

Avaliação do rendimento e características físico-químicas de queijos frescos sem sal produzidos a partir de leite contaminado por bactérias psicrotróficas proteolíticas

Physicalchemical and yield evaluation of fresh unsalted cheese produced from milk contaminated by proteolytic psychrotrophic bacteria

DOI:10.34117/bjdv7n5-208

Recebimento dos originais: 07/04/2021

Aceitação para publicação: 11/05/2021

Juliana Querino Goulart

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Endereço: Faculdade de Veterinária UFRGS - Av. Bento Gonçalves, 9090 - Agronomia,
Porto Alegre - RS, 91540-000.
E-mail: juquerino@gmail.com

Andrea Troller Pinto

Doutora em Tecnologia de alimentos

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Endereço: Faculdade de Veterinária UFRGS - Av. Bento Gonçalves, 9090 - Agronomia,
Porto Alegre - RS, 91540-000.
E-mail: andrea.troller@ufrgs.br

RESUMO

Os queijos são produtos da coagulação enzimática do leite. O coágulo é formado a partir da agregação das micelas de caseína, principal proteína do leite. A proteólise sofrida devido a enzimas de origem bacteriana pode degradá-la, assim como pode alterar a sua constituição, formando coágulos menos densos e com maior retenção de água. Visando verificar os efeitos destas enzimas em derivados lácteos, este estudo teve por objetivo avaliar as características físico-químicas e o rendimento do queijo fresco sem sal produzido a partir de leite contaminado com bactérias psicrotróficas proteolíticas. Para isso, microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas foram isolados do leite cru refrigerado, tendo sido identificados até nível de gênero *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. e *Butiauxella* sp. Esses microrganismos foram inoculados em leite pasteurizado e armazenados por 48 e 72 horas a temperatura de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após o armazenamento os leites foram tratados termicamente por pasteurização lenta e produziu-se queijo fresco sem sal. Os resultados obtidos demonstraram que os queijos produzidos com leite armazenado por 48h não apresentaram diferenças nas análises físico-químicas. Já o armazenamento por 72h produziu queijos com rendimentos menores e percentuais de umidade maiores. Concluiu-se, portanto, que maiores tempos de armazenamento do leite afetam os queijos frescos sem sal na diminuição de seus rendimentos e aumento de seus teores de umidade.

Palavras-chave: Queijos, enzimas proteolíticas, rendimento, teores de proteína e gordura

ABSTRACT

Cheeses are products of enzymatic coagulation of milk. The clot is formed from the casein's aggregation, the main protein in milk. The proteolysis suffered due to enzymes of bacterial origin can degrade it, as well as change its constitution, forming less dense clots and greater water retention. To verify the effects of these enzymes in dairy products, this study aimed to evaluate the physicochemical characteristics and the yield of fresh unsalted cheese produced from milk contaminated with proteolytic psychrotrophic bacteria. For this, psychrotrophic microorganisms producing proteolytic enzymes were isolated from chilled raw milk, having been identified as *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. and *Butiauxella* sp. These microorganisms were inoculated in pasteurized milk and stored for 48 and 72 hours at a temperature of $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. After storage the milk suffer slow pasteurization and fresh unsalted cheese was produced. The results obtained demonstrated that the cheeses produced with milk stored for 48 hours did not present differences in the physicochemical analyzes. Storage for 72 hours, on the other hand, produced cheeses with lower yields and higher moisture percentages. It was concluded, therefore, that longer storage times for milk affect fresh cheeses without salt in decreasing their yields and increasing their moisture contents.

Keywords: Cheese, proteolytic enzymes, yield, protein and fat content

1 INTRODUÇÃO

Queijos são produtos da coagulação enzimática do leite, onde uma enzima exógena (quimosina) provoca a agregação das micelas de caseína e forma um coágulo. A integridade destas micelas pode ser determinante para a ação da quimosina, sendo que a ação prévia de enzimas proteolíticas de origem microbiana pode afetar a organização do coágulo, reduzindo assim, o rendimento dos queijos. Além disso, a proteólise pode dar origem a peptídeos amargos, que afetam o sabor dos queijos ou a peptídeos menores, que são perdidos durante a sinérese (TILOCCA et al., 2020).

