



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

GRAZIELE APARECIDA CHIUCHI GARCIA

Efeito de enzimas proteolíticas, de origem vegetal e microbiana, e da temperatura de maturação nas características de queijo Prato com teor reduzido de gordura

**São José do Rio Preto
2010**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

GRAZIELE APARECIDA CHIUCHI GARCIA

Efeito de enzimas proteolíticas, de origem vegetal e microbiana, e da temperatura de maturação nas características de queijo Prato com teor reduzido de gordura

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimento junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Barretto Penna

**São José do Rio Preto
2010**

Garcia, Grazielle Aparecida Chiuchi.

Efeito de enzimas proteolíticas, de origem vegetal e microbiana, e da temperatura de maturação nas características de queijo Prato com teor reduzido de gordura / Grazielle Aparecida Chiuchi Garcia. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

132 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Ana Lúcia Barretto Penna

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Queijo. 2. Queijo prato – Análise. 3. Baixa caloria (Alimentos). 4. Proteólise. 5. Fastuosáina. 6. Protemax®403. 7. Queijo - Inovações tecnológicas. 8. Queijo – Teor de gordura. I. Penna, Ana Lúcia Barretto. II.

Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

GRAZIELE APARECIDA CHIUCHI GARCIA

Efeito de enzimas proteolíticas, de origem vegetal e microbiana, e da temperatura de maturação nas características de queijo Prato com teor reduzido de gordura

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimento junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Barretto Penna
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a Dr^a Ariene G. Fernandes Van Dender
Professor Doutor
Instituto de Tecnologia de Alimentos

Prof^a Dr^a Elisa Helena Giglio Ponsano
Professor Assistente Doutor
UNESP – Araçatuba

Prof. Dr. Hamilton Cabral
Professor Doutor
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Roberto da Silva
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 21 de setembro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Processo n° 2007/59918-6) pela concessão de auxílio para a realização deste projeto.

À minha família pela paciência e, principalmente a Deus por me dar força para buscar e alcançar meus objetivos.

RESUMO GERAL

O queijo Prato é o principal queijo maturado brasileiro e o segundo tipo de queijo mais consumido no Brasil. O produto desenvolve características próprias durante o processo de maturação, que deve ser de no mínimo 25 dias. Sua versão com teor reduzido de gordura tem sido objeto de estudos devido à importância que se tem dado aos alimentos pouco calóricos. Queijos com teor reduzido de gordura normalmente necessitam de um maior período para adquirir suas características organolépticas. Neste trabalho, a temperatura de maturação e a adição de enzimas proteolíticas, de origem vegetal (fastuosaína) e microbiana (Protemax® 403), foram avaliadas durante a maturação do queijo Prato. Os índices de maturação dos queijos foram maiores com o uso da enzima Protemax® 403 com atividade enzimática 1.200.000 U. e temperatura de maturação de 12°C. A adição das enzimas promoveu aumento na concentração de compostos voláteis (ácidos carboxílicos, álcoois, cetonas e compostos sulfurados) sem afetar o perfil de ácidos graxos durante a maturação do queijo Prato com teor reduzido de gordura. A partir destes resultados, o efeito da adição da enzima proteolítica Protemax® 403 sobre as características microbiológicas, físicas e sensoriais dos queijos foi conduzido. O uso da Protemax® 403 não influenciou a população de bactérias lácticas, a composição físico-química e a capacidade de derretimento dos queijos, porém, modificou os valores de pH, a acidez, os índices de maturação, a textura, a microestrutura e as características sensoriais. Tais resultados levam à conclusão que a enzima de origem microbiana teve papel significativamente positivo na maturação do queijo Prato com teor reduzido de gordura.

Palavras chave: alimentos de baixa caloria, proteólise, fastuosaína, Protemax® 403, desenvolvimento tecnológico.

GENERAL ABSTRACT

Prato cheese is the main Brazilian ripened cheese and the second most consumed cheese in Brazil. The product develops its characteristics during the ripening process which must be of at least 25 days. Cheeses with reduced fat content have been studied due to the importance that has been given to low calorie foods. These products normally need a large period to acquire these organoleptic characteristics. In this work, the temperature of ripening and the addition of proteolytic enzymes, of vegetal (fastuosaina) and microbial (Protamax® 403) origin were studied during the ripening of Prato cheese. The proteolysis indices of the cheeses were highest with the use of Protamax® 403 with enzymatic activity 1.200.000 U and ripening temperature of 12 °C. Enzyme addition provided an increase in the concentration of volatile compounds (carboxylic acid, alcohol, ketones and sulphur compounds) and they had no influence on the free fatty acid profile of the reduced fat Prato cheese, during ripening. From these results, the effect of the addition of the proteolytic enzyme (Protamax® 403), on the microbiological, physical and sensorial characteristics of the cheese, were studied. The use of proteolytic enzyme Protamax® 403 did not influence the population of lactic bacteria, the physicochemical composition nor the meltability of the cheeses. However, it modified pH values, acidity, proteolysis indices, texture, microstructure and sensorial characteristics. From these results it can be concluded that the microbial enzyme had a positive action on the ripening of reduced fat content Prato cheese.

Key words: low-calorie foods, proteolysis, fastuosain, Protamax® 403, technological development.

APRESENTAÇÃO

Esta tese é constituída por uma introdução, pelos objetivos gerais do projeto de pesquisa e pela revisão bibliográfica (Capítulo 1). O desenvolvimento do projeto foi realizado em etapas e as atividades desenvolvidas foram organizadas em três capítulos, os quais serão submetidos à publicação em revistas científicas especializadas nacionais e internacionais.

O Capítulo 2 aborda o efeito das variáveis: temperatura de maturação (6°C e 12°C) e do tipo de enzima proteolítica, de origem vegetal (fastuosaína) e microbiana (Protemax® 403), na composição centesimal e nos índices de proteólise do queijo Prato com teor reduzido de gordura. Os índices de maturação dos queijos foram maiores com o uso da enzima Protemax® 403 com atividade enzimática 1.200.000 U. e temperatura de maturação de 12°C.

O Capítulo 3 aborda o estudo do perfil de ácidos graxos e de compostos voláteis em queijo Prato com teor reduzido de gordura, adicionado das enzimas proteolíticas, fastuosaína e Protemax(R) 403. O aumento da temperatura de maturação e a adição de enzimas proteolíticas proporcionaram aumento na concentração de compostos voláteis (ácidos carboxílicos, álcoois, cetonas e compostos sulfurados) e não influenciou o perfil de ácidos graxos, com predominância dos de cadeia longa, saturados e monoinsaturados, durante a maturação do queijo.

O Capítulo 4 aborda o efeito da adição da enzima proteolítica Protemax® 403, com atividade enzimática 1.200.000 U. na composição química, características microbiológicas, físicas e sensoriais de queijo Prato com teor reduzido de gordura, maturado a 12°C. O uso da enzima proteolítica Protemax® 403 não influenciou a população de bactérias lácticas, a composição físico-química e a capacidade de derretimento dos queijos, porém, modificou os valores de pH, a acidez, os índices de maturação, a textura, a microestrutura e as características sensoriais, demonstrando ação significativa da enzima.

ÍNDICE GERAL

1 - INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2. OBJETIVO GERAL	15
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1 – Características do queijo Prato	17
2 – Queijos com teor reduzido de gordura	18
3 – Maturação	21
3.1 - Glicólise	21
3.2 - Metabolismo do citrato.....	24
3.3 - Lipólise.....	26
3.4 - Proteólise.....	27
4 – Aceleração da maturação.....	30
4.1. – Enzimas proteolíticas.....	31
4.2 – Temperatura de maturação	35
REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 2: EFEITO DO TIPO DE ENZIMA E DA TEMPERATURA DE MATURAÇÃO NA PROTEÓLISE DO QUEIJO PRATO COM TEOR REDUZIDO DE GORDURA	44
1 - INTRODUÇÃO	47
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1 – Enzimas proteolíticas.....	49
2.2 – Leite pasteurizado.....	50

2.3 - Fabricação dos queijos	50
2.4 - Caracterização físico-química dos queijos controles e modificados.....	52
2.5 - Avaliação do rendimento dos queijos	53
2.6 - Análise estatística dos resultados experimentais.....	53
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.1 – Resultados da caracterização das amostras de leite utilizadas para a fabricação dos queijos.....	54
3.2 – Resultados da avaliação do rendimento dos queijos	56
3.3 - Resultados da caracterização físico-química dos queijos controles e modificados	57
CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS	67

