro e a diminuição da taxa de transição de sólidos totais do leite para o queijo prato foram acompanhados da diminuição dos sólidos totais dos queijos prato (Tabelas 8 e 9).

É importante ressaltar que a queda na produção com o leite apresentando baixa contagem de psicrotróficos pode também ser proveniente das alterações das suas características devido ao resfriamento. Segundo Furtado (2005), quando o leite cru é mantido sob refrigeração (3-5 °C), entre 24 e 48 horas, diversas modificações ocorrem, trazendo consequências na fabricação dos queijos. Entre elas, ocorre transferência do cálcio e do fosfato micelar para a fase aquosa do leite, as micelas de caseína tornam-se mais hidratadas, há uma tendência de as frações da caseína transferirem parcialmente da fase micelar para o soro e, com isso, a coalhada se torna menos firme, há queda no rendimento e alteração na composição do queijo.

Em uma coalhada mais frágil, as perdas no soro serão maiores. Numa coalhada frágil, mole, o papel de esponja exercido pelo para caseinato de monocalcício (caseína coagulada) é muito menor. Pode-se afirmar, então, que todos os fatores que cooperam para alterar o teor de cálcio solúvel no leite, seja para menos, seja para mais, alteram a estrutura da coalhada, alterando, por consequência, a cifra de transição dos elementos do leite para a coalhada (FURTADO; WOLFSCHONN-POMBO, 1979).

Tabela 11 Transição e perda de sólido, gordura e proteína durante a produção dos queijos prato fabricados com leite armazenado em diferentes condições e inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas

Parâmetros	Tratamento controle	Leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas									C.V. (%)
		Tratamentos									
		4 °C			7 °C			10 °C			
		24 dias	48 dias	72 dias	24 dias	48 dias	72 dias	24 dias	48 dias	72 dias	
Transição de sólidos totais (%)	47,26 ^c ± (1,55)	45,14 ^c ± (1,48)	43,6 ^b ± (1,43)	46,18 ^b ± (1,51)	43,47 ^b ± (1,43)	42,73 ^b ± (1,40)	42,14 ^b ± (1,38)	43,29 ^b ± (1,42)	43,01 ^b ± (1,41)	34,75 ^a ± (1,14)	3,28
Transição de gordura (%)	83,98 ^b ± (2,4)	84,74 ^b ± (2,42)	82,9 ^b ± (2,37)	79,37 ^a ± (2,27)	80 ^a ± (2,29)	77,1 ^a ± (2,21)	76,75 ^a ± (2,2)	80,03 ^a ± (2,29)	77,08 ^a ± (2,2)	79,92 ^a ± (2,29)	2,86
Transição de proteína (%)	71,05 ^g ± (0,5)	69,93 ^f ± (0,5)	69,96 ^f ± (0,5)	69,08 ^e ± (0,5)	58,5 ^d ± (0,42)	58,26 ^d ± (0,41)	54,52 ^b ± (0,39)	56,69 ^c ± (0,4)	54,23 ^b ± (0,4)	52,65 ^a ± (0,37)	0,71
Perda de sólidos totais (%)	53,38 ^a ± (1,32)	54,74 ^a ± (1,35)	56,39 ^b ± (1,39)	57,43 ^b ± (1,42)	56,5 ^b ± (1,4)	57,31 ^b ± (1,42)	57,55 ^b ± (1,42)	56,7 ^b ± (1,42)	57,07 ^b ± (1,41)	65,44 ^c ± (1,62)	2,47
Perda de gordura (%)	14,01 ^a ± (0,17)	15,22 ^a ± (0,18)	17,1 ^a ± (0,2)	20,62 ^b ± (0,24)	19,99 ^b ± (0,24)	22,91 ^c ± (0,27)	23,27 ^c ± (0,27)	19,97 ^b ± (0,24)	22,98 ^c ± (0,27)	20,14 ^b ± (0,24)	1,18
Perda de proteína (%)	28,91 ^a ± (0,36)	36,69 ^b ± (0,46)	37,04 ^b ± (0,47)	44,61 ^c ± (0,56)	41,47 ^c ± (0,52)	41,84 ^c ± (0,53)	45,51 ^f ± (0,57)	43,31 ^d ± (0,55)	45,82 ^f ± (0,58)	47,56 ^g ± (0,6)	1,26

Tabela 11 Transição e perda de sólido, gordura e proteína durante a produção dos queijos prato fabricados com leite armazenado em diferentes condições e inoculado com alta contagem de bactérias psicrotróficas

Parâmetros	Tratamento controle	Leite inoculado com alta contagem de bactérias psicrotróficas									C.V. (%)
		Tratamentos									
		4 °C			7 °C			10 °C			
		24 dias	48 dias	72 dias	24 dias	48 dias	72 dias	24 dias	48 dias	72 dias	
Transição de sólidos totais (%)	47,26 ^d ± (1,63)	44,37 ^c ± (1,53)	43,48 ^b ± (1,50)	42,28 ^b ± (1,45)	43,08 ^b ± (1,49)	42,23 ^b ± (1,46)	40,36 ^b ± (1,39)	41,73 ^b ± (1,44)	40,69 ^b ± (1,40)	32,15 ^a ± (1,11)	3,45
Transição de gordura (%)	83,98 ^b ± (2,45)	85,75 ^b ± (2,50)	80,03 ^a ± (2,34)	79,15 ^a ± (2,31)	79,97 ^a ± (2,34)	77,07 ^a ± (2,25)	76,42 ^a ± (2,23)	79,95 ^a ± (2,33)	77,05 ^a ± (2,25)	76,39 ^a ± (2,23)	2,92
Transição de proteína (%)	71,05 ^f ± (0,53)	70,01 ^e ± (0,52)	69,49 ^e ± (0,51)	68,96 ^e ± (0,51)	57,46 ^d ± (0,43)	55,22 ^c ± (0,41)	54,02 ^b ± (0,40)	55,56 ^c ± (0,41)	54,1 ^b ± (0,40)	52,21 ^a ± (0,39)	0,74
Perda de sólidos totais (%)	53,38 ^a ± (1,33)	55,88 ^b ± (1,39)	56,74 ^b ± (1,41)	59,21 ^c ± (1,47)	56,94 ^b ± (1,42)	57,87 ^c ± (1,44)	59,7 ^c ± (1,49)	58,28 ^c ± (1,45)	59,52 ^c ± (1,48)	68,04 ^d ± (1,69)	2,49
Perda de gordura (%)	14,01 ^a ± (0,14)	14,25 ^a ± (0,15)	19,97 ^b ± (0,21)	20,84 ^b ± (0,21)	20,02 ^b ± (0,21)	22,97 ^c ± (0,24)	23,6 ^c ± (0,24)	20,04 ^b ± (0,21)	23,03 ^c ± (0,24)	23,67 ^c ± (0,24)	1,03
Perda de proteína (%)	28,91 ^a ± (0,35)	36,83 ^b ± (0,45)	41,6 ^c ± (0,51)	46,63 ^f ± (0,57)	43,45 ^d ± (0,53)	44,86 ^e ± (0,55)	45,85 ^f ± (0,56)	44,45 ^e ± (0,54)	46,27 ^f ± (0,46)	47,74 ^g ± (0,58)	1,22

4 CONCLUSÃO

O crescimento de bactérias psicrotróficas no leite cru, inoculado com baixa e alta contagem das mesmas, durante a estocagem a 4°C, 7°C e 10°C, por até 72 horas, promove alterações na qualidade do leite, a qual influencia substancialmente a composição e o rendimento do queijo prato.

A maior influência verificada foi pela atividade proteolítica e lipolítica no leite após armazenamento sob refrigeração, mesmo quando apresentou baixas contagens de bactérias psicrotróficas e foi armazenado a 4 °C, por 24 horas. Ocorre alteração durante a produção dos queijos devido à alteração no tempo de coagulação do leite, à alteração das características físico-químicas e à queda significativa do rendimento. Sendo assim, é importante não só o controle da contagem de bactérias psicrotróficas, mas também o controle do tempo e da temperatura de armazenamento do leite, uma vez que a indústria pode enfrentar alterações na qualidade do queijo prato e prejuízos com a queda de rendimento de sua fabricação.

REFERÊNCIAS

ALI, A. E.; ANDREWS, A. T.; CHEESEMAN, G. C. Influence of storage of milk on casein distribution between the micellar and soluble phases and its relationship to cheese-making parameters. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 47, n. 3, p. 371-382, 1980.

AMORIM, H. E. **Influência do tempo de estocagem de leite cru refrigerado sobre a presença de CMP (Caseinomacropéptido)**. 2007. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. (Ed.). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Templo, 2003. p. 105-115.

ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, nov. 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official method of analysis**. 18th ed. Washington, 2005. 82 p.

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

BANKS, J. The quality of milk in relation to cheese manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 43, n. 2, p. 35-39, 1990.

BANKS, J. M. et al. 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**, London, v. 5, n. 1, p. 9-16, 1988.

BARBOSA, J. B. et al. Avaliação de rendimento da produção dos queijos Minas Frescal, Minas Padrão e Mussarela fabricados com leite inoculado com *Pseudomonas fluorescens*. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v. 64, n. 371, p. 27-34, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6-11.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 68**, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

BYNUM, D. G.; BARBANO, D. M. Whole milk reverse osmosis retentates for Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 1, p. 1-10, Jan. 1985.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 2006. 57 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Werribee, v. 51, n. 2, p. 59-63, 1996.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.

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

COUSIN, M. A.; MARTH, E. H. Cheddar cheese made from milk that was precultured with psychotrophic bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, 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**, Gravesend, v. 42, p. 12-17, 1977.

CROMIE, R. Psychrotrophics and their enzyme residues in cheese milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 47, n. 2, p. 96-100, 1992.

CUNHA, L. T.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Determinação das condições físicoquímicas e microbiológicas de leite B cru refrigerado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15., 1996, Poços de Caldas. **Resumos...** Lavras: UFLA, 1996. p. 73.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk: a review. **Food and Bioproducts Processing**, Davis, v. 79, n. 4, p. 197-210, 2001.

DOWNEY, W. K. Review of the progress of dairy science: flavor impairment from pre and post manufacture lipolysis in milk and dairy products. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 47, n. 2, p. 237-252, June 1980.

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

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

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

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

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Fabricação de queijo Prato e Minas: estudo do rendimento, parte 1, determinação das cifras de transição. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 34, n. 205, p. 3-9, set./out. 1979.

GOBETTI, M.; ROSSI, J. Peptidases pro files of *Pseudomonas fluorescens* identificacion and properties. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 75, n. 4, p. 924-934, Apr. 1992.

GOMES, M. I. F. V. **Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana**. 1988. 85 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1988.

GOMES, M. I. F. V. **Contribuição ao estudo da atividade proteolítica residual sobre a estabilidade protéica do leite esterilizado "Longa-vida"**. 1996. 108 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

HICKS, C. L. et al. Effect of milk quality and low temperature storage on cheese yield: a summation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 69, n. 3, p. 649-657, 1986.

HICKS, C. L. et al. Psychrotrophic bacteria reduce cheese yield. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, n. 4, p. 331-334, 1982.

KOSIKOWSKI, F. V. **Cheese and fermented milk foods**. 3rd ed. Ann Arbor: E. Bros, 1982. 620 p.

LUCEY, J.; KELLY, J. Cheese yield. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 47, n. 1, p. 1-14, 1994.

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

MOURA, C. J. et al. Lipólise e avaliação sensorial em queijo tipo parmesão fabricado com leite resfriado e inoculado com pseudomonas fluorescens. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 308, p. 3-8, 1999.

NELSON, P. J.; MARSHALL, R. T. Microbial proteolysis sometimes decreases yield of cheese curd. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 60, p. 35-36, 1977.

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

PRATA, L. F. **Fundamentos de ciência do leite**. São Paulo: UNESP; FUNEP, 2001. 287 p.

R DEVELOPMENTS CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: Foundation for Statistical Computing, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

RAMOS, T. de M. **Tipos de pasteurização e agentes coagulantes na fabricação do queijo tipo prato**. 2013. 232 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. da. Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2003.

SANVIDO, G. B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de esticagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira**. 2007. 94 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e geleificação**. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SILVEIRA, P. R.; ABREU, L. R. Rendimento e composição físico química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção íreta de vapor. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1340-1347, nov./dez. 2003.

SPADOTI, L. M.; DORNELAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Evaluation of the melting of prato cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. **Le Lait**, Les Ulis, v. 83, n. 5, p. 397-408, 2003.

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

VIDAL-MARTINS, A. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; REZENDE-LAGO, N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 396-400, 2005.

VIDIGAL, G. J. P. **Tempo de refrigeração do leite sobre a microbiota psicrotrófica e rendimento do queijo Minas Frescal**. 2012. 39 p. Dissertação

(Mestrado Profissional em Sistemas de Produção na Agropecuária) -
Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2012.

WOLFSCHOOM-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, v. 41, n. 244, p. 8-12, mar./abr. 1986.

YAN, L.; LANGLOIS, B. E.; O'LEARY, J. Effect of storage conditions of
grade A raw milk on proteolysis and cheese yield. **Milchwissenschaft**,
Munchen, 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**, Ottawa, v. 10, p. 269-271, 1977.

CAPÍTULO 4

EFEITO DAS CONDIÇÕES DO ARMAZENAMENTO DO LEITE E DA CONTAGEM DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS NA MATURAÇÃO DO QUEIJO PRATO

RESUMO

O armazenamento do leite sob refrigeração e o conseqüente crescimento das bactérias psicrotróficas e atuação de suas enzimas podem trazer alterações nas características do leite e do queijo, principalmente durante a maturação. Neste contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do armazenamento do leite e da contagem de bactérias psicrotróficas nas características e nas modificações do queijo prato, durante a maturação. Para tanto, foram realizadas inoculações no leite com alta e baixa contagem de bactérias psicrotróficas, o qual foi armazenado nas temperaturas de 4°C, 7°C e 10°C, por 24, 48 e 72 horas. O leite foi analisado em cada intervalo de tempo nas respectivas temperaturas. Os queijos prato produzidos com este leite foram submetidos à maturação, por 60 dias e analisados durante este período. Ocorreu alteração na qualidade do leite e, em consequência, uma variação da composição dos queijos e maiores alterações durante a maturação dos mesmos. Os queijos produzidos com leite inoculado com alta e baixa contagem de bactérias psicrotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas apresentaram, durante a maturação, maiores índices proteolíticos, devido à maior umidade, ao maior teor de ácidos graxos livres pela ação das enzimas lipolíticas, ao aumento do pH devido à proteólise e à alteração na cor. Essas alterações podem influenciar de forma negativa a aceitação pelo consumidor, uma vez que se obtiveram queijos com características diferentes das do queijo prato produzido com leite recém-ordenhado. Portanto, faz-se necessário verificar a aceitação destes queijos para constatar até que ponto o armazenamento e a contagem de bactérias psicrotróficas do leite podem influenciar.

Palavras-chave: Refrigeração do leite. Qualidade do queijo Prato. Proteólise. Lipólise. Textura.

ABSTRACT

The storage of milk under refrigeration and the consequent growth of psychrotrophic bacteria and acting of their enzymes can bring alterations in the characteristics of milk and cheese, mainly due to ripening. In this context, this work was conducted with the purpose of evaluating the effect of milk storage and of the count of psychrotrophic bacteria and in the modifications of prato cheese during ripening. For this purpose, inoculation in milk with high and low count of psychrotrophic bacteria, which was stored at the temperatures of 4°C, 7°C and 10°C for 24, 48 and 72hours. The milk was analyzed at each time interval at the respective temperatures. The prato cheeses produced from this milk were submitted to ripening for 60 days and analyzed during this period. Alteration occurred in the milk quality and, therefore, the variation of the composition of the cheeses and greater alterations during the ripening of them. The cheeses produced from milk inoculated with high and low count of psychrotrophic bacteria and stored at different times and temperatures presented during ripening, higher proteolytic indices due to the increased moisture, higher free fatty acid content by the action of lipolytic enzymes, to the rise of pH due to proteolysis and to the alteration in the color. Those alterations can influence in a negative manner the acceptance by the consumer, since cheeses with characteristics different from those of the prato cheese produced with freshly milked milk were obtained. Therefore, it becomes necessary to verify the acceptance of these cheeses to find to what extent storage and count of milk psychrotrophic bacteria can influence.