A produção de enzimas proteolíticas termoestáveis está normalmente associada aos microrganismos psicrotóxicos, que têm sua multiplicação favorecida pelo resfriamento do leite cru. Quanto maior o tempo de permanência em refrigeração sem tratamento térmico apropriado, mais favorecida é a multiplicação destes microrganismos (YUAN et al., 2019).

A legislação brasileira estabelece tempo máximo de 48h para a permanência do leite em refrigeração antes do processamento, sendo recomendados períodos inferiores à 24h. Porém, fatores relacionados à logística do transporte do leite para a indústria podem acarretar no aumento desse tempo, o que afetaria diretamente no aumento da população de microrganismos psicrotóxicos e a produção de enzimas termoestáveis (BRASIL, 2011; BRASIL, 2018).

Buscando avaliar os efeitos do aumento do tempo de armazenamento do leite na qualidade dos derivados lácteos, este estudo teve por objetivo avaliar as características físico-químicas e rendimento dos queijos frescos sem sal produzidos a partir de leite contaminado com microrganismos psicrotróficos produtores de enzimas proteolíticas, em dois diferentes tempos de armazenamento.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Bactérias psicrotróficas isoladas de leite cru refrigerado foram testadas quanto à sua capacidade de produzir proteases em temperaturas de refrigeração, por meio da semeadura em ágar leite desnatado. A expressão fenotípica foi evidenciada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia, decorrente do metabolismo bacteriano sobre as proteínas do leite após armazenamento em temperatura de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por dez dias. Três isolados, que demonstraram essa capacidade de formar halo, foram identificados por espectrometria de massas com ionização por dessorção a laser e análise por tempo de voo (MALDI TOF MS, Autoflex Speed®, programas FlexControl® e Biotyper®-Bruker, Alemanha) como *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. e *Butiauxella* sp. Esses microrganismos também foram testados quanto à capacidade de produzir enzimas lipolíticas, utilizando-se a semeadura em ágar tributirina suplementado com bromocresol a 1% (v/v) e armazenamento a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por dez dias. A visualização de resultado positivo seria observada pela formação de halo transparente ao redor da colônia, porém nenhum apresentou tal resultado (Metodologia adaptada de MOREIRA e MONTANHINI, 2014; ARAÚJO et al., 2019).

Para a produção dos queijos frescos sem sal, foram preparados inóculos com cada um destes microrganismos para que, posteriormente fossem adicionados ao leite utilizado como matéria-prima deste produto.

- preparação do inóculo: cada um dos microrganismos identificados foi cultivado em 20mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI), a temperatura de $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante sete dias. A multiplicação dos microrganismos no meio líquido foi conferida com o auxílio da escala nefelométrica de Mc Farland, onde a turvação obtida pelo crescimento do número de bactérias era comparada aos tubos diluídos com diferentes concentrações de sulfato de bário. Uma alíquota de cada inóculo (1 mL) foi adicionado a 1 litro de leite pasteurizado com gordura padronizada a 3%, para obtenção de uma concentração final do microrganismo inoculado de 10^6 UFC/mL de leite. O leite contaminado foi

armazenado por 48 ou 72 h a $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Para garantir o controle do processo, um litro de leite que não recebeu inóculo foi acondicionado nas mesmas condições dos que os receberam. Após o período de armazenamento, uma alíquota de 1mL de cada leite foi retirada para que fosse quantificadas a atividade enzimática de proteases, conforme método descrito por Nornberg, Tondo e Brandelli (2009). As análises foram realizadas em duplicata.