CAPÍTULO 3: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM QUEIJO PRATO COM TEOR REDUZIDO DE GORDURA ADICIONADO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	72
1 - INTRODUÇÃO	75
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.1 – Fabricação dos queijos.....	77
2.2 - Caracterização dos compostos voláteis por cromatografia gasosa.....	79
2.3 – Caracterização de ésteres metílicos de ácidos graxos por cromatografia gasosa	80
2.4 – Análise estatística	81
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
3.1 – Identificação dos compostos voláteis	81
3.2 – Identificação de ésteres metílicos de ácidos graxos	88

CONCLUSÕES.....	93
REFERÊNCIAS	93
CAPÍTULO 4: EFEITO DA ENZIMA PROTEOLÍTICA PROTEMAX® 403 NA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E NAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS, FÍSICAS E SENSORIAIS DE QUEIJO PRATO COM TEOR REDUZIDO DE GORDURA	96
1 – INTRODUÇÃO	99
2 – MATERIAL E MÉTODOS	101
2.1 – Fabricação dos queijos.....	101
2.2 – Contagem de bactérias ácido-láticas.....	103
2.3 - Composição físico-química.....	103
2.4 – Caracterização dos parâmetros relacionados à maturação	104
2.5 – Características físicas	105
2.6 – Avaliação sensorial - Teste de aceitação	107
2.7 – Análise estatística dos resultados	107
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
3.1 – Evolução da população de bactérias ácido-láticas.....	108
3.2 – Composição físico-química dos queijos	110
3.3 – Características físicas	115
3.4 – Análise sensorial - teste de aceitação	121
CONCLUSÕES.....	127
REFERÊNCIAS	128
CONCLUSÃO GERAL	132

1 - INTRODUÇÃO GERAL

O queijo Prato é o segundo tipo de queijo mais consumido no Brasil, com uma produção média anual de 133.000 t. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS, 2008). Este produto tem uma importante participação no mercado nacional de produtos lácteos, sendo o principal queijo maturado brasileiro. É fabricado por coagulação enzimática, de massa semi-cozida e maturado. Apresenta entre 42-44% de umidade, 1,6-1,9% de sal, 5,2 - 5,4 de pH e 26-29% de gordura, sendo classificado como gordo e de média umidade (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994, BRASIL, 1997).

A procura por produtos lácteos com teor reduzido de gordura vem aumentando, uma vez que estes possuem grande quantidade de proteínas, que podem estar associadas ao efeito anti-obesidade, baixo teor de gordura saturada e colesterol. Estes produtos também apresentam elevados teores de minerais, como cálcio, potássio e magnésio, que auxiliam na redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, principalmente redução da pressão arterial e da agregação plaquetária (SANTOS; GAGLIARDI, 2006). Entretanto, queijos com teores reduzidos de gordura são caracterizados por apresentarem determinados defeitos não observados nos seus correspondentes feitos com teor integral, como corpo borrachento, fraca intensidade de sabor, alterações na firmeza, adesividade e palatabilidade (SILVA et al., 2004).

O queijo Prato apresenta características próprias, que se desenvolvem durante o processo de maturação, que deve ser de no mínimo 25 dias (BRASIL, 1997). Porém, queijos com teor reduzido de gordura normalmente necessitam de um maior período para que adquiram estas características. A etapa de maturação é, geralmente, realizada em condições de temperatura e umidade controladas, 12°C e 80%, respectivamente. Durante a maturação

ocorrem as reações bioquímicas que promovem alterações de sabor, odor, textura e consistência (SILVA, 1998).

Para aumentar a velocidade das reações bioquímicas e químicas que ocorrem no período de maturação de queijos, é necessário utilizar uma tecnologia de aceleração que não altere a qualidade do produto final. Os métodos mais utilizados para acelerar este processo são: elevação da temperatura de maturação, adição de enzimas exógenas no coágulo, uso de culturas atenuadas geneticamente modificadas, adição de bactérias ácido-láticas não provenientes das culturas lácticas como culturas adjuntas e adição de massa solubilizada *slurry*, o qual contém bactérias, enzimas e cofatores (WALLACE; FOX, 1997, SILVA, 1998, SCHULZ, 2003, BARROS, 2005, SILVA, 2006).

A proteólise é considerada a principal reação de formação de peptídeos e aminoácidos livres durante a maturação (VISSER, 1993). Sendo assim, o uso de enzimas proteolíticas para modificar as propriedades funcionais de proteínas tem uma promissora aplicação na indústria de alimentos. A grande vantagem do uso de enzimas comparado com outros agentes inclui a sua especificidade e o fato de serem efetivas em baixas concentrações (MAHAJAN; DUA, 1998).

A utilização de enzimas na aceleração da maturação de queijos tem mostrado resultados satisfatórios, promovendo aumento na concentração de substâncias voláteis nos queijos e nos índices de extensão da maturação, além de desenvolvimento de características desejáveis em um menor tempo (MINUSSI; FURTADO; MOSQUIM, 1995, SILVA, 1998, IZCO et al., 2000, EL-SONBATY et al., 2002, LEITE; PITARELLO; PENNA, 2003, GARCIA, 2007, GARCIA et al., 2009).

Estudos mostraram que o aumento da temperatura promove redução do período de maturação (O'MAHONY et al., 2006; SHEEHAN, O'SULLIVAN; GUINEE, 2004;

FEENEY; FOX; GUINEE, 2001). Entretanto, são escassos os estudos relacionados a variações nas temperaturas de maturação envolvendo queijo Prato.

Considerando a importância econômica e nutricional do queijo Prato, além da preocupação com a saúde, este estudo analisou o efeito das variáveis: temperatura de maturação e tipo de enzima proteolítica, de origem vegetal e microbiana, sobre a qualidade final do queijo Prato com teor reduzido de gordura, com a finalidade de aprimorar a tecnologia de produção deste derivado de leite.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS. **Queijos**: mercado total brasileiro. São Paulo, 2008.

_____. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 172, 8 set. 1997. p. 19690.

EL-SONBATY, A. H. et al. Ripening acceleration of low fat Edam cheese made by adding fat replaces. **Egyptian Journal of Dairy Science**, Cairo, v. 30, n. 2, p. 267-281, 2002.

FEENEY, E. P.; FOX, P. F.; GUINEE, T. P. Effect of ripening temperature on the quality of low moisture Mozzarella cheese: 1. Composition and proteolysis. **Lait**, Les Ulis, v. 81, n. 4, p. 463-474, 2001.

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 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

_____. et al. Composição de macronutrientes e evolução da maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica fastuosáina. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, p. 69-77, 2009.

IZCO, J. M. et al. Effect of the activity levels of the added proteolytic enzyme mixture on free amino acids in ripening Ossau-Iraty cheese. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, n. 1/2, p. 69-79, 2000.

LEITE, T. D.; PITARELLO, J.; PENNA, A. L. B. Aceleração da maturação de queijo prato pelo uso de enzima proteolítica do fruto verde de gravatá (*Bromelia fastuosa*). In: CONGRESO IBEROAMERICANO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS, 4., 2003, Valparaíso. **Resúmenes de Presentaciones...** Valparaíso: Universidad Técnica Federico Santa María, 2003. p. 65.

MAHAJAN, A.; DUA, S. Improvement of functional properties of rapessed (*Brassica campestris var toria*) meal by reducing antinutritional factors employing enzymatic modification. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 349-355, 1998.

MINUSSI, R. C.; FURTADO, M. M.; MOSQUIM, M. C. A. V. Avaliação de métodos para a aceleração da maturação do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 291, p. 24-30, 1995.

O'MAHONY, J. A. et al. Lipolysis and sensory characteristics of Cheddar cheeses ripened using different temperature-time treatments. **Lait**, Les Ulis, v. 86, n. 1, p. 59-72, 2006.

SANTOS, R. D.; GAGLIARDI, A. C. M. **Saúde e nutrição**. 2006. Disponível em: <<http://www.lactea.org.br/pagina.asp?idS=33&idN=158>>. Acesso em: 10 jul. 2009.

SCHULZ, J. G. **Efeito da utilização de slurry sobre a maturação de queijo Prato**. 2003. 120 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2003.

SHEEHAN, J. J.; O'SULLIVAN, K.; GUINEE, T. P. Effect of coagulant type and storage temperature on the functionality of reduced-fat Mozzarella cheese. **Lait**, Les Ulis, v. 84, n. 6, p. 551-566, 2004.

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

_____. et al. Efeito da redução de gordura na população microbiana e na formação de "flavour" do queijo. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 50, p. 58-61, 2004.

SILVA, C. R. B. **Efeito do uso de *Lactobacillus casei* como cultura adjunta na qualidade tecnológica de queijo Prato com reduzido teor de gordura**. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 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.