Keywords: Milk refrigeration. Prato cheese quality. Proteolysis. Lipolysis. texture.

1 INTRODUÇÃO

Entre os diversos tipos de queijos fabricados no Brasil, o prato destaca-se como um dos mais importantes. Segundo a legislação, este tipo é definido como um queijo maturado, obtido por coagulação enzimática do leite, complementada pela ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo gordo, de média umidade e de massa semicozida. O produto deve apresentar consistência elástica, textura macia e compacta, podendo apresentar pequenas olhaduras bem distribuídas. Além disso, deve ser maturado por, no mínimo, 25 dias (BRASIL, 1997).

Dada a importância do queijo prato no mercado brasileiro, diversas pesquisas têm sido realizadas com os objetivos de monitorar o desenvolvimento de proteólise (BALDINI, 1998), avaliar o efeito de diferentes agentes coagulantes, tratamentos térmicos do leite sobre o rendimento, a maturação e as características sensoriais e físico-químicas (AUGUSTO, 2003; RAMOS, 2013; SILVEIRA; ABREU, 2003), acelerar o processo de maturação (GARCIA, 2007; MINUSSI; FURTADO; MOSQUIM, 1995; SCHULZ, 2003; SILVA, 1998), caracterizar a sua microbiota (VALLE et al., 1992), avaliar o efeito da contagem de células somáticas do leite sobre a sua microbiota de maturação e características sensoriais (VIANNA, 2006), avaliar a sua fase aquosa e o efeito independente do pH sobre suas características (AUGUSTO, 2006) e adaptar novas tecnologias para a sua fabricação (DORNELLAS, 2003; NARIMATSO et al., 2003; RIBEIRO, 1996; SPADOTI; DORNELAS; ROIG, 2003), dentre outros. Apesar disso, não se conhece o efeito do armazenamento do leite e da contagem de bactérias psicrotóxicas nas características e nas modificações do queijo prato durante a maturação.

De acordo com Brasil (1997), o queijo prato deve ser maturado por, no mínimo, 25 dias. Entretanto, segundo Minussi, Furtado e Mosquim (1995) e

Perry (2004), antes de ser consumido, ele deve ser maturado por um período entre 45 e 60 dias, para adquirir suas melhores características, as quais são o resultado de uma série de eventos que ocorrem durante a maturação. Este período é considerado muito longo e muitas indústrias não submetem o produto a tal tratamento. Algumas por não disporem de estrutura física e outras por razões econômicas.

Vários fatores influenciam na maturação dos queijos, como a qualidade do leite, bem como a presença de bactérias psicotróficas, devido à produção de enzimas termorresistentes, irá influenciar na maturação dos queijos de forma direta ou indireta.

Nesse contexto, este trabalho foi realizado o objetivo de avaliar o efeito do armazenamento do leite e da contagem de bactérias psicotróficas nas características e nas modificações do queijo prato, durante a maturação.

2 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi desenvolvido nas instalações da planta piloto, no Laboratório de Análises Físico-Químicas de Leite e Produtos Lácteos do Setor de Laticínios, e no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, localizados no Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

2.1 Tratamentos e preparo do leite

Em três ocasiões diferentes, compondo, assim, três repetições do experimento como as outras etapas subsequentes, foi coletado leite recém-ordenhado, o qual foi submetido ao processo de termização a 65°C/15s, em um trocador de calor em placas, com o objetivo de destruir as bactérias psicrotóficas presentes. Após o processo de termização, realizou-se teste fosfatase e peroxidase para verificar se o perfil enzimático do leite termizado correspondia ao do leite cru, segundo técnicas descritas por Brasil (2006). Todos os leites apresentaram atividade da fosfatase e peroxidase positiva.

Posteriormente, o leite foi inoculado com 2,78 log UFC.mL⁻¹ e 5,78 log UFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas fluorescens*, devido à importância da contagem inicial de bactérias psicrotóficas e das diferentes contagens já encontradas no leite em trabalho anteriores (ARCURI et al., 2008; CUNHA; CARVALHO; ABREU, 1996; PINTO; MARTINS, VANETTI, 2006; SILVA, 2003). No presente estudo, o leite inoculado com 2,78 log UFC.mL⁻¹ foi considerado com baixa contagem inicial de psicrotóxicos e o leite inoculado com 5,78 log UFC.mL⁻¹ foi considerado com alta contagem inicial de psicrotóxicos.

A cultura de *Pseudomonas fluorescens* NCTC 10038 utilizada para a inoculação foi adquirida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em

Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, na forma liofilizada. Foi realizada a reidratação do liofilizado em caldo nutritivo e incubação por 48 horas, à temperatura de 28°C, sendo repicada a cada 48 horas, para a manutenção de sua atividade, segundo recomendação de Gobetti e Rossi (1992). A determinação da concentração de células de *Pseudomonas fluorescens* presentes no caldo nutritivo foi feita por contagem em placas, utilizando, como meio de cultura, o ágar padrão (PCA), incubado por 48 horas, à temperatura de 28°C (GOBBETTI; ROSSI, 1992), para posterior inoculação.

O leite inoculado com duas contagens de bactérias psicrotróficas foi dividido em volumes iguais e armazenado em recipientes plásticos previamente esterilizados, em diferentes temperaturas (4°C, 7°C e 10 °C) e tempos (0, 24, 48 e 72 horas). Essas temperaturas de armazenamento foram determinadas com base na Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2011), que estabelece que a temperatura máxima de conservação o leite cru refrigerado é de 7°C, na propriedade rural/tanque comunitário e de 10°C, no estabelecimento processador. Em se tratando de tanque de refrigeração por expansão direta, deve ser dimensionado de modo que permita refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 4°C no tempo máximo de 3 horas após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade; em se tratando de tanque de refrigeração por imersão, deve ser dimensionado de modo que permita refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 7°C no tempo máximo de 3 horas após o término da ordenha, independentemente de sua capacidade.

Para os tempos de armazenamento, a Instrução Normativa nº62 (BRASIL, 2011) estabelece que o tempo transcorrido entre a ordenha inicial e o seu recebimento no estabelecimento que vai beneficiá-lo (pasteurização, esterilização, etc.) deve ser de, no máximo, 48 horas, recomendando-se como ideal um período de tempo não superior às 24 horas. Entretanto, na indústria beneficiadora, pode ser armazenado por período superior a 48 horas.

2.2 Análises do leite

As amostras de leite foram coletadas em frascos previamente esterilizados e imediatamente submetidos às análises microbiológicas, enzimáticas e físico-químicas.

2.2.1 Análises microbiológicas

Foram realizadas análises microbiológicas para a contagem de bactérias mesofílicas viáveis, após a incubação, a 32°C, por 48 horas e para a contagem de bactérias psicotróficas, após incubação a 7°C, por 10 dias (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992), do leite recém-ordenhado para verificar sua qualidade microbiológica.

O leite termizado foi submetido à análise de contagem de bactérias psicotróficas para verificar a eficiência da destruição desses microrganismos, segundo a mesma metodologia. Para acompanhar o crescimento das bactérias psicotróficas no leite armazenado sob diferentes tempos e temperaturas, foi realizada análise de contagem de bactérias psicotróficas, segundo a mesma metodologia.

2.2.2 Análises físico-químicas

Com o objetivo de verificar possíveis alterações durante o armazenamento, foram realizadas as seguintes análises do leite recém-ordenhado e o leite inoculado com bactérias psicotróficas armazenado em diferentes temperaturas (4°C, 7°C e 10°C) e tempos (0, 24, 48 e 72 horas): análise de gordura pelo método butirométrico de Gerber; densidade a 15°C, acidez titulável, extrato seco total, extrato seco desengordurado (ASSOCIATION OF

OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 2005), teste de estabilidade a 72% v/v, índice crioscópico (BRASIL, 2006), determinação dos ácidos graxos livres (WOLFSCHOON-POMBO; CARVALHO; FISCHER, 1986), nitrogênio total do leite pelo método de micro Kjeldahl (AOAC, 2005), nitrogênio solúvel em tampão de acetato a pH 4,6 e nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (TCA) 12% (v/v) de acordo com Bynum e Barbano (1985), seguido por Micro Kjeldahl, conforme AOAC (2005). O fator utilizado para a conversão dos teores de nitrogênio para proteína foi de 6,38.

2.2.3 Análises enzimáticas

O leite recém-ordenhado e o leite inoculado com bactérias psicotróficas armazenado em diferentes temperaturas (4 °C, 7 °C e 10 °C) e tempos (24, 48 e 72 horas) foram submetidos às análises de atividade proteolítica pela técnica descrita por Bendicho et al. (2002), com modificações segundo Cardoso (2006) e atividade lipolítica pelo método descrito por Rajmohan, Dodd e Waites (2002), com modificações segundo Cardoso (2006).

2.3 Fabricação dos queijos prato

Após o armazenamento do leite, foi conduzida a fabricação dos queijos prato com 40L de leite para cada tratamento, em tanques de fabricação de queijo com capacidade de 50L. Os processos de fabricação foram idênticos para cada tratamento e repetição, e a tecnologia utilizada foi segundo Furtado e Lourenço Neto (1994).

No tanque de fabricação, o leite foi pasteurizado a 65°C/30min e, posteriormente, realizou-se teste fosfatase e peroxidase para verificar a

eficiência da mesma, segundo técnicas descritas por Brasil (2006). Todos os leites apresentaram atividade da fosfatase negativa e peroxidase positiva.

O leite pasteurizado foi resfriado a 35 °C e adicionado de fermento láctico mesofílico composto por *Lactococcus lactis* sp. *lactis* e *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* (1% (v/v) (Lyofast MOS 0,62®, Sacco). Procedeu-se à pré-fermentação por 30 minutos.

Posteriormente, foram adicionados cloreto de cálcio (0,4 mL.L⁻¹ de solução a 50%), corante à base de urucum (0,8 mL.L⁻¹) e coalho bovino (Abomasum®, Sacco), em quantidade suficiente para que ocorresse a coagulação no tempo de 40 minutos, a 35 °C, para todos os tratamentos. Após a coagulação, o gel foi cortado em cubos de cerca de 0,5 cm de aresta, os quais permaneceram em repouso por 5 minutos. Em seguida, a mistura soro/coágulo foi agitada por 20 minutos, com aumento gradativo da velocidade de agitação. Foi realizada a primeira dessoragem, com a retirada de 30% do soro e adicionada água a 80 °C, aumentando-se a temperatura da mistura soro/coágulo em 1 °C a cada 3 minutos, até atingir 42 °C. Prosseguiu-se com agitação por, aproximadamente, 45 minutos até o ponto da massa.

Atingido o ponto da massa, foram realizadas a dessoragem e a pré-prensagem, por 30 minutos, com presença de soro e enformagem em formas retangulares de 0,5 kg, que foram encaminhadas para a prensagem. A prensagem foi realizada da seguinte forma: 1ª prensagem – 9 kg, durante 30 minutos; 2ª prensagem – 12 kg, por 30 minutos; 3ª prensagem – 15 kg, por 2 horas e 4ª prensagem – 15 kg, por 2 horas.

Após a prensagem, os queijos foram salgados por imersão em salmoura 20%, durante 12 horas e secos, por 24 horas, a 12 °C. Depois de secos, os queijos foram embalados a vácuo em plástico termoencolhível ematurados, a 12 °C, durante 60 dias.

2.4 Análises dos queijos

Após um dia de fabricação, amostras de queijos prato de cada tratamento foram submetidas às análises de umidade pelo método gravimétrico e calculadas por diferença (100% - porcentagem de extrato seco total); de proteína total pelo método micro Kjeldahl, na qual foi utilizando o fator 6,38 para estimativa do teor de proteína total; do teor de cinzas; do pH com o auxílio de um potenciômetro da marca Tecnal (modelo Tec-3MP) previamente calibrado; do teor de gordura pelo método butirométrico de Gerber (AOAC, 2005) e do teor de sal pelo método de Volhard modificado, descrito por Kosikowski (1982). Os teores de gordura no extrato seco (GES) foram calculados dividindo-se os teores de gordura do queijo pelo seu teor de extrato seco total. Os teores de sal na umidade dos queijos foram determinados pela fórmula: $\text{sal/umidade (\%)} = (\text{sal/sal} + \text{umidade}) \times 100$.

Para o acompanhamento das características do queijo prato durante a maturação foram coletadas amostras dos queijos após um dia da fabricação e após 15, 30, 45 e 60 dias. Para a constituição de uma amostra representativa, três queijos de cada fabricação foram randomicamente escolhidos, triturados e homogeneizados, para serem utilizados nas determinações analíticas. Para análise de textura e cor foram retiradas amostras antes da trituração dos queijos.

Os queijos durante a maturação foram submetidos às seguintes análises:

- a) pH, com o auxílio de um potenciômetro da marca Tecnal (modelo Tec-3MP), previamente calibrado;
- b) teor de ácidos graxos livres, conforme descrito por Caboni, Zannoni e Lercker (1990);
- c) proteólise, avaliada por meio da determinação dos teores de nitrogênio solúvel, em tampão de acetato a pH 4,6 e em ácido tricloroacético (TCA) 12%, de acordo com Bynum e Barbano

(1985), seguido por Micro Kjeldahl, conforme descrito por Brasil (2006). Os índices de extensão e profundidade de proteólise foram calculados, respectivamente, pelas seguintes fórmulas: $IEP = (NS \text{ pH}4,6/NT) \times 100$ e $IPP = (NS \text{ TCA } 12\%/NT) \times 100$. Para tanto, foi determinado também o teor de nitrogênio total pelo método micro Kjeldahl (AOAC, 2005);

- d) cor dos queijos, avaliada pelo sistema CIE $L^* a^* b^*$, em que L^* representa o índice de luminosidade em uma escala de 0 (preto) a 100 (branco); a^* (+), o teor de vermelho e o a^* (-), o teor de verde e b^* (+), o teor de amarelo e o b^* (-), o teor de azul. As medidas de cores foram tomadas com a utilização de um colorímetro (Minolta Chroma Meter, M CR-300b) calibrado para um padrão branco em ladrilho (AOAC, 2005). As leituras foram realizadas em seis pontos distintos;
- e) perfil de textura dos queijos, avaliado utilizando-se o texturômetro Stable Micro Systems® Modelo TA-XT2i (Goldaming, England). As amostras de queijo foram cortadas em formato cilíndrico, com 2,5 cm de diâmetro e 2,0 cm de altura. Foi realizada nas seguintes condições: velocidade de pré-teste de 1,0 mm.s⁻¹, velocidade de teste de 1,0 mm.s⁻¹ e velocidade de pós-teste de 1,0 mm.s⁻¹, com distância de compressão de 20,0 mm, por uma sonda cilíndrica de alumínio de 6,0 mm, como descrito por Ramos (2013). Os parâmetros analisados foram firmeza, adesividade, elasticidade, coesividade e gomosidade.

2.5 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O delineamento experimental utilizado neste experimento foi um fatorial 2x3x4 inteiramente casualizado, sendo duas contagens de bactérias psicrotróficas na inoculação do leite, três temperaturas de armazenamento (4°C, 7°C e 10°C) e quatro tempos de armazenamento (0, 24, 48 e 72horas), com três repetições (três coletas e inoculações), com parcela subdividida nos tempos com 3 repetições, divididos em 5 subparcelas, de acordo com o tempo de maturação dos queijos. O queijo produzido com leite recém-ordenhado, ou seja, no tempo 0h de armazenamento, foi considerado o controle.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando-se um nível de significância $p > 0,05$. O teste de Scott-Knott foi utilizado para verificar quais tratamentos diferiam entre si, quando a ANOVA indicou existir diferença significativa.