- preparação do queijo fresco sem sal: Após o armazenamento, cada litro de leite foi pasteurizado (pasteurização lenta, aquecimento a 65°C , manutenção nesta temperatura por 30 min e resfriamento rápido a 5°C). Após a pasteurização, uma alíquota de 1mL de cada leite foi retirada para que fosse quantificada a atividade enzimática de proteases. O leite foi, então, aquecido a 38°C e adicionado 1 mL de cloreto de cálcio a 20%. Após breve homogeneização foram adicionados 5 mL de solução de quimosina microbiana com poder coagulante de 1:3000 75 IMCU diluída em água sem cloro e estéril na proporção de 1:10 (a recomendação do fabricante é de 7 a 9mL de quimosina microbiana diluídos em 150mL de água para cada 10L de leite) e a mistura foi deixada em banho-maria a $38^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 40 min. A massa resultante da coagulação do leite foi cortada e agitada por 10 min para promover a separação do soro. O conteúdo foi vertido em uma forma para queijos estéril e deixado em repouso por 30 min, quando foi realizada a viragem. Após outros 30 min, o queijo fresco resultante foi acondicionado em recipientes plásticos estéreis e armazenado em refrigeração a $4^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por dez dias. Não foi realizada a salga do produto para evitar que os teores de sal interferissem no seu rendimento final. Os queijos foram produzidos em duplicata e realizadas três repetições. Após 10 dias, os queijos foram retirados dos recipientes plásticos e pesados em balança de precisão digital. Tal aferição foi útil na obtenção dos rendimentos, cujo cálculo é baseado no volume de litros de leite necessários para produzir um quilo de queijo. A seguir foram quantificados os teores de gordura, umidade, proteína e acidez titulável. As análises foram realizadas em duplicata.

- análise estatística: Os microrganismos utilizados para contaminar intencionalmente o leite utilizado na produção dos queijos serão denominados tratamentos, a fim de facilitar a discussão dos resultados. Os resultados médios da atividade enzimática do leite utilizado como matéria-prima para a produção dos queijos, assim como resultados médios características físico-químicas e rendimento, foram comparados por ANOVA, avaliando-se suas diferenças de acordo com o microrganismo

inoculado e os diferentes tempos de armazenamento. Para diferenças significativas ($p < 0,05$), o teste de Tukey foi aplicado para identificar grupos com médias homogêneas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios da atividade enzimática de proteases dos leites utilizados como matérias-primas para a produção dos queijos frescos sem sal são apresentados na tabela 1.

Tabela 1

Médias da quantificação das atividades enzimáticas (U/mL) dos leites utilizados como matéria-prima do queijo fresco sem sal

Tratamento (B.I)	TA h	Atividade enzimática (U/mL)	
		Antes da pasteurização	Após a pasteurização
<i>Pseudomonas</i> sp.	48	2,19±0,81 ^{Aa}	0,68±0,18 ^{Aa}
	72	1,90±0,39 ^{Aa}	0,93±0,84 ^{Aa}
<i>Alcaligenes</i> sp.	48	1,52±1,21 ^{Aa}	1,20±0,43 ^{Aa}
	72	1,79±1,15 ^{Aa}	0,79±1,07 ^{Aa}
<i>Butiauxella</i> sp.	48	1,63±0,87 ^{Aa}	0,76±0,78 ^{Aa}
	72	2,06±0,83 ^{Aa}	0,92±0,99 ^{Aa}
Controle (não inoculado)	48	1,61±0,44 ^{Aa}	0,59±0,85 ^{Aa}
	72	1,82±0,10 ^{Aa}	0,72±0,95 ^{Aa}

B.I = Bactéria inoculada em leite pasteurizado; TA = Tempo em horas de armazenamento do leite a $7^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$. U = Unidade

Embora não tenha sido observada diferença significativa, o valor mais elevado de atividade enzimática antes da pasteurização foi observado no leite contaminado com o inóculo da bactéria pertencente ao gênero *Pseudomonas* após 48h de armazenamento a $7^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Após a pasteurização lenta, a maior média de atividade enzimática de proteases foi obtida no leite armazenado por 48h com inóculo de bactéria do gênero *Alcaligenes* sp.