WALLACE, J. M.; FOX, P. F. Effect of adding amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture developed. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, n. 2, p. 157-197, 1997.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito das variáveis: atividade enzimática (0 U. e 1.200.000 U.) de enzimas proteolíticas de diferentes origens (vegetal - fastuosaína e microbiana – Protemax® 403) e da temperatura de maturação (6°C e 12 °C) nas características de queijo Prato com teor reduzido de gordura.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 – Características do queijo Prato

Introduzido no Brasil por imigrantes dinamarqueses na década de XX, na região sul de Minas Gerais, o queijo Prato é semelhante ao Gouda e Danbo (CICHOSCKI et al., 2002). Inclui as variedades que podem variar em relação ao formato: Lanche ou Sanduíche, cujo formato é um paralelepípedo de seção transversal retangular, Cobocó (cilíndrico), Esférico ou Bola (esférico), e massa, que pode variar de 0,4 a 5,0 kg. A variedade Lanche praticamente domina o mercado, apresentando-se em vários tamanhos com massas entre 0,5 e 3,0 kg (OLIVEIRA, 1986, BRASIL, 1997).

Atualmente, é um dos queijos mais apreciados no país, com uma produção anual de 133.000 t, sendo, após o Mussarela, o segundo queijo mais consumido (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS, 2008). Sua origem no Brasil se relaciona às primeiras fábricas com finalidades comerciais, uma vez que é um queijo mais elaborado, exigindo um pequeno cozimento da massa.

A Portaria nº 358, de 4 de Setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, define queijo Prato como sendo “o queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementadas ou não pela ação de bactérias lácticas específicas”. É classificado como gordo, devendo conter de 45,0 a 59,9% de matéria gorda no extrato seco, e de média umidade (36 - 46%), além de necessariamente ter de passar pelo processo de maturação por, no mínimo, 25 dias (BRASIL, 1996, BRASIL, 1997).

O queijo Prato é fabricado por coagulação enzimática, adicionado de pequena quantidade de corante natural extraído da semente de urucum, uma árvore denominada *Bixa orellana*. É de massa semi-cozida e, em geral, apresenta entre 42-44% de umidade, 1,6-1,9%

de sal, 5,2 - 5,4 de pH e 26-29% de gordura (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994, OLIVEIRA, 1986).

A cultura láctica utilizada para fabricação do queijo Prato é composta por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, sendo classificada como cocos, Gram positivos e mesofílicos. *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* são homofermentativos, produzindo ácido láctico a partir da lactose. *L. lactis* subsp. *lactis* produz ácido láctico mais rapidamente, o que reduz o período de fabricação, enquanto que o por *L. lactis* subsp. *cremoris* se desenvolve mais lentamente no leite, porém, produz queijos com *flavour* pronunciado. Estas duas subespécies são capazes de se desenvolver a 40°C e possuem a capacidade de produzir NH₃, ornitina e citrulina a partir da arginina. *Lc. lactis* subsp. *lactis* contém a enzima glutamato decarboxilase, que produz ácido γ -aminobutírico a partir do glutamato (FURTADO, 1991, FOX et al., 2000).

2 – Queijos com teor reduzido de gordura

Para os aspectos sensoriais e fisiológicos dos alimentos, a gordura é considerada um importante ingrediente, contribuindo para o sabor, cremosidade, aparência, aroma, odor e influenciando a textura com alterações na firmeza, adesividade e palatabilidade (OLSON; JOHNSON, 1990, PINHEIRO; PENNA, 2004).

O queijo pode ser caracterizado como uma matriz protéica hidratada contendo glóbulos de gorduras dispersos. Sendo assim, uma diminuição do teor de gordura permite uma maior interação protéica, resultando em um produto com textura borrachenta. Os queijos com teor reduzido de gordura geralmente apresentam textura pastosa, sabor atípico, baixa

capacidade de derretimento, além de poucas alterações nas propriedades viscoelásticas com o tempo de armazenamento (MISTRY, 2001, JOHNSON et al., 2009). O desenvolvimento da textura nos queijos ocorre devido à quebra da α_{S1} -caseína durante a maturação, em menor escala em queijos com teor reduzido de gordura, quando comparados aos com teor integral (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987, GUINEE; AUTY; FENELON, 2000, JOHNSON et al., 2009).

Estudos com queijo Cheddar comprovaram que, com a redução da gordura sem alteração no processo tecnológico, o queijo adquire textura mais dura e borrachenta, com redução na adesividade e coesividade (BRYANT; USTUNOL; STEFFE, 1995).

O desenvolvimento de sabor e aroma em queijos é resultante da combinação entre fatores microbiológicos e bioquímicos, responsáveis pela formação de uma mistura heterogênea de compostos voláteis e não voláteis, sendo os principais processos envolvidos para o desenvolvimento destes compostos a proteólise, lipólise e glicólise. As enzimas que catalisam estas reações são originárias do leite, do coagulante, de bactérias pertencentes ou não à cultura lática, de culturas adjuntas e de enzimas exógenas. Uma alteração na proporção de gordura:proteína e de sal:umidade, comum em queijos com teor reduzido de gordura, resulta em uma redução dos compostos produzidos por meio de degradações lipolíticas e proteolíticas. O sabor lipolítico pode ser relacionado diretamente à presença de ácidos graxos livres ou indiretamente a compostos flavorizantes, como cetonas, metil-cetonas e lactonas, resultantes de transformações bioquímicas (SABIONI, 2000, WILKINSON; KILCAWLEY, 2005, JOHNSON et al., 2009).

A capacidade de derretimento dos queijos é influenciada pela interação caseína-fase aquosa, pelo aumento da temperatura, idade, proteólise e níveis de umidade e gordura. A capacidade de derretimento é menor em queijos com teor reduzido de gordura, pois estes, quando submetidos ao aquecimento, desidratam rapidamente, criando uma camada seca que

promove a queima do material e uma redução no seu derretimento. A cor também é afetada quando o teor de gordura é reduzido, pois quando a matriz protéica está mais hidratada, ocorre redução dos centros responsáveis pela difusão da luz e os queijos tornam-se menos opacos (PASTORINO et al., 2002, NARIMATSU et al., 2003, EVERETT; AUTY, 2008, JOHNSON et al., 2009).

O desenvolvimento de queijos com teor reduzido de gordura envolve alterações no processamento que incluem: uso de ultrafiltração do leite, elevação da temperatura de pasteurização para aumentar a desnaturação das proteínas do soro e aumentar sua capacidade de retenção de água no queijo, redução da temperatura e do tempo de cozimento da massa, pH durante a fabricação, quantidade de sal, seleção de culturas lácticas, uso de aditivos como estabilizantes e substitutos de gordura, adição de enzimas exógenas no coágulo e adição de massa solubilizada (*slurry*) (JOHNSON; CHEN, 1995, WALLACE; FOX, 1997, MISTRY, 2001, SILVA; VAN DENDER, 2005, SILVA, 2006, BARROS; RIBEIRO; VIOTTO, 2006, GARCIA, 2007, GARCIA et al., 2009).

Katsuda et al. (1999) relataram que queijos Prato com baixo teor de gordura, fabricados sem alterações no processo tecnológico, apresentaram sabor menos característico em relação ao queijo convencional, além de maior firmeza e elasticidade. Barros, Ribeiro e Viotto (2006) observaram que o uso de ultrafiltração do leite proporcionou um aumento no rendimento de queijo Prato com teor reduzido de gordura quando comparado ao fabricado utilizando-se leite não concentrado. Silva (2006) obteve queijo Prato com reduzido teor de gordura com melhores características quando adicionou culturas adjuntas de *L. casei*. Barros et al. (2006) em estudo com queijo Prato *light* mostraram que o uso de cultura adjunta proporcionou um queijo com maior aceitação em relação à textura, aroma e impressão global. Garcia (2007) e Garcia et al. (2009) demonstraram que o uso de enzimas proteolíticas

melhorou as características físico-químicas, de textura e sensoriais de queijo Prato com teor reduzido de gordura.

3 – Maturação

A maturação é um processo enzimático que envolve uma série de modificações bioquímicas nos principais constituintes do queijo. Essa etapa ocorre em condições de temperatura e umidade controladas, promovendo alterações de sabor, odor, textura e consistência (MORENO et al., 2004, SILVA, 1998).

Estas mudanças bioquímicas podem ser agrupadas em eventos primários, como a glicólise, que incluem o metabolismo da lactose residual, do lactato e do citrato, a lipólise e a proteólise, e eventos secundários, que são importantes para o desenvolvimento de compostos voláteis, que incluem o metabolismo de ácidos graxos e de aminoácidos.

3.1 - Glicólise

Durante o processo de fabricação de queijos e durante os primeiros estágios da maturação, a cultura láctica é responsável pela produção de ácido láctico pela fermentação da lactose. A fermentação dos açúcares ocorre por via glicolítica (Figura 1) ou por via fosfoctolase (Figura 2). Aproximadamente 96% da lactose, principal açúcar do leite, é removida juntamente com o soro durante a fabricação de queijos.