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Matéria-prima para a fabricação de queijos

3.1.1 Composição físico-química

A composição físico-química média do leite recém-ordenhado pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1 Valores médios de composição físico-química do leite cru, antes do armazenamento

Parâmetros	
Densidade relativa a 15°C	1,031 g.mL ⁻¹
Acidez	0,14 g de ácido láctico.100mL ⁻¹
Gordura	3,16g.100g ⁻¹
Extrato seco total	11,85 g.100g ⁻¹
Extrato seco desengordurado	8,69 g.100g ⁻¹
Estabilidade ao alizarol 72 % (v/v)	Estável
Proteína Total	3,41 g.100g ⁻¹
Índice Crioscópico	540°H

Os resultados de densidade relativa a 15°C, acidez, gordura, proteína total, índice crioscópico e extrato seco desengordurado estão em conformidade com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado (BRASIL, 2011). O leite apresentou-se estável ao alizarol 72 % (v/v).

Foi verificado que, após armazenamento, não houve alteração dos valores encontrados para o leite cru e para o leite armazenado, em todos os tratamentos, em relação à densidade relativa a 15°C, gordura, proteína total,

índice crioscópico e extrato seco desengordurado, estabilidade. Entretanto, o leite armazenado a 10°C apresentou elevação da acidez de 0,14g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite de ácido láctico para 0,16g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite. Mesmo assim, o leite ainda está de acordo com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o qual exige que a acidez do leite deve estar entre 0,14 e 0,18g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite (BRASIL, 2011).

Esse aumento da acidez durante o armazenamento sob resfriamento também foi reportado por Sanvido (2007). Ao armazenar o leite a 5°C, por 4 dias, este autor verificou um aumento da acidez de 0,156g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite para 0,16g de ácido láctico.100mL⁻¹ de leite.

3.1.2 Microbiologia

O leite recém-ordenhado apresentou contagem de mesófilos de 3,5 log UFC.mL⁻¹ e de psicrotrófico de 0,6 log UFC.mL⁻¹. Após a termização, a contagem de mesófilos foi de 2,9 log UFC.mL⁻¹ e de psicrotrófico de 0 log UFC.mL⁻¹, o que indica a eficiência do processo de termização no controle da contagem de bactérias psicrotróficas.

Na Tabela 2 pode ser observada a contagem de bactérias psicrotróficas do leite inoculado com baixa e alta contagem dessas bactérias, após armazenamento a 4°C, 7°C e 10°C, por 0, 24, 48 e 72 horas.

Tabela 2 Contagem média de bactérias psicrotróficas (log UFC.mL⁻¹) no leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicrotróficos			
Tempo de armazenamento	Temperatura de armazenamento		
(horas)	4°C	7°C	10°C
0	2,78 ^{aA}	2,78 ^{aA}	2,78 ^{aA}
24	2,79 ^{bA}	2,98 ^{bB}	3,29 ^{bC}
48	2,84 ^{cA}	3,34 ^{cB}	3,37 ^{cC}
72	2,99 ^{dA}	3,46 ^{dB}	4,59 ^{dC}
Leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos			
Tempo de armazenamento	Temperatura de armazenamento		
(horas)	4°C	7°C	10°C
0	5,78 ^{aA}	5,78 ^{aA}	5,78 ^{aA}
24	6,04 ^{bA}	6,31 ^{bB}	6,34 ^{bC}
48	6,61 ^{cA}	6,84 ^{cA}	7,44 ^{cB}
72	6,87 ^{dA}	6,99 ^{dB}	8,78 ^{dC}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$), do leite inoculado com 2,78 log UFC.mL⁻¹ e 5,78 log UFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas fluorescens*

Como pode ser observado na Tabela 2, o leite inoculado com 2,78 log UFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas fluorescens* apresentou contagem de psicrotróficos no final do tempo de armazenamento de 2,99 log UFC.mL⁻¹, 3,46 log UFC.mL⁻¹, 3,46 log UFC.mL⁻¹ e 4,49 log UFC.mL⁻¹, nas temperaturas de armazenamento de 4, 7 e 10 °C, respectivamente. Em relação ao leite inoculado com 5,78 log UFC.mL⁻¹ de *Pseudomonas fluorescens*, ao final do armazenamento de 72 horas, o mesmo apresentou contagem de bactérias psicrotróficas de 6,87 log UFC.mL⁻¹, 6,99 log UFC.mL⁻¹ e 8,78 log UFC.mL⁻¹, nas temperaturas de armazenamento de 4 °C, 7 °C e 10 °C, respectivamente.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) da contagem de bactérias psicrotróficas entre os tempos de armazenamento (0, 24, 48 e 72 horas) tanto do leite inoculado com baixa contagem, quanto no leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos, independentemente da temperatura, tendo a contagem de microrganismos psicrotróficos sido crescente na medida em que se

aumentava o tempo de estocagem. Comparando-se a contagem de psicrotróficos no mesmo tempo e em diferentes temperaturas, pode-se observar que a mesma influenciou de forma significativa ($p < 0,05$).

É importante ressaltar que, além do tempo e da temperatura de armazenamento, uma contagem inicial baixa de psicrotróficos no leite é de fundamental importância para garantir sua qualidade e um menor crescimento desses durante o armazenamento, como foi verificado no presente estudo. Isto porque, após 72 horas de armazenamento a 10°C, o leite com contaminação inicial de 2,78 log UFC.mL⁻¹ apresentou um aumento da população de psicrotróficos equivalente a, aproximadamente, dois ciclos logarítmicos, enquanto o leite com contaminação inicial de 5,78 log UFC.mL⁻¹ e armazenado nas mesmas condições apresentou aumento de três ciclos logarítmicos.

As contagens de psicrotróficos apresentadas pelo leite inoculado com alta e baixa contagem de psicrotróficos, após armazenamento por 72 horas, nas temperaturas de 4°C, 7°C e a 10°C, podem trazer algumas alterações indesejáveis e comprometer a sua utilização na fabricação dos produtos derivados.

3.1.3 Concentração de ácidos graxos livres e atividade lipolítica

Na Tabela 3 pode ser observada a atividade lipolítica do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotróficas, após armazenamento a 4°C, 7°C e 10°C, por 0, 24, 48 e 72 horas.

Tabela 3 Atividade lipolítica (unidades de enzimas lipolíticas) no leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento	Temperatura de armazenamento		
(horas)	4°C	7°C	10°C
0	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}
24	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}	16,69 ^{bB}
48	16,57 ^{bA}	16,73 ^{bA}	16,93 ^{bA}
72	16,89 ^{cA}	16,98 ^{bA}	17,09 ^{bA}
Leite inoculado com alta contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento	Temperatura de armazenamento		
(horas)	4°C	7°C	10°C
0	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}	16,17 ^{aA}
24	16,37 ^{aA}	16,98 ^{bA}	17,00 ^{aA}
48	16,75 ^{bA}	17,65 ^{cA}	18,21 ^{bA}
72	17,00 ^{bA}	18,02 ^{dB}	18,94 ^{bC}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula na coluna, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$)

O leite apresentou uma atividade lipolítica inicial de 16,17, em unidades de enzimas lipolíticas. Resultados semelhantes foram encontrados por Cardoso (2006). O leite analisado por este autor apresentou 16,09 unidades de enzimas lipolíticas, e ele atribuiu este valor à atividade enzimática pela presença de lipases naturais no leite, as quais segundo Chen, Daniel e Coolbear (2003), têm a propriedade de hidrolisar triglicérides, constituintes da gordura, em ácidos graxos de cadeia curta, incluindo os ácidos butírico, caproico, caprílico e cáprico, principais responsáveis pelo aparecimento de odores desagradáveis no leite. Entretanto, durante o armazenamento, ocorreu aumento significativo ($p < 0,05$), dependendo do tempo e da temperatura de armazenamento (Tabela 3).

A atividade lipolítica pode ter sido influenciada pela contagem de bactérias psicotróficas, uma vez que, quando o leite apresentou maior contagem de psicotróficos, apresentou, conseqüentemente, maiores valores de atividade lipolítica. Isso foi confirmando estatisticamente pelo teste de correlação linear,

uma vez que os valores do coeficiente de correlação e o nível de significância entre a contagem de psicotróficos e a atividade lipolítica do leite foram de 0,640 e 0,001, respectivamente. Isso indica que existe correlação linear positiva ($p < 0,01$) e, assim, quanto maior a contagem de bactérias psicotróficas no leite, maior é a atividade lipolítica do mesmo.

Durante a estocagem de amostras de leite cru sob refrigeração, Celestino, Iyer e Roginski (1996) observaram o aumento do número de bactérias psicotróficas com atividades proteolíticas e lipolíticas, tendo a lipólise sido constatada pelo aumento do conteúdo de ácidos graxos livres.

Na Tabela 4 pode ser observada a concentração de ácidos graxos do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas após armazenamento a 4 °C, 7 °C e 10 °C, por 0, 24, 48 e 72 horas.

Tabela 4 Concentração de ácidos graxos ($\text{mmol} \cdot 100\text{g}^{-1}$) no leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos.

Leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento		
	4°C	7°C	10°C
0	1,32 ^{aA}	1,32 ^{aA}	1,32 ^{aA}
24	1,69 ^{bA}	3,03 ^{bB}	2,97 ^{bB}
48	1,76 ^{bA}	3,13 ^{bB}	3,06 ^{bB}
72	1,82 ^{bA}	5,44 ^{cB}	4,18 ^{cC}
Leite inoculado com alta contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento		
	4°C	7°C	10°C
0	1,32 ^{aA}	1,32 ^{aA}	1,32 ^{aA}
24	1,87 ^{bA}	3,16 ^{bB}	5,03 ^{bC}
48	1,98 ^{bA}	4,23 ^{cB}	5,29 ^{bC}
72	2,40 ^{cA}	4,70 ^{dA}	5,89 ^{bB}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula na coluna, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$)

A concentração inicial de ácidos graxos livres no leite foi de 1,32 mmol.100g⁻¹, que é superior ao encontrado por Moura et al. (1999b), ao analisarem leite pasteurizado; por Wolfschoon-Pombo, Carvalho e Fischer (1986), quando analisaram leites cru de plataforma e por Gomes (1988), analisando leite pasteurizado.

Após armazenamento de 72 horas em diferentes temperaturas ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) (Tabela 4), com valor máximo de 5,89 mmol.100g⁻¹ no leite inoculado com alta contagem de psicrotóxicos e armazenado por 72 horas, a 10 °C. Outros autores também verificaram um aumento na concentração de ácidos graxos durante o armazenamento do leite sob refrigeração (DOWNEY, 1980; MOURA et al., 1999a).

Comparando-se a concentração de ácidos graxos nas diferentes temperaturas no mesmo tempo, pode-se observar que houve diferença significativa entre a concentração de ácidos graxos do leite armazenado a 4 °C e a 10 °C, para os tempos de 24, 48 e 72 horas de armazenamento. Assim, tanto o tempo de armazenamento quanto a temperatura influenciaram de forma significativa ($p < 0,05$) a concentração de ácidos graxos do leite inoculado com alta e baixa contagem de psicrotóxicos, ao longo do armazenamento.

3.1.4 Frações de proteínas e atividade proteolítica

Outro fator que influencia a qualidade do leite e dos produtos lácteos é a ação de proteases, as quais, dentre as enzimas extracelulares produzidas por muitas bactérias psicrotóxicas, são as mais importantes em relação à deterioração de leite, juntamente com as lipases (ARCURI, 2003). Na Tabela 5 está representada a atividade proteolítica do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotóxicas e armazenado em diferentes tempos e temperaturas.

Tabela 5 Atividade proteolítica (unidades de enzimas proteolíticas) do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento	Temperatura de armazenamento		
(horas)	4°C	7°C	10°C
0	1,96 ^{aA}	1,96 ^{aA}	1,96 ^{aA}
24	1,96 ^{aA}	2,77 ^{aA}	1,96 ^{bA}
48	2,06 ^{bA}	3,86 ^{aA}	3,28 ^{bA}
72	2,33 ^{cA}	5,06 ^{bB}	3,35 ^{cB}
Leite inoculado com alta contagem de psicotróficos			
Tempo de armazenamento	Temperatura de armazenamento		
(horas)	4°C	7°C	10°C
0	1,96 ^{aA}	1,96 ^{aA}	1,96 ^{aA}
24	2,12 ^{aA}	2,77 ^{aA}	3,49 ^{bA}
48	2,79 ^{bA}	3,09 ^{aA}	3,95 ^{bA}
72	3,61 ^{cA}	6,43 ^{bB}	7,60 ^{cB}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula na coluna, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$)

A atividade proteolítica inicial do leite foi de 1,96 unidades de enzimas, a qual está relacionada com as proteases naturais do leite. Entretanto, foi verificado um aumento significativo da atividade proteolítica ($p < 0,05$), mesmo quando o leite apresentou contagem de $2,99 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, após 72 horas de armazenamento a 4 °C.

A κ -caseína é a mais susceptível ao ataque das proteases dos microrganismos, em especial por enzimas produzidas por *Pseudomonas* (COUSIN, 1982), enquanto a β -caseína e α -caseína são menos susceptíveis (DATTA; DEETH, 2001). As proteases são capazes de hidrolisar toda a caseína disponível no leite em peptídeos solúveis (MOURA et al., 1999a; VIDAL-MARTINS; ROSSI JÚNIOR; REZENDE-LAGO, 2005), aumentando, assim, a concentração dos mesmos no leite.

Na Tabela 6 podem ser observados os teores médios de proteína solúvel e nitrogênio não proteico do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas e armazenado em diferentes tempos e temperaturas.

Tabela 6 Teor médio de proteína solúvel (PS) ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e nitrogênio não proteico (NNP) ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotróficas, após armazenamento em diferentes temperaturas e tempos

Leite inoculado com baixa contagem de psicrotróficos						
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento					
	4°C		7°C		10°C	
	PS	NNP	PS	NNP	PS	NNP
0	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}
24	0,67 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,88 ^{bB}	0,05 ^{bB}	0,79 ^{bB}	0,05 ^{bB}
48	0,77 ^{bA}	0,05 ^{bA}	0,98 ^{cB}	0,06 ^{cA}	0,82 ^{bA}	0,05 ^{bB}
72	0,77 ^{bA}	0,05 ^{bA}	1,01 ^{cB}	0,06 ^{cB}	0,86 ^{bC}	0,05 ^{bC}

Leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos						
Tempo de armazenamento (horas)	Temperatura de armazenamento					
	4°C		7°C		10°C	
	PS	NNP	PS	NNP	PS	NNP
0	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}	0,66 ^{aA}	0,04 ^{aA}
24	0,69 ^{aA}	0,04 ^{bA}	0,81 ^{bB}	0,05 ^{bB}	1,60 ^{bC}	0,09 ^{bC}
48	0,82 ^{bA}	0,05 ^{cA}	1,04 ^{cB}	0,06 ^{cB}	1,68 ^{cC}	0,10 ^{cC}
72	0,84 ^{bA}	0,05 ^{cA}	1,12 ^{dB}	0,07 ^{dB}	1,68 ^{cC}	0,10 ^{cC}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúscula na coluna, não diferem, pelo teste Scott-Knott ($p > 0,05$)

A proteína solúvel do leite antes do armazenamento foi de $0,66 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$; após armazenamento, o leite inoculado com baixa contagem de psicrotróficos apresentou $1,01 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de proteína solúvel, enquanto o leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos apresentou $1,68 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ de proteína solúvel (Tabela 6). Foi verificado um aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de proteína solúvel do leite inoculado com baixa e alta contagem de psicrotróficos durante 72 horas de armazenamento, nas temperaturas de 4, 7 e 10°C .

O teor de nitrogênio não proteico aumentou significativamente ($p < 0,05$) de acordo com o aumento do tempo e da temperatura de armazenamento, tanto do leite inoculado com baixa contagem quanto do leite inoculado com alta contagem de psicrotróficos, mostrando, assim, a atuação de enzimas,

principalmente da plasmina, durante a refrigeração do leite e não das enzimas produzidas pelas bactérias psicrotólicas.