Microrganismos psicrotróficos são conhecidos por sua capacidade de produzir enzimas termoestáveis, principalmente proteases e lipases. Bactérias do gênero *Pseudomonas*, que fazem parte da microbiota do leite cru, são conhecidas produtoras de proteases, inclusive termoestáveis. A produção destas enzimas aumenta na fase estacionária do crescimento bacteriano, o que justificaria o resfriamento do leite na tentativa de aumentar o período de tempo para que esta fase seja atingida, além de inibir

a multiplicação de microrganismos mesófilos, principais deteriorantes do leite (BAUR et al, 2015; STOECKEL et al., 2016; MARCHAND et al., 2017; ALVES et al., 2018; TEIDER JUNIOR et al., 2019; YUAN et al., 2019).

A atividade enzimática de proteases, observada após a pasteurização lenta, indica que parte das enzimas proteolíticas produzidas pelos microrganismos psicotróficos presentes no leite é termoestável. Seus efeitos na composição do queijo fresco sem sal foram avaliados mediante análise do rendimento e das características físico-químicas como percentuais de proteína, gordura e umidade, além da acidez titulável. Os resultados destas podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2

Médias dos percentuais de gordura, proteína, umidade, acidez e rendimento dos queijos frescos sem sal

Tratamento (B.I)	TA h	%Gordura	%Proteína	%Umidade	Acidez (gac.lat/100g)	Rendimento
<i>Pseudomonas</i> sp.	48	13,31±0,92 ^{Aa}	14,64±0,63 ^{Aa}	62,87±3,44 ^{Aa}	0,077±0,008 ^{Aa}	3,46±0,11 ^{Aa}
	72	11,14±1,66 ^{Aa}	13,85±1,40 ^{Aa}	64,70±4,60 ^{Ab}	0,073±0,006 ^{Aa}	4,00±0,05 ^{Ab}
<i>Alcaligenes</i> sp.	48	13,92±0,76 ^{Aa}	14,92±1,97 ^{Aa}	63,94±2,47 ^{Aa}	0,097±0,043 ^{Aa}	3,96±0,68 ^{Aa}
	72	14,16±0,40 ^{Aa}	15,34±1,55 ^{Aa}	67,05±0,16 ^{Ab}	0,04±0,008 ^{Aa}	4,62±0,22 ^{Ab}
<i>Butiauxella</i> sp	48	13,83±0,81 ^{Aa}	14,4±3,25 ^{Aa}	63,65±1,38 ^{Aa}	0,086±0,025 ^{Aa}	4,01±1,16 ^{Aa}
	72	13,59±0,00 ^{Aa}	14,99±3,26 ^{Aa}	70,25±4,28 ^{Ab}	0,075±0,035 ^{Aa}	4,44±0,35 ^{Ab}
Controle (não inoculado)	48	12,70±0,61 ^{Aa}	13,97±0,89 ^{Aa}	64,07±3,66 ^{Aa}	0,11±0,097 ^{Aa}	3,76±0,80 ^{Aa}
	72	14,07±1,50 ^{Aa}	14,45±0,36 ^{Aa}	65,78±1,12 ^{Ab}	0,08±0,024 ^{Aa}	4,03±0,22 ^{Ab}

B.I = Bactéria inoculada em leite pasteurizado; TA= Tempo em horas de armazenamento do leite a 7°±1°C. gac.lat= gramas de ácido láctico/100mL

A, B,...: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (P<0,05) em relação aos microrganismos inoculados. a, b,...: Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey em relação ao tempo de incubação (P<0,05).

Os teores de gordura, proteína e ácido láctico não apresentaram diferenças significativas entre os queijos produzidos nos diferentes tratamentos e tempos de armazenamento.