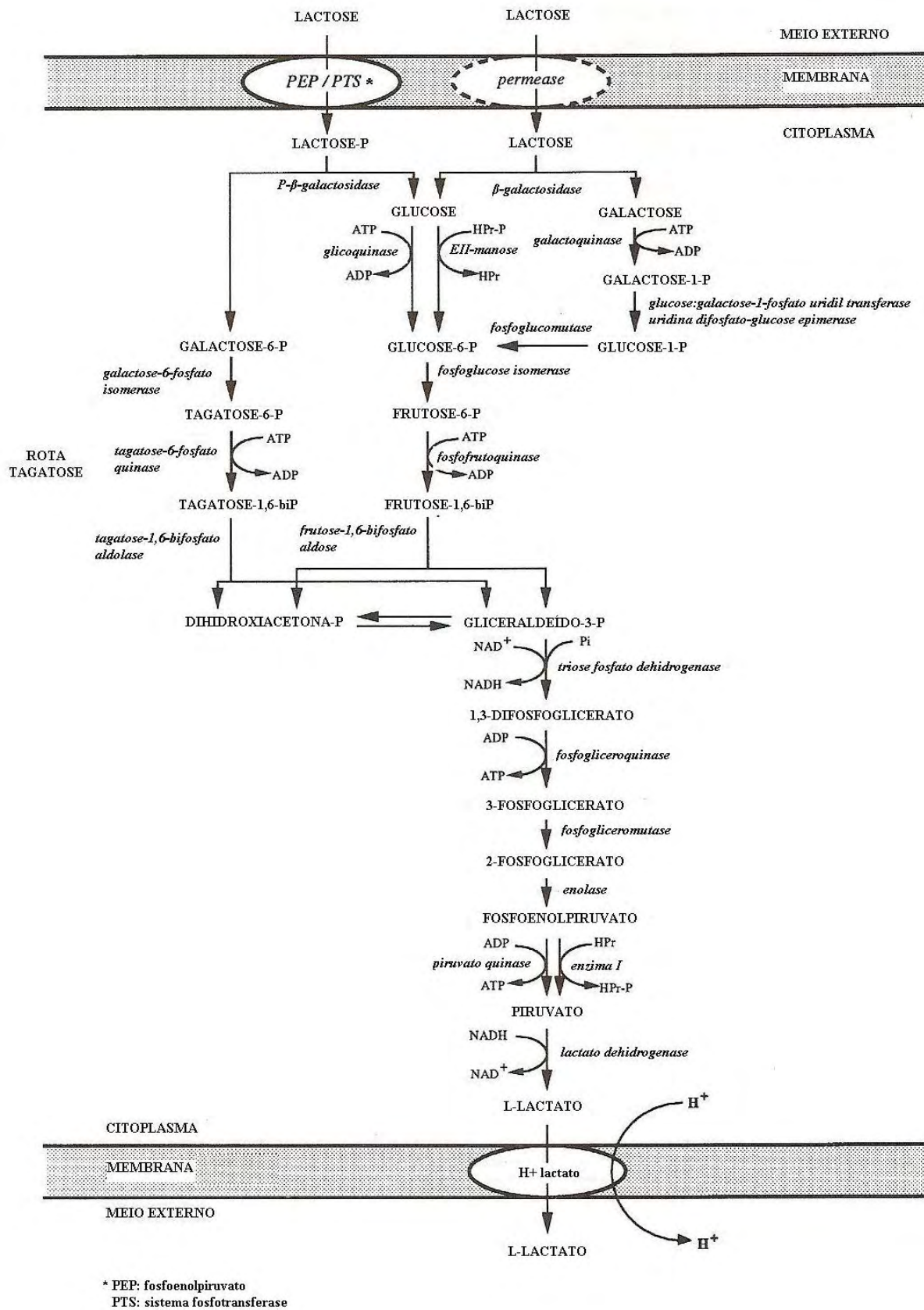


Figura 1 – Via glicolítica do metabolismo da lactose em bactérias ácido lácticas (FOX et al., 2000).

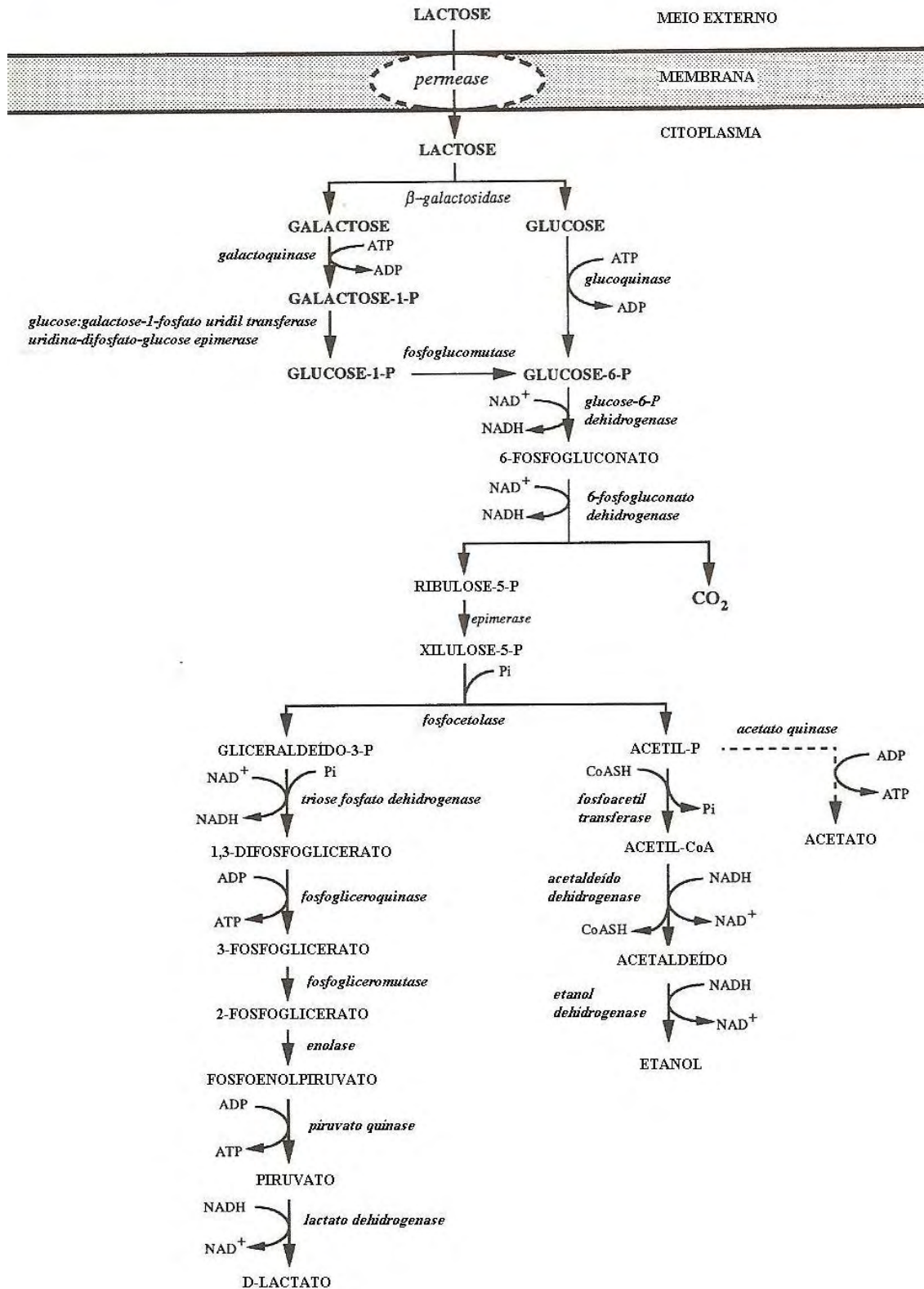


Figura 2 – Via fosfocetolase do metabolismo da lactose em bactérias ácido lácticas (FOX et al., 2000).

A concentração de lactose no queijo depende principalmente do conteúdo de umidade e da lavagem ou não do coágulo. O queijo Cheddar, que passa por uma extensa drenagem atingindo pH de aproximadamente 5,4 contém entre 0,8 e 1,0% de lactose. Queijos em que parte do soro é removido e substituído por água o que minimiza variações no pH, e em que o coágulo apresenta menor sinérese e alto pH (6,2 – 6,3), como o queijo Gouda, contém cerca de 3,0% de lactose na massa. Porém, a lactose residual é rapidamente metabolizada a L-lactato durante os primeiros estágios de maturação, variando de acordo com a temperatura e os níveis de sal/umidade, que influenciam a ação de bactérias lácticas. Variações na concentração de lactose afetam o pH final dos queijos que, por sua vez, afeta a textura, atividade de enzimas e o desenvolvimento da microbiota não pertencente à cultura láctica (FOX et al., 2000, McSWEENEY, 2004).