3.2 Composição e características físicas dos queijos prato

Nas Tabelas 7 e 8 pode ser observada a composição dos queijos prato fabricados com leite armazenado em diferentes condições e inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicrotólicas, respectivamente.

Tabela 7 Composição do queijo prato produzido com leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas e após armazenamento em diferentes tempos e temperaturas

Análise	Tratamento controle	Leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas									C.V. (%)
		Tratamentos									
		4 °C			7 °C			10 °C			
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	
Extrato seco total (g.100g ⁻¹)	58,46 ^c ± (0,24)	57,42 ^b ± (0,24)	57,17 ^b ± (0,24)	57,3 ^b ± (0,24)	54,24 ^a ± (0,23)	54,44 ^a ± (0,23)	54,65 ^a ± (0,23)	54,2 ^a ± (0,23)	54,45 ^a ± (0,23)	54,25 ^a ± (0,23)	0,42
Umidade (g.100g ⁻¹)	41,54 ^a ± (0,21)	42,58 ^b ± (0,21)	42,83 ^b ± (0,21)	42,7 ^b ± (0,21)	45,76 ^c ± (0,23)	45,56 ^c ± (0,23)	45,35 ^c ± (0,23)	45,8 ^c ± (0,23)	45,55 ^c ± (0,23)	45,75 ^c ± (0,23)	0,5
Proteína total (g.100g ⁻¹)	23,12 ^c ± (0,03)	22,9 ^c ± (0,03)	22,93 ^c ± (0,03)	22,9 ^c ± (0,03)	21,72 ^b ± (0,03)	21,49 ^b ± (0,03)	21,43 ^a ± (0,03)	20,43 ^a ± (0,03)	20,6 ^a ± (0,03)	20,28 ^a ± (0,03)	0,15
Cinzas (g.100g ⁻¹)	3,3 ^a ± (0,0)	3,07 ^a ± (0,0)	3,01 ^a ± (0,0)	3,03 ^a ± (0,0)	3,1 ^a ± (0,0)	3,27 ^a ± (0,0)	3,01 ^a ± (0,0)	3,04 ^a ± (0,0)	3,04 ^a ± (0,0)	3,31 ^a ± (0,0)	0,07
pH	5,33 ^a ± (0,01)	5,33 ^a ± (0,01)	5,36 ^a ± (0,01)	5,35 ^a ± (0,01)	5,32 ^a ± (0,01)	5,33 ^a ± (0,01)	5,32 ^a ± (0,01)	5,33 ^a ± (0,01)	5,32 ^a ± (0,01)	5,32 ^a ± (0,01)	0,25
Gordura (g.100g ⁻¹)	26,03 ^f ± (0,1)	25 ^e ± (0,1)	24,6 ^d ± (0,1)	24,26 ^c ± (0,1)	24,6 ^d ± (0,1)	24,36 ^c ± (0,1)	23,6 ^b ± (0,1)	24,3 ^c ± (0,1)	24,33 ^c ± (0,1)	23 ^a ± (0,1)	0,42
GES (g.100g ⁻¹)	44,53 ^d ± (0,22)	43,53 ^c ± (0,22)	43,02 ^b ± (0,21)	42,34 ^a ± (0,21)	45,35 ^c ± (0,23)	44,75 ^d ± (0,22)	43,18 ^a ± (0,21)	44,83 ^d ± (0,22)	44,69 ^d ± (0,21)	44,39 ^a ± (0,21)	0,5
Sal (g.100g ⁻¹)	1,65 ^c ± (0,00)	1,65 ^c ± (0,00)	1,65 ^c ± (0,00)	1,65 ^c ± (0,00)	1,51 ^a ± (0,00)	1,55 ^b ± (0,00)	1,65 ^c ± (0,00)	1,75 ^d ± (0,00)	1,75 ^d ± (0,00)	1,75 ^d ± (0,00)	0,1
S/U (g.100g ⁻¹)	3,82 ^d ± (0,01)	3,72 ^c ± (0,01)	3,71 ^c ± (0,01)	3,72 ^c ± (0,01)	3,21 ^a ± (0,01)	3,28 ^a ± (0,01)	3,51 ^b ± (0,01)	3,68 ^c ± (0,01)	3,7 ^c ± (0,01)	3,68 ^c ± (0,01)	0,26

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem, pelo teste Scott-Knott (p>0,05)

Tabela 8 Composição do queijo prato produzido com leite inoculado com alta contagem de bactérias psicotróficas e após armazenamento em diferentes tempos e temperaturas

Análise	Tratamento controle	Leite inoculado com alta contagem de psicotróficos									C.V. (%)
		Tratamentos									
		4 °C			7 °C			10 °C			
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	
Extrato seco total (g.100g ⁻¹)	58,46 ^c ± (0,24)	57,44 ^b ± (0,24)	57,5 ^b ± (0,24)	57,4 ^b ± (0,24)	54,64 ^a ± (0,23)	54,65 ^a ± (0,23)	54,59 ^a ± (0,23)	54,19 ^a ± (0,23)	54,34 ^a ± (0,23)	54,31 ^a ± (0,23)	0,42
Umidade (g.100g ⁻¹)	41,54 ^a ± (0,21)	42,56 ^b ± (0,21)	42,41 ^b ± (0,21)	42,6 ^b ± (0,21)	45,36 ^c ± (0,23)	45,35 ^c ± (0,23)	45,41 ^c ± (0,23)	45,81 ^c ± (0,23)	45,66 ^c ± (0,23)	45,69 ^c ± (0,23)	0,5
Proteína total (g.100g ⁻¹)	23,12 ^f ± (0,03)	22,17 ^c ± (0,03)	22,77 ^f ± (0,03)	21,43 ^c ± (0,03)	21,08 ^c ± (0,03)	21,69 ^d ± (0,03)	20,69 ^b ± (0,03)	20,48 ^b ± (0,03)	20,55 ^b ± (0,03)	19,44 ^a ± (0,03)	0,16
Cinzas (g.100g ⁻¹)	3,03 ^a ± (0,00)	3,04 ^a ± (0,00)	3,0 ^a ± (0,00)	3,01 ^a ± (0,00)	3,24 ^a ± (0,00)	3,01 ^a ± (0,00)	3,02 ^a ± (0,00)	3,01 ^a ± (0,00)	3,01 ^a ± (0,00)	3,01 ^a ± (0,00)	0,09
pH	5,33 ^a ± (0,02)	5,32 ^a ± (0,02)	5,34 ^a ± (0,02)	5,36 ^a ± (0,02)	5,31 ^a ± (0,02)	5,32 ^a ± (0,02)	5,32 ^a ± (0,02)	5,31 ^a ± (0,02)	5,31 ^a ± (0,02)	5,32 ^a ± (0,02)	0,37
Gordura (g.100g ⁻¹)	26,03 ^g ± (0,06)	25 ^f ± (0,06)	24,47 ^e ± (0,06)	24,26 ^d ± (0,06)	24,56 ^f ± (0,06)	24,06 ^c ± (0,06)	23,23 ^b ± (0,06)	24,2 ^d ± (0,06)	24,06 ^c ± (0,06)	23 ^a ± (0,06)	0,25
GES (g.100g ⁻¹)	44,53 ^d ± (0,3)	43,52 ^b ± (0,3)	42,48 ^a ± (0,3)	42,27 ^a ± (0,3)	44,96 ^d ± (0,3)	44,03 ^c ± (0,3)	42,56 ^a ± (0,3)	44,65 ^d ± (0,3)	44,28 ^d ± (0,3)	42,34 ^a ± (0,3)	0,67
Sal (g.100g ⁻¹)	1,64 ^b ± (0,00)	1,65 ^b ± (0,00)	1,65 ^b ± (0,00)	1,65 ^b ± (0,00)	1,55 ^a ± (0,00)	1,64 ^b ± (0,00)	1,65 ^b ± (0,00)	1,75 ^c ± (0,01)	1,75 ^c ± (0,01)	1,75 ^c ± (0,01)	0,29
S/U (g.100g ⁻¹)	3,81 ^c ± (0,03)	3,73 ^d ± (0,03)	3,74 ^d ± (0,03)	3,72 ^d ± (0,03)	3,3 ^a ± (0,03)	3,5 ^b ± (0,03)	3,5 ^b ± (0,03)	3,67 ^c ± (0,03)	3,68 ^c ± (0,03)	3,68 ^c ± (0,03)	0,83

Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas não diferem, pelo teste Scott-Knott (p>0,05)

Os queijos prato apresentaram extrato seco entre 58,46 e 54,19 g.100g⁻¹, ocorrendo uma diminuição de acordo com o tempo de armazenamento e a temperatura de estocagem do leite. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os queijos prato fabricados com leite recém-ordenhado (controle) e os fabricados com leite armazenado tanto inoculado com baixa quanto com alta contagem de bactérias psicotróficas (Tabela 7 e 8).

Acompanhado da diminuição do extrato seco total dos queijos, ocorreu um aumento da umidade dos mesmos, a qual variou entre 41,54 g.100g⁻¹ e 45,81 g.100g⁻¹. A análise comparativa entre os queijos mostra que os valores de umidade encontrados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) tanto para os queijos produzidos com leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos (Tabela 7) quanto para os queijos produzidos com leite inoculado com baixa contagem de psicotróficos (Tabela 8). A umidade desses queijos foi maior que a dos produzidos com leite recém-ordenhado (controle).

Os queijos produzidos com leite inoculado com baixa e alta contagem de psicotróficos armazenados a 4 °C apresentaram teor de umidade menor ($p < 0,05$) que os produzidos com leite armazenado a 7 °C e a 10 °C, os quais não diferiram entre si ($p > 0,05$). Assim, quando se aumentou a temperatura de estocagem, ocorreu um aumento na umidade dos queijos.

A alteração do teor de umidade dos queijos é explicada por alguns autores, os quais afirmam que a degradação proteolítica da caseína também pode causar maior retenção de água na massa de queijos fabricados com leite estocado sob refrigeração, com conseqüente aumento da umidade dos produtos (HICKS et al., 1986; MOURA, 1997; STOFER; HICKS, 1983; VASSILIADOU; ALICHANIDIS, 1984; YAN; LANGLOIS; O'LEARY, 1983).

Tal fato foi verificado no presente estudo, uma vez que houve um aumento da atividade proteolítica e um aumento da quantidade de proteína solúvel (Tabelas 5 e 6) e, conseqüentemente, alteração na umidade dos queijos

produzidos com os respectivos leites (Tabelas 7 e 8). Verificou-se correlação linear positiva ($p < 0,01$) entre a atividade proteolítica do leite com umidade dos queijos e, assim, quanto maior foi a atividade proteolítica no leite, maior foi a umidade dos queijos produzidos.

O aumento da proteólise do leite levou também a uma diminuição do teor de proteína dos queijos prato, uma vez que o coeficiente de correlação linear e o nível de significância entre a atividade proteolítica do leite e o teor proteína dos queijos foram de -0,6 e 0,001, respectivamente.

O teor de gordura total dos queijos variou de 23 a 26,03 g.100g⁻¹, sendo verificada uma diferença significativa ($p < 0,05$) dos queijos correspondentes aos tratamentos com os produzidos com leite recém-ordenhado. Ocorreu diminuição do teor de gordura dos queijos conforme o aumento do tempo e da temperatura de armazenamento do leite inoculado com baixa e alta contagem de bactérias psicotróficas (Tabelas 7 e 8).

A gordura no extrato seco variou de 44,95 a 42,27 g.100g⁻¹. A análise comparativa entre os queijos mostra que os valores de gordura no extrato seco encontrados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre alguns tratamentos, sendo essa variação atribuída aos diferentes valores encontrados de gordura e extrato seco dos queijos.

Os queijos prato apresentaram teor de sal de 1,51 a 1,75 g.100g⁻¹ e a análise comparativa mostra que estes valores encontrados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre alguns tratamentos. O mesmo ocorreu com o teor de sal na umidade, o qual variou entre 3,21 a 3,81 g.100g⁻¹.

Como pode ser observado nas Tabelas 7 e 8, os queijos prato analisados apresentaram pH entre 5,31 e 5,36. Verificou-se que os mesmos não diferiram significativamente em relação a esse parâmetro ($p > 0,05$). O pH médio dos queijos prato analisados está de acordo com Furtado e Lourenço Neto (1994), os quais afirmam que o pH médio esperado de um queijo prato é 5,2 a 5,4.

3.3 Características dos queijos prato durante a maturação

3.3.1 pH

A evolução do pH dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado, inoculados com baixa contagem de psicotróficos, com alta contagem de psicotróficos e armazenados em diferentes tempos e temperaturas, durante o processo de maturação de 60 dias, pode ser observada nos Gráficos 1 e 2.

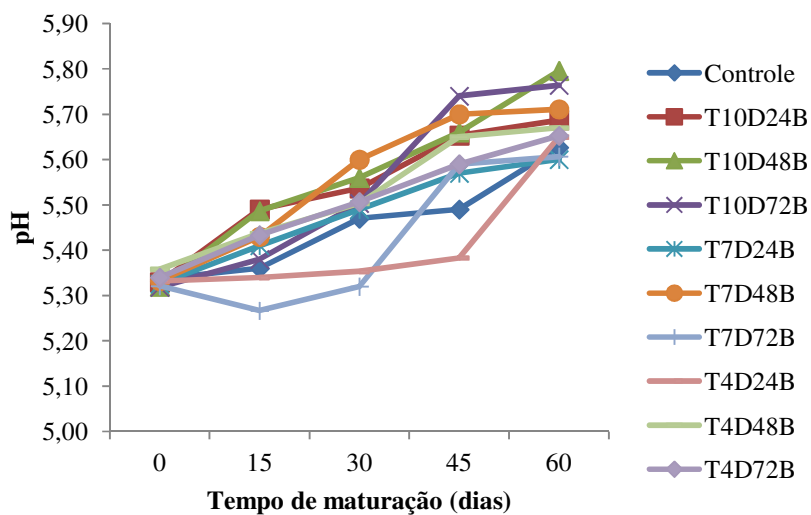


Gráfico 1 Valores de pH obtidos em diferentes tempos de maturação do queijo prato produzido com leite recém-ordenhado e leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicotróficas e armazenado em diferentes tempos e temperaturas

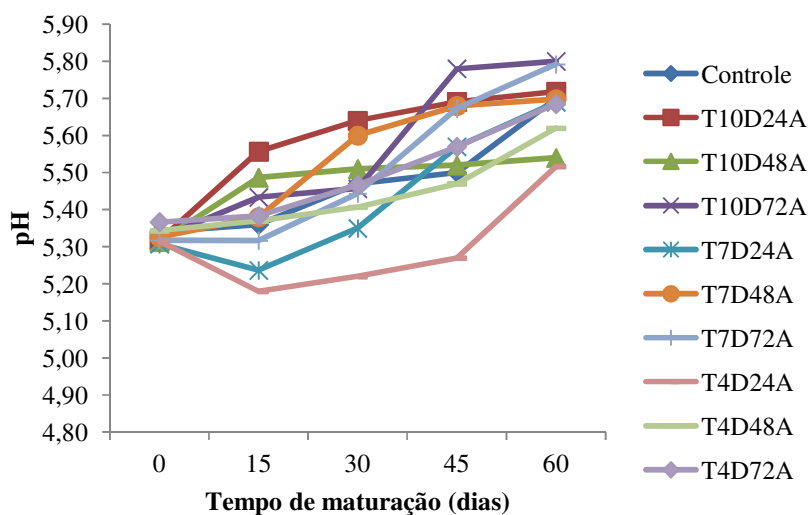


Gráfico 2 Valores de pH obtidos em diferentes tempos de maturação do queijo prato produzido com leite recém-ordenhado e leite inoculado com alta contagem de bactérias psicotróficas e armazenado em diferentes tempos e temperaturas

Comparando-se os queijos prato produzido com leite recém-ordenhado com os produzidos com leite inoculado com alta e baixa contagem de bactérias psicotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas, respectivamente, foi verificada uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre o pH dos mesmos, a partir de 15 dias de maturação, uma vez que, no tempo zero de maturação, não houve diferença significativa ($p < 0,01$) (Tabelas 6 e 7).

Durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado, o pH variou de 5,34 a 5,8. Já os queijos produzidos com leite inoculado com alta e baixa contagem de bactérias psicotróficas apresentaram pH entre 5,31 a 5,8 e 5,32 a 5,8, respectivamente. Assim, ocorreu aumento do pH de todos os queijos durante o processo de maturação e os produzidos com leite recém-ordenhado apresentaram menor aumento relativo do pH durante este período.

O maior aumento durante a maturação do pH dos queijos prato produzidos com leite inoculado com bactérias psicrotróficas em relação aos produzidos com leite recém-ordenhado pode ser devido à maior proteólise ocorrida durante o mesmo período, uma vez que, durante a maturação, o pH do queijo aumenta, como consequência da formação de NH_3 (resultante da proteólise) e do catabolismo do ácido láctico (FARKEY et al., 1990).

3.3.2 Concentração de ácidos graxos livres

O teor de ácidos graxos livres dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado, inoculados com baixa contagem de psicrotróficos, com alta contagem de psicrotróficos e armazenados em diferentes tempos e temperaturas, durante o processo de maturação de 60 dias, pode ser observado nos Gráficos 3 e 4.

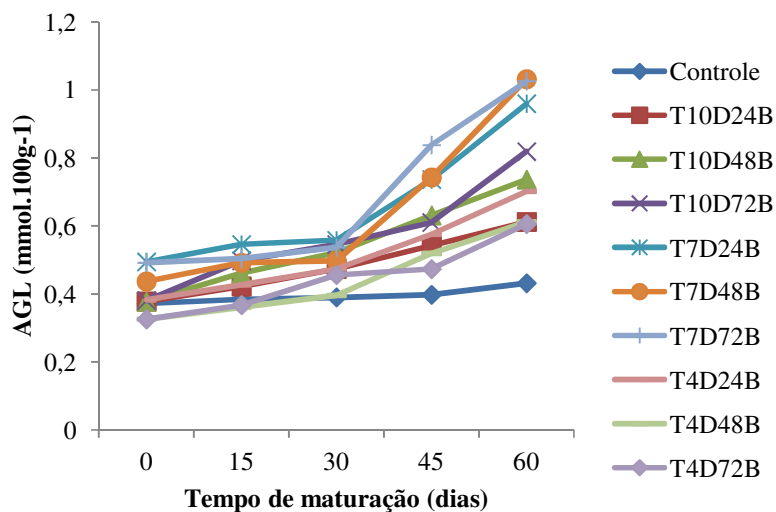


Gráfico 3 Teor de ácidos graxos livres obtidos em diferentes tempos de maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

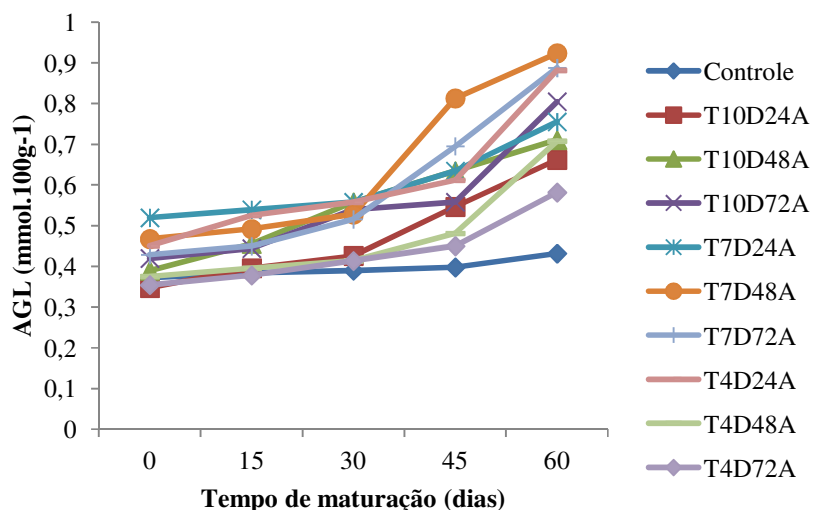


Gráfico 4 Teor de ácidos graxos livres obtidos em diferentes tempos de maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com alta contagem de bactérias psicotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

Os defeitos de sabor e aroma em queijos são resultantes, principalmente, da ação de lipases e não das proteases, isto porque, segundo Fox (1989), as lipases são adsorvidas pelos glóbulos de gordura, ficando retidas na massa do queijo. Por isso, é importante determinar o teor de ácidos graxos dos queijos durante a maturação.

Comparando-se os queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado com os produzidos com leite inoculado com alta e baixa contagem de bactérias psicotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas, respectivamente, verificou-se uma diferença significativa ($p < 0,01$) nos teores de ácidos graxos livres.

O teor de ácidos graxos durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado variou de 0,37 a 0,43 $\text{mmol} \cdot 100\text{g}^{-1}$, enquanto os produzidos com leite inoculado com alta e baixa contagem de

bactérias psicrotróficas apresentaram teor de ácidos graxos livres entre 0,35 a 0,52 mmol.100g⁻¹ e 0,32 a 1,03 mmol.100g⁻¹, respectivamente.

Como pode ser observado nos Gráficos 3 e 4, houve um aumento do teor de ácidos graxos livres nos queijos durante a maturação, tendo os queijos produzidos com leite recém-ordenhado apresentado teor de ácidos graxos livres menor do que os produzidos com leite inoculado com alta e baixa contagem de bactérias psicrotróficas.

Cousin e Marth (1977) detectaram diferença significativa entre os níveis de ácidos graxos livres do queijo cheddar elaborado com leite pré-inoculado com *Pseudomonas fluorescens*, comparado ao mesmo queijo elaborado com leite sem inoculação.

Moura et al. (1999b) verificaram que o armazenamento do leite inoculado com *Pseudomonas fluorescens* em diferentes períodos (24, 72 e 120 horas) causou aumento da concentração de ácidos graxos livres em queijo tipo parmesão e afirmaram que estes queijos são menos aceitos em testes sensoriais, provavelmente, devido à lipólise e ao conseqüente aparecimento de sabores desagradáveis.

As enzimas atuam sobre os triacilglicerídeos, produzindo ácidos graxos a partir de mono e diglicerídeos formados por ação das lipases do leite e/ou de outras lipases microbianas. A lipólise nos queijos é influenciada, dentre outros fatores, pelo aumento de temperatura (WALSTRA; NOOMEN; GEURTS, 1999).

Sabores indesejáveis, como ranço, amargo, sujo, sabão, metálico, oxidado ou adstringente, atribuídos à atividade lipolítica de psicrotróficos, podem tornar o leite e os produtos derivados inaceitáveis para o consumidor (CHAMPAGNE et al., 1994; CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003; COUSIN, 1982).

Comparando-se a quantidade de ácidos graxos livres no final de 60 dias de maturação, pode-se observar que os queijos produzidos com leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicotróficas apresentaram valores maiores que os produzidos com alta contagem de bactérias psicotróficas (Gráficos 3 e 4). A lipólise mais acentuada nos queijos fabricados com leite armazenado sob refrigeração deve-se, possivelmente, à ação das lipases produzidas pelas *Pseudomonas fluorescens* inoculadas (MOURA et al., 1999b).

Este fato pode ser explicado pelo fato de os queijos produzidos com baixa contagem de bactérias psicotróficas terem apresentado maior teor de gordura (Tabela 6 e 7) e, com isso, possivelmente, maior retenção das enzimas lipolíticas no queijo.

3.3.3 Índices de proteólise

A maturação do queijo é, essencialmente, um processo enzimático envolvendo a quebra da massa por proteólise, glicólise, lipólise e outras reações catalisadas por enzimas, resultando em um queijo com sabor e textura típicos. A proteólise ocorre na maioria dos queijos e é considerada o evento bioquímico mais importante durante a maturação da maior parte dos queijos (FOX; SINGH; MCSWEENEY, 1995; LANE et al., 1997; SOUZA; ARDÖ; MCSWEENEY, 2001).

A proteólise contribui para o desenvolvimento de aromas desejáveis e indesejáveis, os quais são formados pela liberação de aminoácidos e peptídeos, por meio da hidrólise (FOX, 1989). Contribui também para mudanças na textura pela quebra da cadeia de proteínas (FOX; MCSWEENEY, 1996), sendo esta indicada pelo aumento dos índices de extensão e profundidade no decorrer do tempo.

O índice de extensão de proteólise dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado, inoculado com baixa contagem de psicrotróficos, com alta contagem de psicrotróficos e armazenados em diferentes tempos e temperaturas, durante o processo de maturação de 60 dias, pode ser observado nos Gráficos 5 e 6.

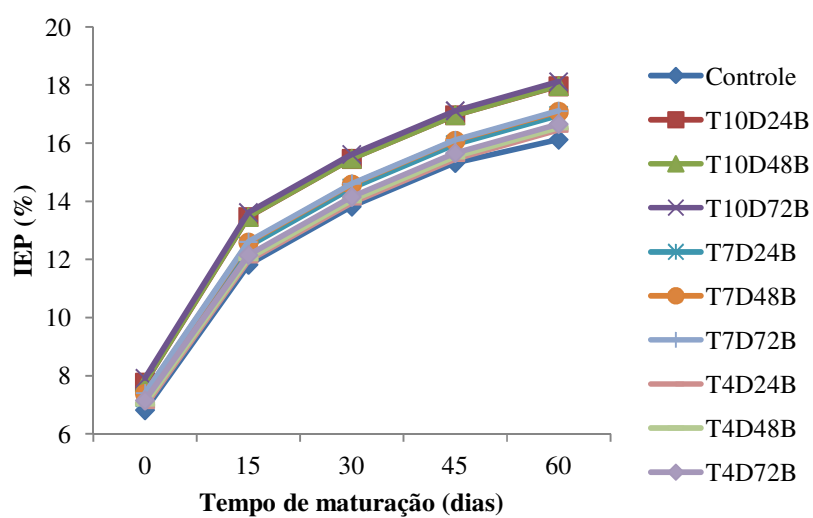


Gráfico 5 Índice de extensão de proteólise obtido em diferentes tempos de maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

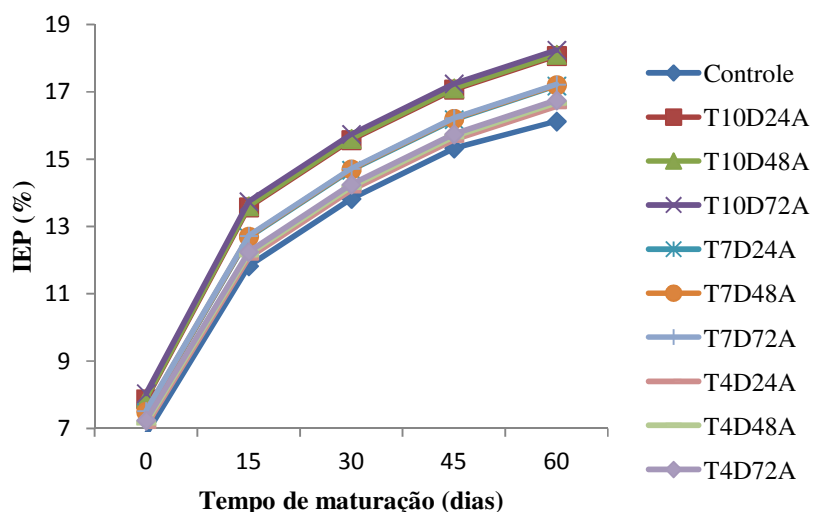


Gráfico 6 Índice de extensão de proteólise obtido em diferentes tempos de maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com alta contagem de bactérias psicotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

Neste estudo, o índice de extensão de proteólise dos queijos prato apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos em todos os tempos de maturação avaliados, ou seja, tanto os queijos produzidos com leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicotróficas quanto com alta contagem de bactérias psicotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas apresentaram diferença significativa em relação ao índice de extensão de proteólise.

Como pode ser observado nos Gráficos 5 e 6, o índice extensão de proteólise durante a maturação dos queijos prato produzido com leite recém-ordenhado variou de 6,82% a 16,12%. Já os queijos produzidos com leite inoculado com alta e baixa contagem de bactérias psicotróficas apresentaram valores do índice de extensão de proteólise entre 7,07% e 18,23% (Gráfico 6) e 6,96% e 18,11% (Gráfico 5), respectivamente. Foi verificado que os queijos

produzidos com leite armazenado a 4 °C apresentaram o índice de extensão de proteólise menor que os produzidos com o leite armazenado a 7 °C e a 10 °C.

A influência do armazenamento do leite no índice de extensão de proteólise pode ter acontecido de forma indireta, ou seja, devido às alterações nas características iniciais dos queijos, uma vez que o índice de extensão está relacionado com as proteinases do agente coagulante, as quais degradam a proteína em peptídeos de alto peso molecular.

Segundo Farkye (1995), a velocidade e a extensão da proteólise durante a maturação são determinadas pela atividade residual do coalho, a qual é influenciada pela composição química do queijo em termos de pH, conteúdo de sal e umidade. Como os queijos não apresentaram diferença significativa entre o pH e o teor de sal, o aumento da atividade do coalho residual por ser explicado pelo aumento da umidade deles, de acordo com o armazenamento do leite e contagem de bactérias psicotróficas.

Este resultado está de acordo com Lawrence, Creamer e Gilles (1987), os quais afirmam que pequenas alterações na umidade dos queijos podem resultar em alterações relativamente grandes na atividade proteolítica dos queijos.

O produto da hidrólise de frações de caseínas resulta no surgimento e no acúmulo de peptídeos responsáveis pelo sabor amargo (FAIRBAIRN; LAW, 1986). Esses peptídeos amargos são hidrofóbicos e apresentam aminoácidos apolares nas cadeias laterais (FURTADO, 2005). Segundo Augusto, Queiroz e Viotto (2005), dos queijos nacionais, o prato é o que sofre uma proteólise muito intensa e, de acordo com Furtado (2005), como não é submetido à maturação por períodos prolongados, é mais susceptível a apresentar gosto amargo.

Amorim (2007) verificou que a contagem de bactérias psicotróficas aeróbias no leite cru refrigerado a, aproximadamente, 11 °C interferiu no maior sabor amargo dos queijos prato fabricados com este leite. Assim, o

armazenamento e a contagem de bactérias psicrotróficas influenciaram a qualidade sensorial do queijo de forma negativa.

O índice de profundidade de proteólise dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado, inoculado com baixa contagem de psicrotróficos, com alta contagem de psicrotróficos e armazenados em diferentes tempos e temperaturas, durante o processo de maturação de 60 dias, pode ser observado nos Gráficos 7 e 8.