Percentuais de umidade foram significativamente maiores nos tempos de armazenamento de 72h, independente do tratamento ao qual foram submetidos. Maiores períodos de armazenamento de leite cru, assim como maiores temperaturas de resfriamento, estão associados a maiores teores de umidade em queijos prontos conforme observado por Bastos (2015). Maiores períodos de armazenamento propiciam maiores crescimentos da microbiota psicotrófica e aumentam a possibilidade de serem produzidas proteases e lipases, que degradam seus substratos no leite. A caseína, neste

caso, pode possuir sítio para a ação destas proteases bacterianas, resultando na formação de peptídeos menores ou sua modificação. Isso afeta diretamente o teor de umidade no coágulo, já que ligações fortes formadas na rede tridimensional de caseínas durante a cisão por enzimas coagulantes são responsáveis pela expulsão das moléculas de água da trama, tornando-a mais concentrada (maior percentual de sólidos). Havendo formação de ligações fracas, devido à proteólise por enzimas bacterianas, há favorecimento da retenção de água na trama, aumentando a umidade dos queijos resultantes.

O rendimento dos queijos foi significativamente menor ($P < 0,05$) nos períodos de armazenamento de 72h, independente do tratamento ao qual foram submetidos. Resultados semelhantes foram obtidos por Coelho et al. (2016), onde maiores percentuais de umidade no queijo minas frescal também estão associados a rendimentos menores. Os menores rendimentos podem estar relacionados a perdas no corte e enforme da massa do queijo, devido à formação de coágulo frágil. A proteólise da caseína por enzimas bacterianas faz com que a repulsão eletrostática das micelas não seja suficientemente diminuída, não formando coágulos firmes.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As características físico-químicas e o rendimento dos queijos frescos sem sal produzidos com leites contaminados com *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. ou *Butiauxella* sp. não foram diferentes entre si, nem diferentes dos queijos produzidos com leite não inoculado (controle) quando o leite utilizado foi armazenado por 48h sob refrigeração. Porém, o maior tempo de armazenamento (72h) contribuiu para a redução do rendimento e aumento dos teores de umidade dos queijos produzidos.

REFERENCIAS

ALVES, Maura P. et al. Temperature modulates the production and activity of a metalloprotease from *Pseudomonas fluorescens* 07A in milk. *Journal of dairy science*, v. 101, n. 2, p. 992-999, 2018.

ARAÚJO, Lorena Gonçalves et al. Identificação de atividade deteriorante e do gene apr na microbiota isolada de leite cru em Caxias, MA. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 74, n. 4, p. 219-230, 2019.

BASTOS, R.A. Influência do armazenamento e da contagem de bactérias psicotróficas do leite nas características do queijo prato durante a maturação. 2015. 209f. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

BAUR, Claudia et al. Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, v. 49, p. 23-29, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 31 dez. de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 30 de nov. de 2018.

COELHO, Kamila Soares et al. Influência da qualidade do leite cru refrigerado no rendimento e composição do queijo Minas Frescal1. *ANAIS SIMPAC*, v. 8, n. 1, 2018.

MARCHAND, Sophie et al. Destabilization and off-flavors generated by *Pseudomonas* proteases during or after UHT-processing of milk. *International Journal of Food Contamination*, v. 4, n. 1, p. 2, 2017.

MOREIRA, Nayara Vilarins; MONTANHINI, Maike Taís Maziero. Contaminação do leite na ordenha por micro-organismos proteolíticos e lipolíticos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 8, n. 2, p. 29-38, 2014.

NÖRNBERG, Maria de Fátima Barros Leal; TONDO, Eduardo César; BRANDELLI, Adriano. Bactérias psicotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 37, n. 2, p. 157-163, 2009.

STOECKEL, Marina et al. Heat stability of indigenous milk plasmin and proteases from *Pseudomonas*: A challenge in the production of ultra-high temperature milk products. *International Dairy Journal*, v. 61, p. 250-261, 2016.

TEIDER JUNIOR, Pedro I. et al. *Pseudomonas* spp. e outros micro-organismos psicotróficos em queijos Minas Frescal inspecionados e não inspecionados: potencial proteolítico, lipolítico e produção de AprX. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 39, n. 10, p. 807-815, 2019.

TILOCCA, Bruno et al (no prelo). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, v. 210, p. 103534.

YUAN, Lei et al. Insights into psychrotrophic bacteria in raw milk: a review. *Journal of food protection*, v. 82, n. 7, p. 1148-1159, 2019.