3.2 - Metabolismo do citrato

O citrato encontra-se em concentração relativamente baixa no leite, 1750 mg/L, sendo que 90% são solúveis e perdidos no soro. O citrato é um importante precursor de compostos responsáveis pelo *flavour* em certas variedades de queijos que utilizam culturas mesofílicas (Figura 3). Muitas culturas lácticas utilizadas na fabricação de queijos, como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus* subsp. e *Streptococcus thermophilus* não metabolizam o citrato. Em queijos holandeses, que contêm cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Leuconostoc* spp., ocorre a conversão do citrato a diacetil na presença de açúcares fermentescíveis durante o processo de fabricação e nos estágios iniciais da maturação. O CO₂ produzido neste processo é responsável pelas pequenas olhaduras

características destes queijos e o diacetil é um importante composto responsável pela formação de aroma em queijos não maturados, como o Cottage (FOX et al., 2000; McSWEENEY, 2004).

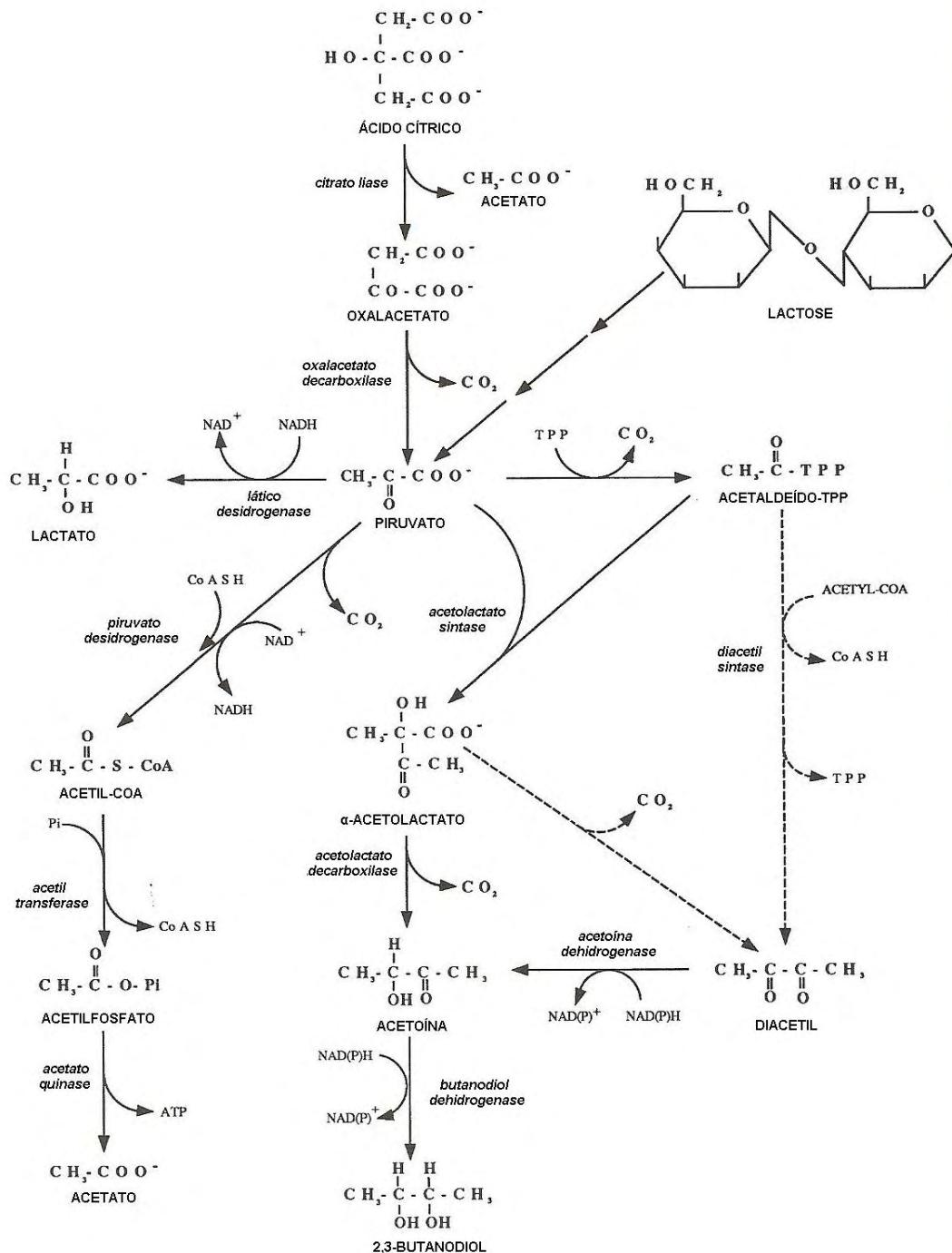


Figura 3 – Metabolismo do ácido cítrico em bactérias ácido lácticas (FOX et al., 2000).

3.3 - Lipólise

Durante o processo de maturação ocorre a lipólise das gorduras com formação de ácidos graxos de baixa massa molecular (Figura 4), por ação de micro-organismos e/ou enzimas adicionadas para este fim. Os triglicerídeos presentes na gordura do leite são ricos em ácidos graxos de cadeia curta que, quando liberados contribuem significativamente para o desenvolvimento de *flavour* em muitas variedades de queijos.

Em alguns queijos como nos italianos e azuis, a lipólise ocorre mais extensivamente quando comparado a outros queijos como o Cheddar, Gouda e Suíços. Os principais ácidos formados são butírico, capróico, caprílico e láurico, com a proporção variando de acordo com o agente lipolítico (COSTA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; FOX et al., 2000; PERRY, 2004; McSWEENEY, 2004). Em queijo Prato, Rocha (2004) verificou a presença dos ácidos graxos palmítico, oléico, esteárico, mirístico, elaídico, láurico, cáprico e palmitoléico, com a predominância de ácidos graxos de cadeia longa (> 12 carbonos), devido ao curto período de maturação.

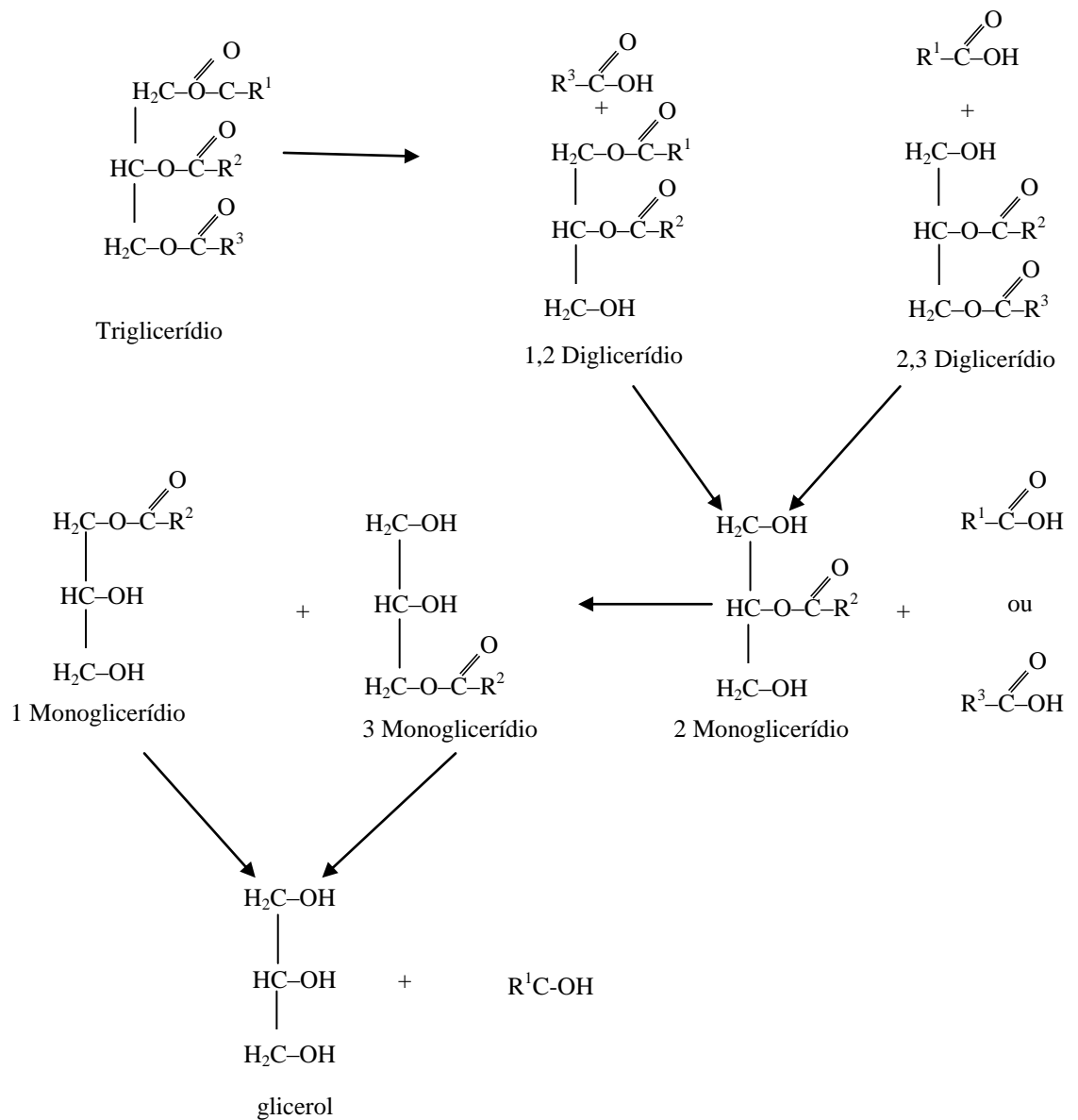


Figura 4 - Hidrólise dos triglicéridos pelas lipases (FOX et al., 2000).