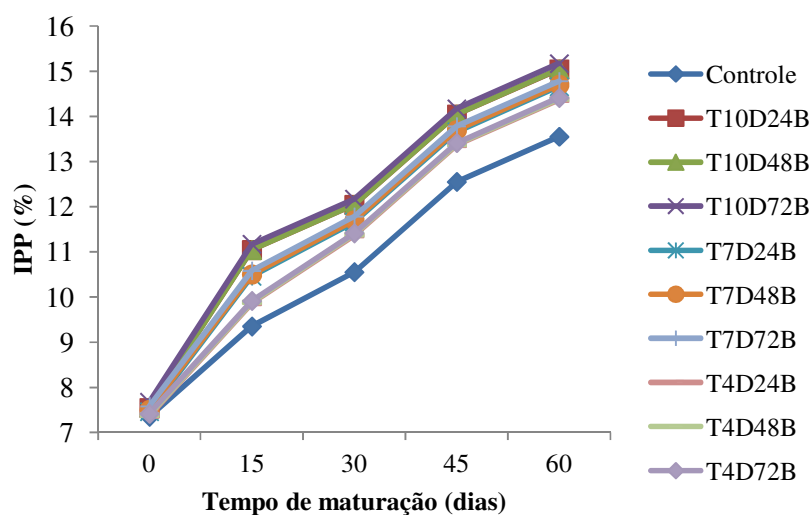


Gráfico 7 Índice de profundidade de proteólise obtido em diferentes tempos de maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas, e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

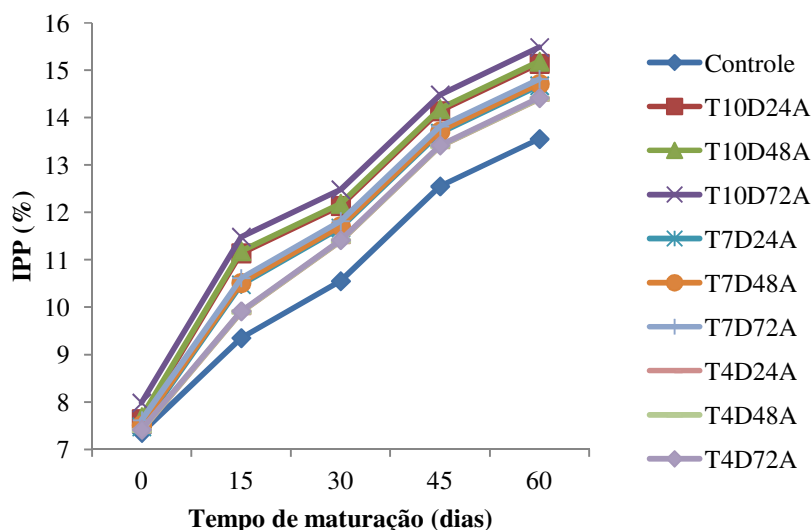


Gráfico 8 Índice de profundidade de proteólise obtido em diferentes tempos de maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com alta contagem de bactérias psicrotóficas, e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

Em relação ao índice de profundidade de proteólise dos queijos prato foi verificada diferença significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos, em todos os tempos de maturação avaliados.

Como pode ser observado nos Gráficos 7 e 8, o índice de profundidade de proteólise durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado variou de 7,35% a 13,55%; já os queijos produzidos com leite inoculado com alta e baixa contagem de bactérias psicrotóficas apresentaram valores do índice de profundidade de proteólise entre 7,39% e 15,48% (Gráfico 8) e 6,96% e 18,11% (Gráficos 7), respectivamente. Os queijos produzidos com leite armazenado a 10 °C apresentou o índice de profundidade de proteólise, maior que os queijos produzidos com o leite armazenado a 7 °C e a 4 °C.

O índice de profundidade da proteólise está relacionado à presença de enzimas proteolíticas, oriundas de microrganismos que hidrolisam os peptídeos

resultantes da ação do coalho e da plasmina sobre as caseínas (FOX, 1989). A determinação deste índice é importante, pois ele está diretamente relacionado à ação de endo e exopeptidases bacterianas que venham a produzir aminoácidos e, por meio de descarboxilases e desaminases, outros compostos nitrogenados que colaboram para o sabor típico de cada queijo (SILVEIRA; ABREU, 2003).

Qualquer tipo de alteração no processamento e na composição do leite que altere a atividade do fermento pode influenciar o índice de profundidade de proteólise.

Os leites armazenados em temperaturas de 10°C e tempo de 72 horas apresentaram maiores contagens de bactérias psicotróficas, conseqüentemente maior atividade proteolítica, resultando em queijos com maior teor de umidade. A atividade de água da coalhada pode afetar o metabolismo bacteriano e exercer um efeito osmótico sobre os constituintes celulares. Assim, o crescimento bacteriano e a velocidade de maturação dos queijos ocorrem mais rapidamente em coalhadas ricas em umidade (ROBINSON; WILBEY, 2002), como foi verificado no presente estudo.

As proteases produzidas pelas bactérias psicotróficas podem não ter influenciado de forma direta a proteólise do queijo durante o processo de maturação, uma vez que, segundo Fox (1989), as proteases são solúveis em água e são perdidas no soro, enquanto as lipases são adsorvidas pelos glóbulos de gordura, ficando retidas na massa do queijo. Além da perda das proteases das bactérias psicotróficas, pode ocorrer perda da plasmina no soro. Fajardo-Lira e Nielsen (1998) verificaram que o sistema plasmina-plasminogênio do leite pode ser afetado pelo rompimento da micela de caseína por atividade de proteases de bactérias psicotróficas. Isto resultou na liberação de plasmina ligada à caseína para o soro, o que pode comprometer de forma negativa o processo de fabricação de queijos, considerando a importância da plasmina no

desenvolvimento de características sensoriais no produto, incluindo sabor, odor e textura (FOX, 1989).

A proteólise contribui para as modificações ocorridas na textura dos queijos por meio da quebra da rede proteica, com diminuição da atividade de água e formação de novas ligações da água com grupos carboxila e amino liberados, e com o aumento do pH, facilitando a liberação de compostos sápidos durante a mastigação (SOUSA; ARDÖ; MCSWEENEY, 2001).

3.3.4 Perfil de textura

A textura é definida como a manifestação sensorial e funcional das propriedades mecânicas e estruturais dos alimentos, percebidas por meio dos sentidos da visão, audição e tato, e propriedades sinestésicas (SZCZESNIAK, 2002).

A textura é um importante atributo de qualidade que influencia a aceitação do alimento pelo consumidor (SZCZESNIAK, 1998) e, assim, é importante determinar seus parâmetros.

Os queijos prato apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$), em relação à firmeza, em todos os tempos de maturação avaliados, tanto os produzidos com leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicotróficas, quanto com alta contagem de bactérias psicotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas.

Como pode ser observado nos Gráficos 9 e 10, a firmeza durante a maturação do queijo prato produzido com leite recém-ordenhado variou de 2.749 a 1.813,48 N. Já os queijos produzidos com leite inoculado com alta e baixa contagem de bactérias psicotróficas apresentaram valores de firmeza entre 2.314,36 a 1.439,34 N (Gráfico 10) e 2.348,4 a 1.500,1 N (Gráfico 9), respectivamente.

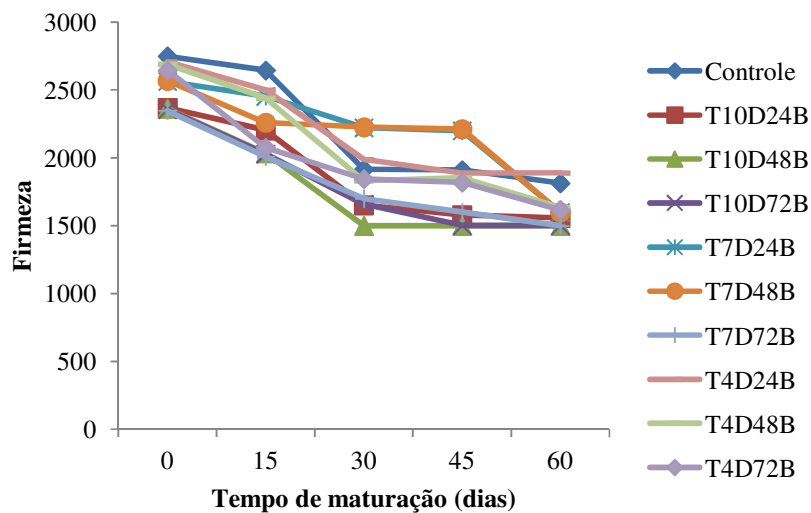


Gráfico 9 Firmeza, durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas e armazenado em diferentes tempos e temperaturas

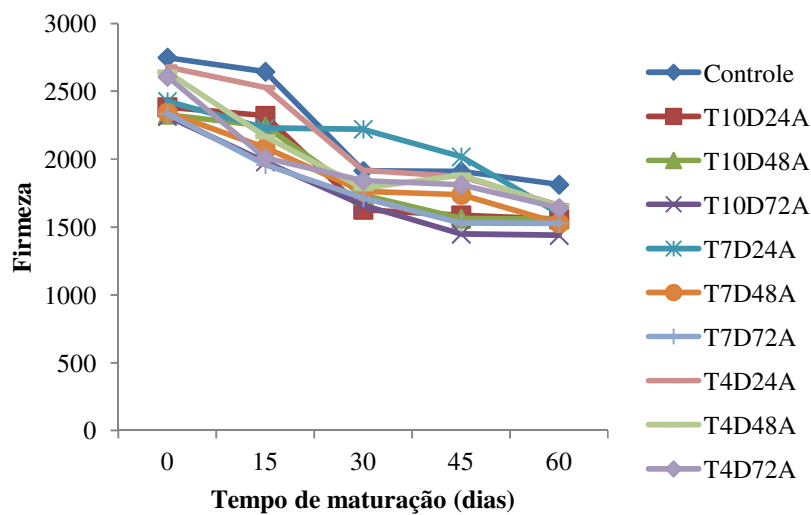


Gráfico 10 Firmeza, durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com alta contagem de bactérias psicrotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

Ocorreu diminuição da firmeza durante os 60 dias de maturação dos queijos (Gráficos 9 e 10), sendo este um comportamento típico do queijo prato, como foi verificado por vários autores (AUGUSTO, 2003; RAMOS, 2013; SCHULZ, 2003; SPADOT; DORNELAS; ROIG, 2003).

A redução da firmeza durante a maturação deve-se ao enfraquecimento da rede proteica, principalmente nas primeiras semanas de maturação. Inicialmente, o coagulante hidrolisa a ligação Phe23- Phe24 da α_{S1} -caseína, formando α_{S1} -I-caseína e outras caseínas, resultando no enfraquecimento da rede proteica (FOX et al., 1996; LANE et al., 1997).

Os queijos produzidos com leite recém-ordenhado apresentaram firmeza, durante todo o processo de maturação, maior que os outros tratamentos. Este fato pode ser explicado pela diferença de umidade dos queijos, pelo teor de proteína e pela intensidade de proteólise.

O teor de proteína dos queijos prato foi maior do que o teor de proteínas dos queijos dos demais tratamentos (Tabelas 6 e 7), o que pode ter influenciado na firmeza inicial do mesmo, uma vez que o conteúdo de proteína do queijo está relacionado à sua firmeza, e seu aumento leva à obtenção de uma textura mais firme (ADDA; GRIPON; VASSAL, 1982).

A umidade dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado foi menor do que a dos queijos produzidos com leite inoculado com bactérias psicrotróficas e armazenado, como pode ser observado nas Tabelas 6 e 7, resultando em uma textura inicial mais firme. A umidade está relacionada aos termos de classificação dos queijos pela dureza e vinculados diretamente à sua firmeza (VISSER, 1993).

Em consequência de a umidade dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado ser relativamente menor, ocorreu que o índice de proteólise foi menor que o dos outros tratamentos (Gráficos 9 e 10), resultando em menor alteração da firmeza. A firmeza está diretamente relacionada à quantidade de α_{S1} -

caseína não hidrolisada e à menor dissolução dos produtos de degradação proteica. Visto que, a cada ligação peptídica clivada, dois novos grupos iônicos são gerados, há uma redução da quantidade de água livre na matriz pelo aumento da solvatação das cadeias proteicas (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987).

A adesividade dos queijos aumentou de acordo com o tempo de maturação (Gráficos 11 e 12) e houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos. Os queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado apresentaram adesividade menor que os queijos produzidos com leite inoculado com alta e baixa contagem de bactérias psicotróficas, tendo estes valores sido de -48,22 a 81,76, -31,24 a 242,1 e -39,54 a 174,98 N.s, respectivamente. Segundo Augusto (2003), essas características indicam a atividade proteolítica do coagulante sobre a α_{S1} - caseína, resultando numa textura menos firme e adesiva.

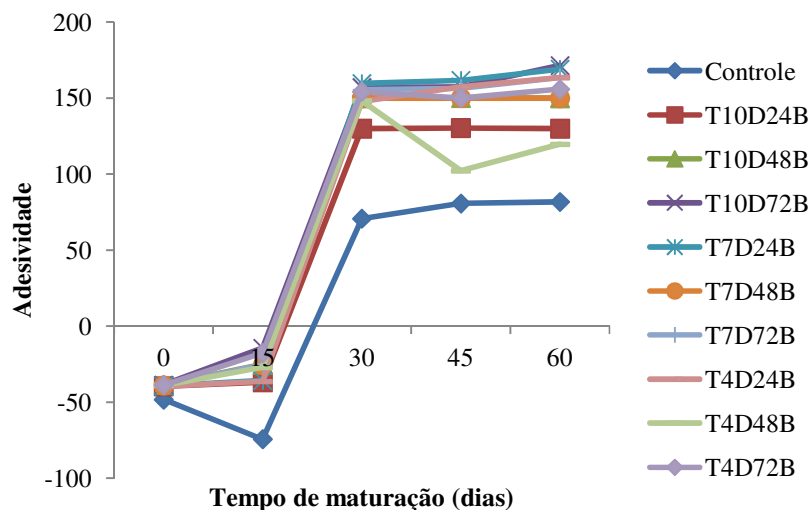


Gráfico 11 Adesividade, durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

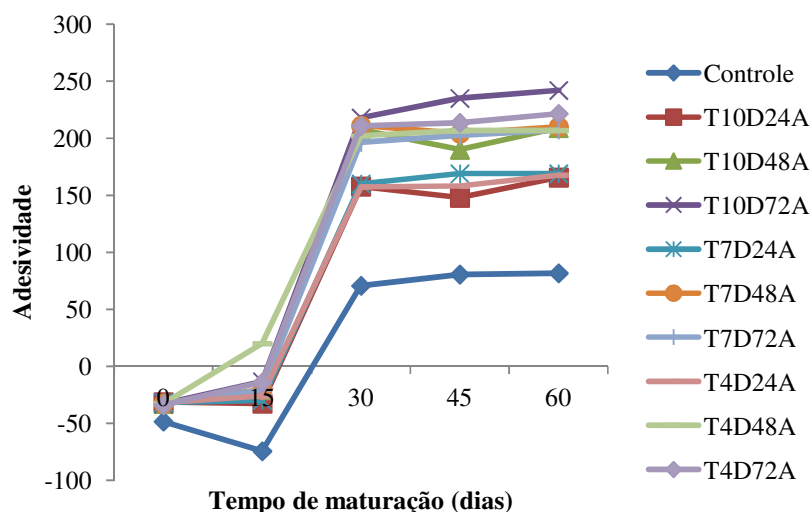


Gráfico 12 Adesividade, durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com alta contagem de bactérias psicrotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

Verificou-se que a elasticidade diminui com o tempo de maturação, ou seja, a velocidade com que o material deformado volta à sua condição original, após ser retirada a força deformante, diminui. Foi verificada uma diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,01$), tendo os valores para os queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado, com leite inoculado com alta contagem de bactérias psicrotrófica e leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas variado entre 0,92 a 0,55, 0,61 a 0,55 e 0,59 a 0,31, respectivamente (Gráficos 13 e 14).

A diminuição da elasticidade dos queijos pode ser explicada pela diminuição da firmeza, a qual, segundo Jong (1976), tem correlação alta com a quantidade de α_{S1} -caseína intacta, uma vez que os peptídeos liberados pela hidrólise da caseína são solúveis na água e não podem contribuir para a matriz proteica. Lawrence, Creamer e Gilles (1987) afirmam que a clivagem de cada

ligação peptídica gera dois novos grupos iônicos, que competirão pela água disponível no sistema. Assim, a água disponível para a solvatação das cadeias de proteínas dá liga aos novos grupos iônicos, tornando o queijo mais firme, menos deformável e menos elásticos.

Assim, os queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado apresentou menores índices de proteólise e, conseqüentemente, mais firme e menos elástico que os demais tratamentos, ocorrendo uma influência indireta da contagem de bactérias psicrotóficas e do armazenamento do leite na firmeza e na elasticidade dos queijos.