3.4 - Proteólise

Entre os processos bioquímicos que ocorrem durante a maturação de queijos, a proteólise é o mais complexo e importante, sendo responsável por mudanças na textura, como dureza, elasticidade, coesividade, fraturabilidade, capacidade de derretimento, adesividade e

propriedades emulsificantes, além da contribuição nas características de *flavour*, por meio da formação de pequenos peptídeos e aminoácidos (FOX et al., 2000).

As peptidases que catalisam a proteólise da caseína em queijos durante a maturação são originárias de seis fontes principais: coagulante, leite, cultura láctica, cultura secundária (não pertencente à cultura láctica), uma complexa microbiota de bactérias Gram-positivas que contaminam a superfície dos queijos e, em certos casos, de enzimas exógenas adicionadas ao leite ou ao coágulo para acelerar a maturação (McSWEENEY, 2004). O equilíbrio entre as ações combinadas de enzimas coagulantes, peptidases nativas do leite e extracelulares de bactérias pertencentes e não pertencentes à cultura láctica, degradam a caseína em grandes fragmentos peptídicos, que posteriormente serão degradados em aminoácidos e peptídeos menores por peptidases extra e intracelulares de bactérias ácido lácticas. Estes aminoácidos são então convertidos por enzimas de bactérias ácido-lácticas em componentes voláteis que contribuem para o desenvolvimento de sabor e aroma em queijos e indiretamente para a ação de precursores de compostos aromáticos, como aminas, ácidos, álcoois e ésteres (VISSER; VAN DEN BERG, 2002; GOROSTIZA et al., 2004).

As enzimas plasmina (proteinase nativa do leite), quimosina ou outro agente coagulante, proteinases e peptidases produzidas pela cultura lácticas e enzimas não provenientes da cultura (*non starter lactic acid bacteria* – NSLAB) contribuem para a proteólise, dando origem a compostos aromáticos voláteis (VISSER, 1993, FOX; O'COONOR; McSWEENEY, 1996, WALLACE; FOX, 1997, WILKINSON, KILCAWLEY, 2005). O tempo de maturação depende do tipo de queijo, sendo que a temperatura, o pH e a concentração de sal são fatores que determinam a atividade enzimática.

A proteólise em queijos pode ser dividida em três partes. A primeira fase está relacionada ao período anterior à fabricação, em que a proteólise é proveniente da ação de proteinases naturais do leite e de origem microbiana. Durante a coagulação enzimática ocorre

a segunda fase da proteólise, em que as enzimas proteolíticas com alta atividade em pH ácido, como a quimosina, atuam sobre a κ -caseína e hidrolisam a ligação entre os aminoácidos 105-106 (fenilalanina-metionina). A terceira fase ocorre durante o período de maturação, sendo realizada por enzimas coagulantes, enzimas naturais do leite, de bactérias lácticas selecionadas, de cultura não láctica (mofos e leveduras) e de bactérias não desejadas (psicrotróficos), que resistem à pasteurização ou que ocorrem em queijos como contaminantes durante a fabricação (COSTA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998).

Na degradação da α_{s1} -caseína, a quimosina presente no coalho rompe a ligação Phe(24)-Val(25), resultando em um polipeptídeo solúvel (1 a 24) e em um fragmento insolúvel C-terminal α_{s1-I} (25 a 199). Essa ação ocorre em amplo intervalo de pH (2,2 a 7,0) e independe da concentração de NaCl. Em seguida, a quimosina age no polipeptídeo α_{s1-I} nas ligações Leu(169)-Gly(170), Leu(149)-Phe(150) e Phe(150)-Arg(151), resultando nos peptídeos α_{s1-II} (25 a 169), α_{s1-III} (25 a 149) e α_{s1-IV} (25 a 150) em um intervalo de pH entre 5,8 e 7,0. Em solução com pH 6,5, a quimosina hidrolisa a β -caseína em fragmentos partindo do N-terminal: $\beta-I$ (1 a 189/192), $\beta-II$ (1 a 165/167), $\beta-IIIa$ (1 a 139) e $\beta-IIIb$ (1 a 127). A degradação da β -caseína pela plasmina produz: γ_1 (29 a 209), γ_2 (106 a 209) e γ_3 (108 a 209), e os peptídeos PP8F (1 a 28), PP5 (1 a 105) e PP5a (1 a 107) (ORDÓÑEZ et al., 2005).

A proteólise em queijos pode ser caracterizada pelas análises da relação entre o nitrogênio solúvel e nitrogênio total. A relação entre o teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) e nitrogênio total (NT) é caracterizado pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis na fase aquosa dos queijos, resultantes da degradação da caseína pelo coagulante e acumuladas durante a maturação. A relação entre nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS TCA 12%) é proporcional à ação de endo e exopeptidases bacterianas que liberam aminoácidos e outros compostos nitrogenados de baixa massa molecular (SILVA, 1998, COSTA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998).

4 – Aceleração da maturação

O processo de maturação apresenta um alto custo, pois demanda, em geral, instalações especiais com temperatura e umidade controladas, além de diminuir o capital de giro do produtor, uma vez que retarda a comercialização do produto (PERRY, 2004).

A necessidade de se diminuir o tempo de maturação de queijos é uma questão mundial e desperta interesse em pesquisadores de diversos países. A etapa de maturação difere principalmente em relação ao tempo, temperatura e umidade, sendo que o período de maturação de queijos de variedades como Cheddar e tipos Suíço e Italiano podem se estender de 6 meses até 3 anos, implicando em um alto custo de produção (WILKINSON, KILCAWLEY, 2005).

Para aumentar a velocidade das reações bioquímicas e químicas que ocorrem no período de maturação do queijo, é necessário utilizar uma tecnologia de aceleração que não altere a qualidade do produto final. Pesquisas com estas finalidades fundamentam-se em processos indiretos, com aumento da atividade de enzimas presentes nos queijos, por meio de modificações na composição e elevação da temperatura de maturação e em processos diretos, com adição de enzimas exógenas, uso de culturas lácticas adjuntas selecionadas e modificadas, que promovam elevação dos níveis e/ou aumento da liberação de enzimas (WILKINSON; KILCAWLEY, 2005). Os métodos mais utilizados para acelerar o processo de maturação são: elevação da temperatura de maturação, adição de enzimas exógenas no coágulo, uso de culturas atenuadas geneticamente modificadas, adição de massa solubilizada (*slurry*), o qual contém bactérias, enzimas e cofatores (WALLACE; FOX, 1997).

Visando acelerar o processo de maturação e melhorar as características de queijos com teor reduzido de gordura, a elevação da temperatura de maturação e a adição de enzimas

exógenas são métodos de fácil execução. Deve-se considerar que a ação da temperatura não estimula apenas a microbiota láctica, mas também a microbiota não láctica presente no queijo. Para aplicação deste método para acelerar a maturação de queijos, torna-se imprescindível a utilização de matérias-primas de elevada qualidade e aplicação de boas práticas de fabricação durante a produção e maturação (CARVALHO; SILVA, 1993, LAW, 2001). Em relação ao uso de enzimas exógenas, a grande vantagem é a especificidade e o fato destas serem efetivas em baixas concentrações (MAHAJAN; DUA, 1998).

4.1. – Enzimas proteolíticas

Entre os métodos que possibilitam a aceleração da maturação, o uso de enzimas é um método a ser considerado, por apresentar ação específica. Enzimas lipolíticas e/ou proteolíticas são adicionadas, em pequenas quantidades, visando melhorar a formação do *flavour* e textura dos queijos, reduzindo o tempo de maturação e, conseqüentemente, liberando o produto mais rapidamente, com menor custo de estocagem. Porém, a escolha da enzima pode apresentar dificuldades para incorporação uniforme na massa e enfrentar possíveis barreiras legais (FOLKERTSMA; FOX; McSWEENEY, 1996, SABIONI, 2000).

Há quatro principais formas de incorporação de enzimas exógenas na produção de queijos: adição junto ao leite, antes da fabricação dos queijos, adicionada à cultura láctica ou ao coagulante, durante a salga seca, ou diretamente ao queijo. A adição de enzimas ao leite foi relatada e patenteada por alguns autores, que descreveram melhoria na proteólise e no desenvolvimento de *flavour* em queijos, como Havarti, Saint-Paulin e Suíço (WILKINSON; KILCAWLEY, 2005). Porém, outros autores argumentam que a adição de enzimas

diretamente ao leite pode não ser adequada, pois ocorrem perdas de enzimas no soro, há distribuição não homogênea, redução no rendimento e produção de queijos de baixa qualidade (KAILASAPATHY; LAM, 2005). A adição de enzimas junto à cultura lática ou ao coagulante não apresentou bons resultados, promovendo a hidrólise prematura da caseína, com redução no rendimento e influência na maturação, sendo que aproximadamente 90% da enzima foram perdidas durante a drenagem do soro. Quando se testou a adição de enzimas durante o processo de salga, ocorreram dificuldades na distribuição de enzima na massa devido ao grau de difusão, tamanho e estrutura da massa. A adição de enzimas ao queijo por meio da injeção à alta pressão não demonstrou aumento de *flavour* e redução no tempo de maturação (WILKINSON; KILCAWLEY, 2005).

Estudos sobre o uso de enzimas encapsuladas em gomas como gelana e κ -carragena para acelerar a maturação de queijos demonstraram aumento na proteólise dos queijos adicionados de enzimas quando comparados aos queijos controle (KAILASAPATHY; LAM, 2005).

As enzimas comerciais podem ser derivadas de três principais fontes: animal, vegetal e microbiana. Enzimas derivadas de fontes animais são geralmente subprodutos de indústrias de carnes, necessitando de alta purificação. As derivadas de fontes vegetais tendem a ser relativamente caras, pois requerem materiais de alta qualidade. As enzimas de origem microbiana são disponibilizadas com uma grande variedade de atividade enzimática e graus de pureza, sendo que a possibilidade de produção por meio de processos fermentativos assegura custos competitivos para estas fontes (WILKINSON; VAN DEN BERG; LAW, 2002).

Enzimas proteolíticas microbianas ou vegetais podem ser utilizadas na maturação de queijos, porém não há estudos de comparação entre os métodos de aceleração, com aplicações em um mesmo produto, mostrando os efeitos observados em cada utilização. Segundo Cabral

(2001, 2005) a enzima proteolítica fastuosáina, extraída do fruto *Bromelia fastuosa* (gravatá), pertencente ao grupo das cisteíno-peptidases, apresenta massa molecular estimada em 24 kDa e atividade máxima em pH próximo ao neutro e temperatura entre 55-60°C. O uso desta enzima foi estudado em queijo Prato com teor integral e com teor reduzido de gordura, maturados a 12°C e 80% UR, mostrando redução no tempo de maturação e desenvolvimento de características desejáveis (LEITE; PITARELLO; PENNA, 2003, PENNA, 2006, GARCIA, 2007, GARCIA et al., 2009).

O desenvolvimento de amargor em queijos ocorre devido à formação de peptídeos de baixa massa molecular, o que é muito comum em queijos com teor reduzido de gordura. A adição de peptidases, responsáveis pela proteólise secundária, pode proporcionar durante a maturação de queijos, a degradação destes peptídeos liberados pela plasmina ou quimosina, reduzindo o amargor e produzindo aminoácidos livres. Endo e exopeptidases com ação específica sobre a prolina podem apresentar um importante papel no processo de maturação de queijos, proporcionando diminuição do amargor, uma vez que a degradação de peptídeos contendo este aminoácido é frequentemente relacionada a esta característica indesejável dos queijos (STEPANIAK, 2004). Estudos com uso combinado de lipases e peptidases têm demonstrado um aumento na proteólise quando comparados ao uso de peptidases isoladamente, sugerindo um efeito sinérgico (WILKINSON; KILCAWLEY, 2005).

Segundo o fabricante, Prozyn Ind. e Com. Ltda, a enzima Protemax® 403 é um produto à base de endo e exopeptidases de grau alimentício derivadas de uma cepa selecionada não geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae*, estando de acordo com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de grau alimentício definidas pela Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO) e *Food Chemical Codex* (FCC). É utilizada para hidrolisar proteínas de moderada a extensivamente, reduzindo o amargor dos hidrolisados. Essa enzima é eficiente na hidrólise de diferentes tipos de proteínas, como gelatina, caseína,

hemoglobina, proteínas de ovos, peixes, aves, entre outras proteínas animais. As condições recomendadas para atuação da enzima proteolítica ProteMax® 403 são pH entre 4,0 a 8,0, com um ótimo entre 5,0 e 7,0 e temperatura entre 25°C e 60°C, com um ótimo em 50°C (PROZYN, 200-).

Segundo Stepaniak (2004) peptidases são utilizadas para produção de proteínas de soro hidrolisadas proporcionando melhoria das propriedades funcionais, e desenvolvimento de *flavour* por meio da produção de hidrolisados ricos em peptídeos bioativos e de queijos modificados enzimaticamente, sendo importantes nas etapas de aceleração da maturação. São relatadas enzimas proteolíticas de origem microbiana produzidas por *Bacillus*, *Aspergillus* e *Rhizomucor niveus*.

Entre as enzimas comerciais produzidas por micro-organismos pode-se destacar a Accelase® e a Savorase™, produzidas por *Lactococcus lactis* e utilizadas em processos de aceleração da maturação de queijos e desenvolvimento de *flavour* típico de queijos e a enzima Enzobact™, produzida por *Lactobacillus helveticus* e testada para acelerar a maturação de queijos duros com teor reduzido de gordura. A lipase FlavourAge™, secretada por *Aspergillus oryzae* apresenta alta especificidade pelos ácidos C₆-C₈, sendo comercializada com o objetivo de acelerar o processo de maturação de queijo Cheddar (FOX et al., 2000, WILKINSON; VAN DEN BERG; LAW, 2002).

A enzima comercial Neutrase®, uma endopeptidase produzida por *Bacillus subtilis*, com condições ótimas de 45-55°C e pH 5,5-7,5, foi adicionada em queijo Prato com teor integral de gordura, maturado a 12°C e 90% UR, mostrando redução no tempo de maturação (SILVA, 1998).

Sood e Kosikowski (1979) em estudos com adição de enzima produzida por *Aspergillus oryzae* em queijo Cheddar, observaram aumento na concentração de aminoácidos

livres nos queijos em que se adicionou a enzima, além de uma maior concentração destes aminoácidos em queijos maturados a 10°C, quando comparados aos maturados a 4,5°C.

Mohedano et al. (1998) estudaram o efeito da adição de uma cisteíno-peptidase produzida por *Micrococcus* sp. INIA 528 durante a maturação de queijo Manchego, observando aumento de peptídeos hidrofóbicos e hidrofílicos, menor firmeza, fraturabilidade e dureza aos 30 dias de maturação, além de melhoria no *flavour* aos 15 dias de maturação nos queijos com adição de enzimas, devido à maior proteólise.

Izco et al. (2000) demonstraram que o uso de preparados comerciais de enzimas proteolíticas promoveu a liberação de aminoácidos livres proporcional à concentração enzimática utilizada em queijos Ossau-Iraty, sendo que os níveis de taurina, tirosina e valina não foram influenciados pelos tratamentos enzimáticos, enquanto que os níveis de serina, glicina, arginina e prolina diminuíram.

A escolha da enzima a ser utilizada em queijos depende de vários fatores, como exigências técnicas, custo, aceitação legal e tendência em causar efeitos adversos na qualidade dos queijos, sendo importantes os estudos sobre sua forma de atuação (WILKINSON, 2002).

4.2 – Temperatura de maturação

Vários estudos foram realizados com o objetivo de se avaliar a ação da temperatura sobre a maturação de queijos (FOLKERTSMA; FOX; McSWEENEY, 1996, FENELON et al., 1999, REHMAN et al., 2000a, REHMAN et al., 2000b, GUINEE; FEENEY; FOX, 2001, FEENEY; FOX; GUINEE, 2001, KUJAWSKI et al., 2003, SIHUPE; ZORRILLA;

RUBIOLO, 2005, ALIZADEH; HAMED; KHOSROSHAHI, 2006, SIHUFÉ; ZORRILLA; RUBIOLO, 2006, KRAGGERUD et al., 2008).