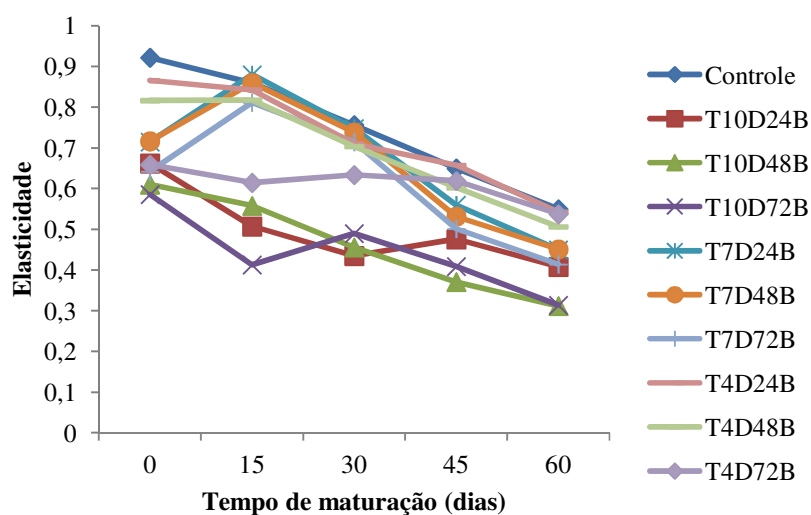


Gráfico 13 Elasticidade, durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotóficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

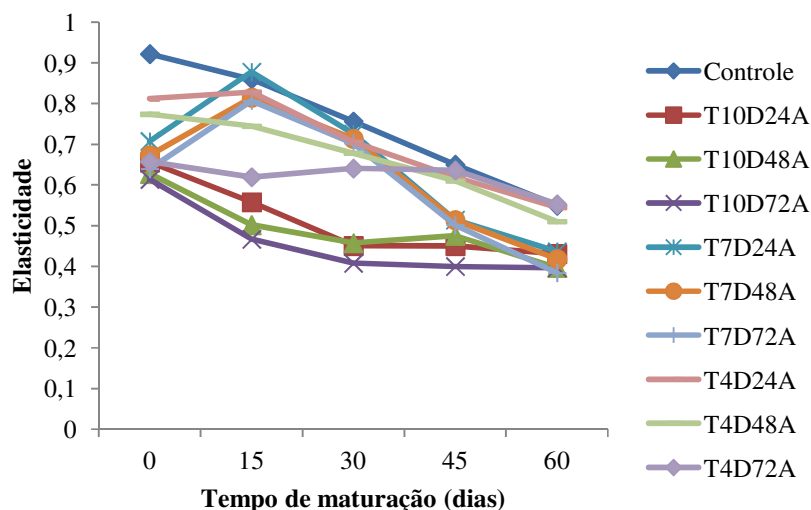


Gráfico 14 Elasticidade, durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com alta contagem de bactérias psicrotóficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

A coesividade é a proporção pela qual um queijo pode ser deformado antes da ruptura. Segundo Augusto (2003) e Ramos (2013), este parâmetro diminuiu significativamente durante o tempo de maturação. Creamer e Olson (1982) observaram que os queijos mais velhos apresentam menor coesividade e tendem a ser mais fraturáveis, parte em consequência da perda da elasticidade natural e parte resulta da proteólise ocorrida nos queijos.

Este fato foi confirmado no presente estudo. Ocorreu diminuição da coesividade dos queijos prato durante a maturação, tendo os que apresentaram menor coesividade (Gráficos 15 e 16) apresentado também menor elasticidade (Gráficos 13 e 14) e maiores índices de proteólise (Gráficos 5, 6, 7 e 8).

Foi verificado que houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre a coesividade dos queijos prato, a qual variou de 0,74 a 0,68, para os queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado; 0,61 a 0,53, para os queijos inoculados

com alta contagem de bactérias psicotróficas e 0,64 a 0,59, para os queijos inoculados com baixa contagem de bactérias psicotróficas (Gráficos 15 e 16).

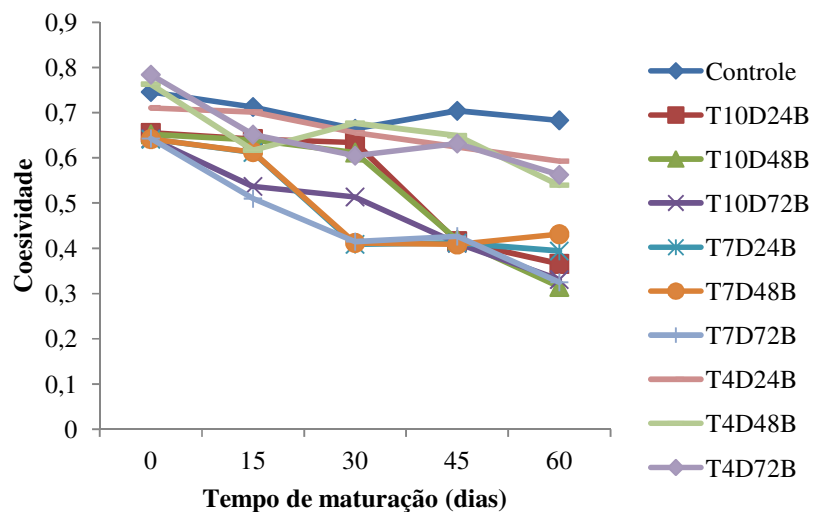


Gráfico 15 Coesividade, durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

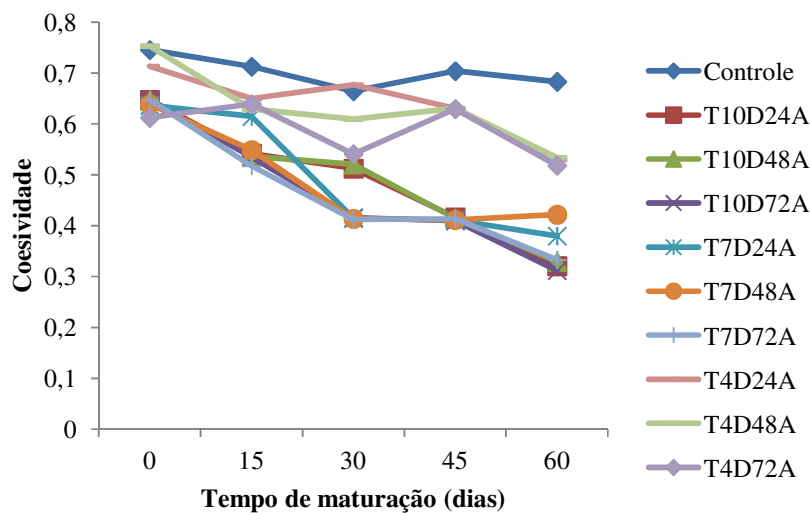


Gráfico 16 Coesividade, durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com alta contagem de bactérias psicrotóficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

Segundo Augusto (2003), a gomosidade é relacionada à quantidade de energia necessária para desintegrar um alimento semissólido até a ponto de ser engolido. Verificou-se que esse parâmetro diminuiu com o tempo de maturação dos queijos prato (Gráficos 17 e 18), tendo a gomosidade dos queijos produzidos com leite recém-ordenhado e com leite inoculado com alta e baixa contagem variado de 1.191,40 a 540,17, de 1.140 a 548,44 e de 1.149,54 a 547,64, respectivamente.

Essa diferença neste parâmetro de textura pode ser devido à diferença dos valores de firmeza encontrados, uma vez que queijos mais firmes tendem a ter maior gomosidade (AUGUSTO, 2003).

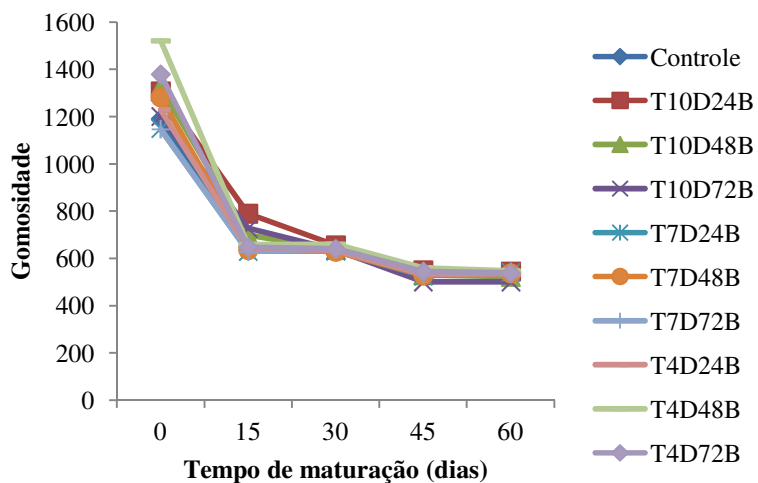


Gráfico 17 Gomosidade, durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotóficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

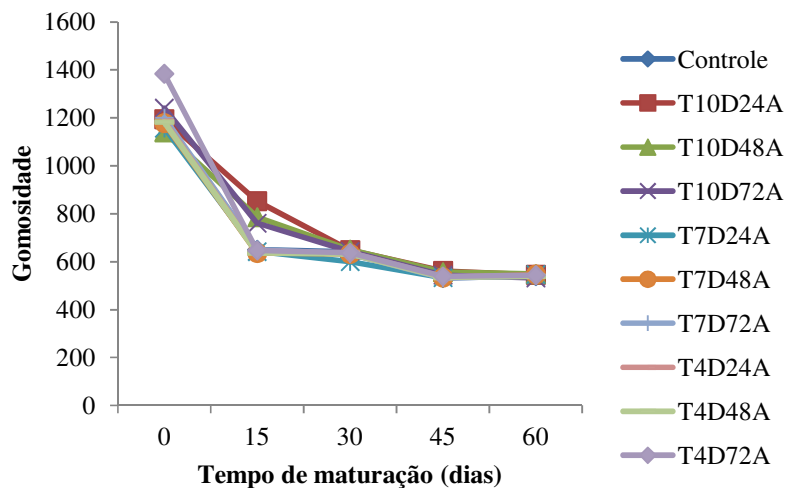


Gráfico 18 Gomosidade, durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com alta contagem de bactérias psicrotóficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

3.3.5 Cor

Cor é uma propriedade de aparência atribuída à distribuição espectral da luz. A primeira impressão que se tem de um alimento é, geralmente, visual, e a maior parte da nossa tendência em aceitá-lo depende da sua cor. A cor exerce grande influência na decisão de compra do consumidor, além de estar relacionada com a sua qualidade e com o uso de corantes (RAMOS, 2013). Verificou-se que, no transcorrer da maturação de 60 dias dos queijos prato, houve uma variação nos valores de L^* , a^* e b^* .

Os valores de L^* , o qual, em uma escala de 0 (preto) a 100 (branco), indica a luminosidade, variaram de 73,82 a 73,36, para os queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado; de 77,79 a 72,24, para os queijos produzidos com leite armazenado e inoculado com alta contagem de bactérias psicrotróficas e de 77,7 a 74,02, para os produzidos com leite armazenado e inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas (Gráficos 19 e 20). Verificou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o parâmetro de cor L^* dos queijos prato em todos os tempos de maturação.

Após 60 dias de maturação, os queijos tornaram-se mais escuros, como foi verificado por Ramos (2013) que observou que os queijos prato, no início da maturação, de forma geral, se apresentavam esbranquiçados e, no transcorrer do período de maturação, foram ficando mais amarelos e com a coloração mais homogênea.

Os queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado apresentaram-se, de forma geral, mais escuros que os demais tratamentos e com menor variação da cor. Este fato pode ser explicado pela menor umidade do queijo prato produzido com leite recém-ordenhado, conferindo ao mesmo uma coloração mais escura. Já os queijos produzidos com leite inoculado com bactérias psicrotróficas apresentaram maior variação da luminosidade durante a

maturação, devido, principalmente, a maiores alterações nas suas características durante o mesmo período.

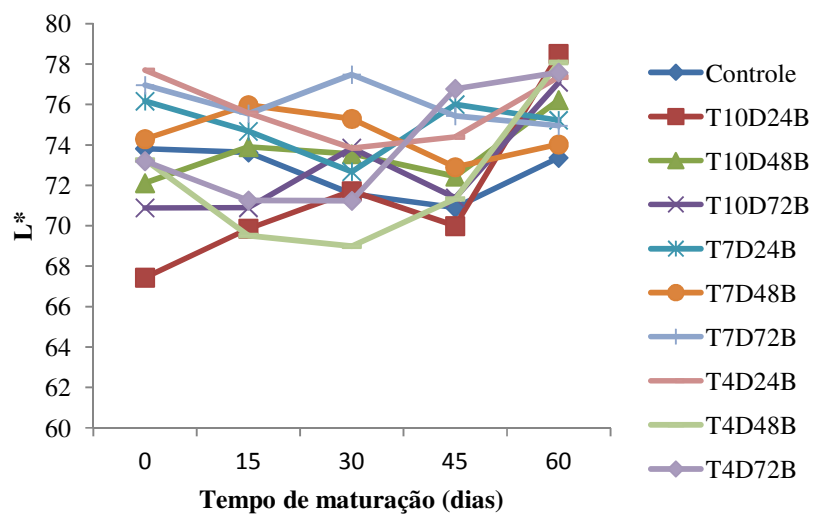


Gráfico 19 Valores de L*, durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

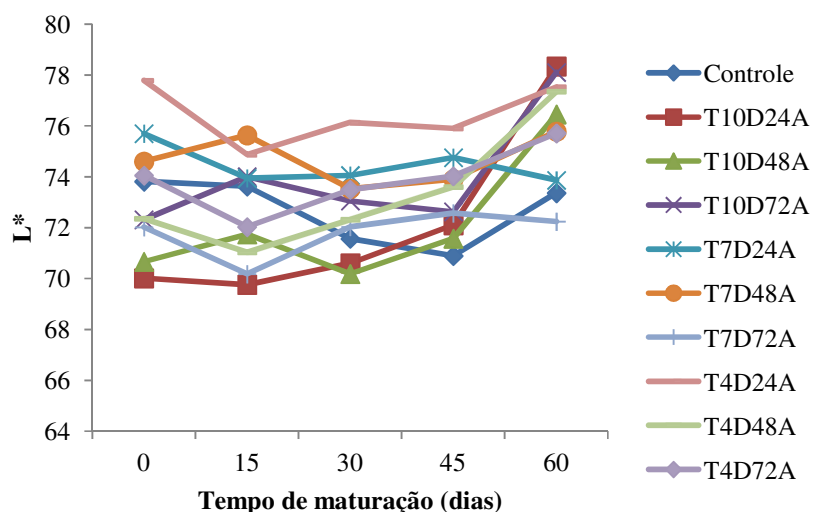


Gráfico 20 Valores de L*, durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com alta contagem de bactérias psicotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

O valor de a^* positivo, que representa a intensidade da cor vermelha, variou significativamente ($p < 0,05$) entre as amostras, exceto no período de 30 dias de maturação, no qual não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$). Os valores médios de a^* para os queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado, inoculado com alta e baixa contagem de bactérias psicotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas variaram de 7,4 a 7,7, de 7,09 a 7,77 e de 7,08 a 7,86, respectivamente (Gráficos 21 e 22).

No início do período de maturação, o queijo produzido com leite recém-ordenhado apresentou maior intensidade de cor vermelha em relação aos outros tratamentos e, após 60 dias de maturação, os valores de a^* apresentaram-se próximos. Ocorreu um aumento da intensidade da cor vermelha em todos os queijos prato durante a maturação.

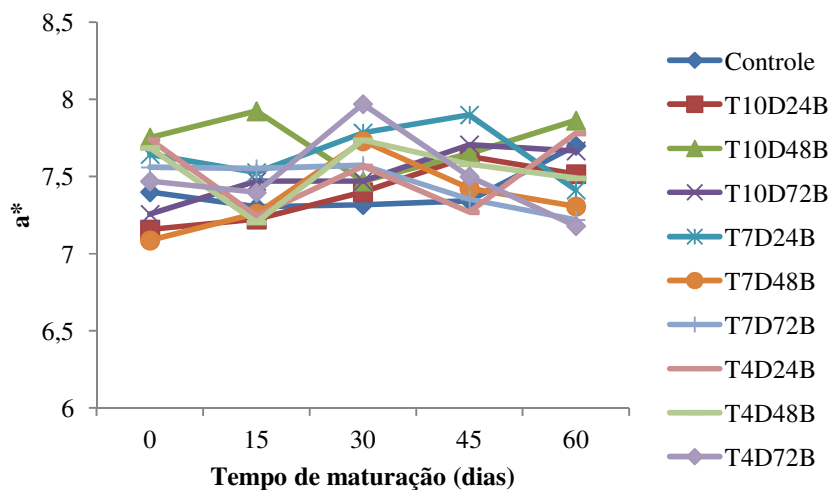


Gráfico 21 Valores de a^* , durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicotróficas e armazenado em diferentes tempos e temperaturas

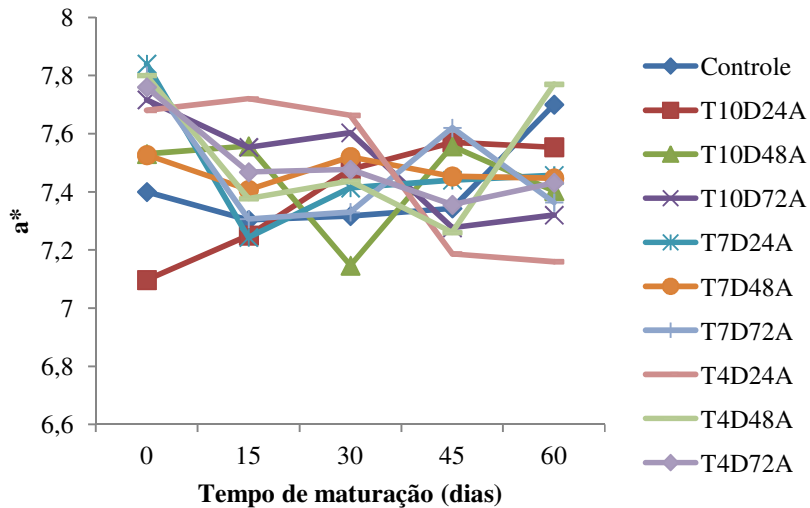


Gráfico 22 Valores de a^* , durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com alta contagem de bactérias psicotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

As amostras apresentaram o valor de b^* positivo, que representa a intensidade de cor amarela, a qual é característica do queijo prato (OLIVEIRA, 1986; PERRY, 2004).

Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre dos valores de b^* , tanto dos queijos prato produzidos com leite inoculado com alta contagem de bactérias psicrotróficas, quanto dos queijos produzidos com baixa contagem de bactérias psicrotróficas, em todos os tempos de maturação.

Os queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado, com leite inoculado com alta e baixa contagem de bactérias psicrotróficas e armazenado em diferentes tempos e temperaturas, apresentaram valores de b^* de 24,28 a 26,12, de 16,13 a 17,21 e de 17,6 a 26,63, respectivamente, durante os 60 dias de maturação (Gráficos 23 e 24). Foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao parâmetro b^* e que os queijos produzidos com leite recém-ordenhado apresentaram-se mais amarelos que os demais tratamentos nos primeiros dias de maturação.

Ocorreu um aumento da intensidade da coloração amarela dos queijos, estando, assim, de acordo com Garcia (2007), Ginzinger et al. (1999) e Ramos (2013). Os mesmo autores afirmam que o índice de “amarelamento” dos queijos, correlacionado ao valor de b^* , aumenta com o tempo.

A cor do queijo é função do teor de gordura e do corante adicionado durante a fabricação. Como a quantidade de corante adicionada foi igual em todos os tratamentos, a menor umidade pode ter contribuído para acentuar a cor amarela dos queijos.

As características iniciais dos queijos prato e as suas transformações durante a maturação influenciaram a sua cor, tendo apresentado diferenças em relação aos valores de L^* , a^* e b^* , antes e após o período de maturação.

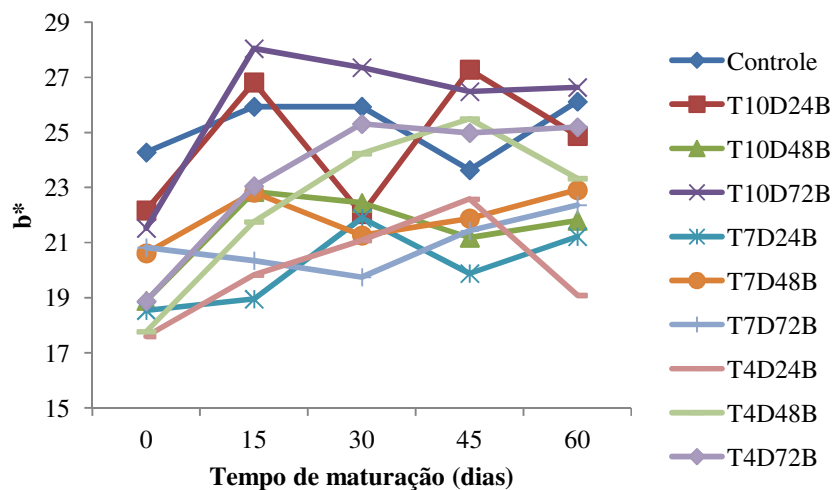


Gráfico 23 Valores de b^* , durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com baixa contagem de bactérias psicrotróficas e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

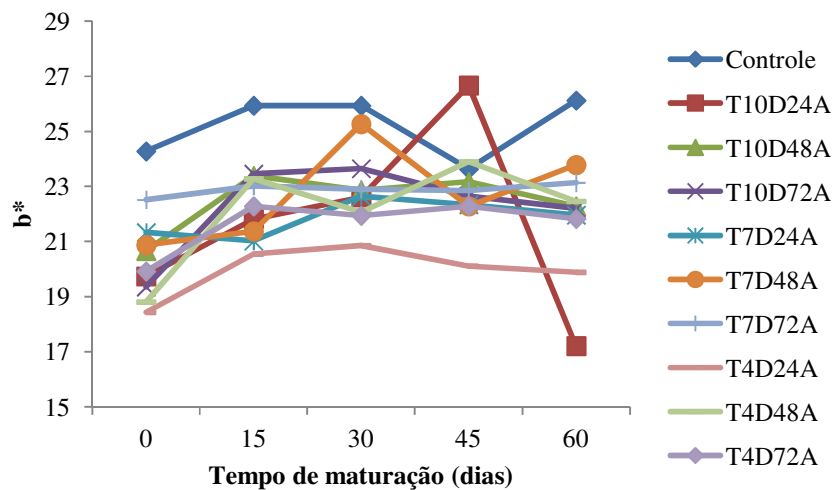


Gráfico 24 Valores de b^* , durante a maturação dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado e leite inoculado com alta contagem de bactérias psicrotróficas, e armazenados em diferentes tempos e temperaturas

4 CONCLUSÃO

Com o armazenamento do leite sob refrigeração e com a inoculação de bactérias psicrotóxicas, ocorrem alterações nas características do queijo prato durante a maturação, diferente das alterações ocorridas nos queijos produzidos com leite recém-ordenhado.

Essas alterações são devido à qualidade do leite após armazenamento, principalmente pela ação enzimática e pela baixa temperatura, resultando em queijos mais úmidos, com menor teor de proteína e gordura. Os mesmos queijos, durante a maturação, apresentar a maiores índices proteolíticos devido à umidade dos mesmos, ao maior teor de ácidos graxos livres pela ação das enzimas lipolíticas, ao aumento do pH devido à proteólise e à alteração na cor. Essas alterações podem influenciar de forma negativa a aceitação dos queijos prato pelo consumidor, uma vez que se obtiveram queijos com características diferentes das dos queijos prato produzidos com leite recém-ordenhado. Portanto, faz-se necessário verificar a aceitação desses queijos para constatar como o armazenamento e a contagem de bactérias psicrotóxicas do leite podem influenciar.

REFERÊNCIAS

ADDA, J.; GRIPON, J. C.; VASSAL, L. The chemistry of flavour and texture generation in cheese. **Food Chemistry**, London, v. 9, n. 1, p. 115-129, 1982.

AMORIM, H. E. **Influência do tempo de estocagem de leite cru refrigerado sobre a presença de CMP (Caseinomacropéptido)**. 2007. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

ARCURI, E. F. Influência de bactérias psicotróficas na qualidade do leite e produtos lácteos. In: BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. (Ed.). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Templo, 2003. p. 105-115.

ARCURI, E. F. et al. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2250-2255, nov. 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official method of analysis**. 18th ed. Washington, 2005. 82 p.

AUGUSTO, M. M. M. **Influência do tipo de coagulante e do aquecimento no cozimento da massa na composição, rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo prato**. 2003. 190 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

AUGUSTO, M. M. M.; QUEIROZ, M. I.; VIOTTO, W. H. Seleção e treinamento de julgadores para avaliação do gosto amargo em queijo prato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 849-852, out./dez. 2005.

BALDINI, V. L. S. **Proteólise em queijo tipo prato durante a maturação**. 1998. 208 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 358, de 4 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 4 set. 1997. Seção 1, p. 19690.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 68**, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6-11.

BYNUM, D. G.; BARBANO, D. M. Whole milk reverse osmosis retentates for Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 1, p. 1-10, Jan. 1985.

CABONI, M. F.; ZANNONI, M.; LERCKER, G. Fat lipolysis in parmigiano-reggiano cheese. **Scienza e Tecnica Latiero Casearia**, Parma, v. 41, p. 289-297, 1990. Suplemento.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicrotrófica no rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 2006. 57 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

CELESTINO, E. L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Werribee, v. 51, n. 2, p. 59-63, 1996.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 34, n. 1, p. 1-30, Sept. 1994.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 45, 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**, Champaign, v. 60, n. 7, p. 1048-1056, 1977.

CREAMER, L. K.; OLSON, N. F. Rheological evaluation of maturing cheddar cheese. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 47, n. 2, p. 631-646, 1982.

CUNHA, L. T.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Determinação das condições físico-químicas e microbiológicas de leite B cru refrigerado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 15., 1996, Poços de Caldas. **Resumos...** Lavras: UFLA, 1996. p. 73.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk: a review. **Food and Bioproducts Processing**, Davis, v. 79, n. 4, p. 197-210, 2001.

DORNELLAS, J. R. F. **Contribuição ao estudo do queijo prato a partir de retentados obtidos por ultrafiltração de leite com ou sem pré-fermentação.** 2003. 201 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

DOWNEY, W. K. Review of the progress of dairy science: flavor impairment from pre and post manufacture lipolysis in milk and dairy products . **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 47, n. 2, p. 237-252, June 1980.

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

FAJARDO-LIRA, C. E.; NIELSEN, S. S. Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 4, p. 901-908, Apr. 1998.

FARKYE, N. Contribution of milk: clotting enzymes and plasmin to cheese ripening. In: MALIN, E. M.; TUNICK, M. H. (Ed.). **Chemistry of structure: function relationships in cheese**. New York: Plenum, 1995. p. 195-207.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 6, p. 1379-1400, 1989.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Proteolysis in cheese during ripening. **Food Reviews International**, Madison, v. 12, n. 4, p. 457-509, 1996.

FOX, P. F.; O'BRIEN, N. M. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 39, p. 163-328, 1996.

FOX, P. F.; SINGH, T. K.; MCSWEENEY, P. L. H. Biogenesis of flavor compounds in cheese. In: MALIN, E. L.; TUNICK, M. H. (Ed.). **Chemistry of structure/function relationships in cheese**. London: Plenum, 1995. p. 59-98.

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

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

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos.** São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

GARCIA, G. A. C. **Efeito do uso de enzimas proteolíticas na maturação de queijo prato com teor reduzido de gordura.** 2007. 154 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

GINZINGER, W. et al. Raw milk flora affects composition and quality of Bergkase: 3., physical and sensory properties, and conclusions. **Lait**, Les Ulis, v. 79, n. 4, p. 411-421, 1999.

GOBETTI, M.; ROSSI, J. Peptidases pro files of *Pseudomonas fluorescens* identificação and properties. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 75, n. 4, p. 924-934, Apr. 1992.

GOMES, M. I. F. V. **Alterações na qualidade do leite pasteurizado pela ação de lipase microbiana.** 1988. 85 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1988.

HICKS, C. L. et al. Effect of milk quality and low temperature storage on cheese yield: a summation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 69, n. 3, p. 649-657, 1986.

JONG, L. de. Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency: I., proteolysis and consistency of "Noordhollanse Meshanger" cheese. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 30, p. 242-253, 1976.

KOSIKOWSKI, F. V. **Cheese and fermented milk foods**. 3rd ed. Ann Arbor: E. Bros, 1982. 620 p.

LANE, C. N. et al. Contribution of ripening coagulant to proteolysis and textural changes in Cheddar cheese during. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, n. 6/7, p. 453-464, June/July 1997.

LAWRENCE, R. C.; CREAMER, L. K.; GILLES, J. Symposium: cheese ripening technology. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n. 8, p. 1748-1760, 1987.

MINUSSI, R. C.; FURTADO, M. M.; MOSQUIM, M. A. C. V. Avaliação de métodos para aceleração da maturação do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 291, p. 31-42, 1995.

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

MOURA, C. J. et al. Efeito do resfriamento de leite inoculado com *Pseudomonas fluorescens* sobre a proteólise e lipólise. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 308, p. 3-8, 1999a.

MOURA, C. J. et al. Lipólise e avaliação sensorial em queijo tipo parmesão fabricado com leite resfriado e inoculado com *pseudomonas fluorescens*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 308, p. 3-8, 1999b.

NARIMATSU, A. et al. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 23, p. 177-182, Dec. 2003. Supplement.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: fundamentos tecnológicos**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1986. 146 p.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

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

R DEVELOPENTE CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: Foundation for Statistical Computing, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

RAMOS, T. de M. **Tipos de pasteurização e agentes coagulantes na fabricação do queijo tipo prato**. 2013. 232 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

RIBEIRO, E. P. **Aplicação da ultrafiltração de leite no processo de fabricação de queijo tipo prato**. 1996. 144 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Campinas, Campinas, 1996.

ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Fabricación de queso**. Zaragoza: Acribia, 2002. 488 p.

SANVIDO, G. B. **Efeito do tempo de armazenamento do leite cru e da temperatura de esticagem do leite pasteurizado sobre sua vida de prateleira**. 2007. 94 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SCHULZ, J. G. **Efeito da utilização de *slurry* sobre a maturação de queijo prato**. 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SILVA, A. T. **Maturação do queijo tipo prato**: influência da adição de enzimas proteolíticas no processo. 1998. 119 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT**: fatores determinantes para sedimentação e geleificação. 2003. 147 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SILVEIRA, P. R.; ABREU, L. R. Rendimento e composição físico química do queijo prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema HTST e injeção íreta de vapor. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1340-1347, nov./dez. 2003.

SOUZA, M. J.; ARDÖ, Y.; MCSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4, p. 327-345, 2001.

SPADOTI, L. M.; DORNELAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Evaluation of the melting of prato cheese obtained by modifications of the traditional manufacturing process. **Le Lait**, Les Ulis, v. 83, n. 5, p. 397-408, 2003.

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

SZCZESNIAK, A. S. Sensory texture profiling-historical and scientific perspectives. **Food Technology**, Oxford, v. 58, n. 8, p. 54-57, Nov. 1998.

SZCZESNIAK, A. S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 13, n. 4, p. 215-225, June 2002.

VALLE, J. L. E. et al. Evolução da microbiota láctica do queijo prato conservado a temperatura de subcongelamento. **Revista do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 83-91, 1992.

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

VIANNA, P. C. B. **Efeito da contagem de células somáticas do leite sobre a microbiota de maturação e características sensoriais do queijo prato**. 2006. 71 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

VIDAL-MARTINS, A. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; REZENDE-LAGO, N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 3, p. 396-400, 2005.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 329-350, 1993.

WALSTRA, P.; NOOMEN, A.; GEURTS, T. J. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 2nd ed. Maryland: Aspen, 1999. 82 p.

WOLFSCHOOM-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, v. 41, n. 244, p. 8-12, mar./abr. 1986.

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