Em estudos com queijo Cheddar com a utilização da temperatura de 12°C foi possível acelerar o desenvolvimento de sabor e textura nesses queijos, reduzindo o tempo de maturação em até 75%, sem que os produtos apresentem defeitos como esfarelamento e falta de maciez (LAW, 2001). O'Mahony et al. (2006) mostraram que um aumento na temperatura de maturação de 8°C para 12°C resultou em um maior acúmulo de ácidos graxos livres. Quando a maturação foi realizada a 0°C e 8°C, os maiores teores de compostos voláteis foram detectados em queijos maturados na maior temperatura. Nesta mesma condição, os queijos apresentaram-se mais esfarelentos e fibrosos, porém menos borrachentos (REHMAN et al., 2000b). Observou-se ainda que a maturação desse tipo de queijo foi acelerada e o sabor intensificado quando o produto foi maturado a 16°C. Porém, a maturação realizada a 12°C foi a mais indicada, uma vez que a textura dos queijos maturados a 16°C tornou-se imprópria após 6 meses (FOLKERTSMA; FOX; MCSWEENEY, 1996). Ong e Shah (2009) efetuaram a maturação a 4°C e 8°C, e observaram que a temperatura de maturação de 8°C promoveu um aumento nos níveis de proteólise e na porcentagem de hidrólise da α_{s1} -caseína e da β -caseína.

Os fatores que produziram efeitos mais significativos na proteólise do queijo tipo Feta foram a temperatura e o tempo de maturação. As melhores características sensoriais foram obtidas utilizando-se 6,7°C de temperatura e 49,5 dias de maturação (ALIZADEH; HAMED; KHOSROSHADI, 2006).

Em queijo tipo Edam, com o aumento na temperatura de maturação de 12 para 15°C, houve uma intensificação na proteólise e os queijos adquiriram propriedades sensoriais desejáveis em um menor período de tempo. A temperatura ótima de maturação foi 12°C; quando se utilizou 15°C, houve a formação de produtos decorrentes da degradação de

aminoácidos, que influenciaram negativamente as propriedades sensoriais do queijo (KUJAWSKI et al., 2003).

Em queijo Mussarela de baixa umidade, o aumento da temperatura de estocagem de 0°C para 15°C resultou em uma redução significativa da concentração de caseína intacta. Houve um aumento da degradação da fração α_{s1} -caseína, indicando maior atividade da quimosina no coágulo, mas o efeito sobre a fração β -caseína não foi tão intenso, indicando menor atividade da plasmina (GUINEE; FEENEY; FOX, 2001, FEENEY; FOX; GUINEE, 2001). Sheehan, O'Sullivan e Guinee (2004) observaram que o aumento na temperatura de estocagem de 4°C para 12°C promoveu um aumento significativo nos níveis de proteólise em queijo Mussarela com teor reduzido de gordura e baixa umidade.

Al-Otaibi e Wilbey (2004), em estudos com queijos brancos, testaram temperaturas de maturação inferiores (5°C) e superiores (10°C) às normalmente utilizadas (8°C) e observaram que o armazenamento a 10°C poderia causar alterações indesejáveis aos queijos, reduzindo a vida de prateleira por até um terço.

Estudos com queijo Fynbo maturados em temperaturas de 5°C, 12°C e 16°C mostraram a importância da temperatura para os processos bioquímicos durante a maturação, uma vez que a hidrólise da fração β -caseína apresentou maior extensão nas maiores temperaturas testadas (SIHUFU; ZORRILLA; RUBIOLLO, 2005).

A influência da temperatura de maturação (9°C e 12°C) sobre o desenvolvimento da microbiota pertencente e não pertencente à cultura lática e de bactérias ácido propiônicas foi estudada por Sheehan; Wilkinson; McSweeney (2008), em queijos semi-duros. Os autores verificaram que o aumento do tempo e da temperatura de maturação proporcionou uma elevação na população de bactérias ácido-propiônicas e nas concentrações de acetatos e propionatos, responsáveis pelo desenvolvimento de sabor adocicado e olhaduras em queijos

Suíços, como Emmental e Gruyère, além de aumento dos índices de proteólises primária e secundária.

Vários estudos sobre a elevação da temperatura de maturação foram realizados, demonstrando a importância de se avaliar seu efeito nas características de queijos. Porém, estudos desta natureza ainda não foram realizados com queijo Prato, que apresenta importância significativa no mercado nacional. Desta maneira, uma avaliação do efeito da temperatura e da adição de enzimas poderá contribuir para o melhor entendimento da bioquímica de maturação dessa variedade de queijo.

REFERÊNCIAS¹

- ALIZADEH, M.; HAMED, M.; KHOSROSHAHI, A. Modeling of proteolysis and lipolysis in Iranian white brine cheese. **Food Chemistry**, London, v. 97, n. 2, p. 294-301, 2006.
- AL-OTAIBI, M. M.; WILBEY, R. A. Effect of temperature and salt on the maturation of white-salted cheese. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 1, p. 57-63, 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS. **Queijos: mercado total brasileiro**. São Paulo, 2008.
- BARROS, C. M. V.; RIBEIRO, A. C. O.; VIOTTO, W. H. Impact of low concentration factor ultrafiltration on the composition and yield of reduced fat Prato cheese. **Desalination**, Amsterdam, v. 200, n. 1/3, p. 555-556, 2006.
- _____. et al. Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo Prato *light*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 11-18, 2006.
- BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 mar.1996.

¹ De acordo com a Norma NBR 6023/2002 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT).

_____. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 172, 8 set. 1997. p. 19690.

BRYANT, A.; USTUNOL, A.; STEFFE, J. Texture of Cheddar cheese as influence by fat reduction. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n. 6, p. 1216-1219, 1995.

CABRAL, H. **Análise funcional e estrutural comparativa da fastuosáina com papaína e bromelinas**. 2005. 150 f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular)–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2005.

_____. **Isolamento e caracterização de uma cisteíno-peptidase de frutos de *Bromelia fastuosa* (gravatá)**. 2001. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.

CARVALHO, F. A.; SILVA, P. H. F. Alternativas para a aceleração da maturação de queijos. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 11, p. 36-38, 1993.

CICHOSCKI, A. K. et al. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 4, p. 329-336, 2002.

COSTA JÚNIOR, L. C. G.; PINHEIRO, A. J. R. Influência da relação caseína/gordura nas características físico-químicas do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, n. 305, p. 29-49, 1998.

EVERETT, D. W.; AUTY, M. A. E. Cheese structure and current methods of analysis. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, n. 7, p. 759-773, 2008.

FEENEY, E. P.; FOX, P. F.; GUINEE, T. P. Effect of ripening temperature on the quality of low moisture Mozzarella cheese: 1. Composition and proteolysis. **Lait**, Les Ulis, v. 81, n. 4, p. 463-474, 2001.

FENELON, M. A. et al. Elevated temperature of ripening of reduced fat Cheddar made with or without lactacin 3147 producing starter culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 1, p. 10-22, 1999.

FOLKERTSMA, B.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 11, p. 1117-1134, 1996.

FOX, P. F.; O'CONNOR, T. P.; McSWEENEY, P. L. H. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 39, p. 163-328, 1996.

_____. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publication, 2000. 587 p.

FURTADO, M. M. A arte e a ciência do queijo. São Paulo: Globo, 1991. 297p.

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 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

_____. et al. Composição de macronutrientes e evolução da maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica fastuosáina. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, p. 69-77, 2009.

GOROSTIZA, A. et al. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal Prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. **Food Chemistry**, London, v. 85, n. 3, p. 407-414, 2004.

GUINEE, T. P.; AUTY, M. A. E.; FENELON, M. A. The effect of fat content on the rheology, microstructure and heat induced functional characteristics of cheddar cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 10, n. 4, p. 277-288, 2000.

_____; FEENEY, E. P.; FOX, P. F. Effect of ripening temperature on low moisture Mozzarella cheese. II. Texture and functionality. **Lait**, Les Ulis, v. 81, n. 4, p. 475-485, 2001.

IZCO, J. M. et al. Effect of the activity levels of the added proteolytic enzyme mixture on free amino acids in ripening Ossau-Iraty cheese. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, n. 1/2, p. 69-79, 2000.

JOHNSON, M. E.; CHEN, C. M. Technology of manufacturing reduced-fat Cheddar cheese. In: MALIN, E. L.; TUNICK, M. H. (Ed.). **Chemistry of structure-functions relationships in cheese**. New York: Plenum Press, 1995. p. 331-338.

_____. et al. Reduction of sodium and fat levels in natural and processed cheeses: scientific and technological aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 3, p. 252-268, 2009.

KAILASAPATHY, K.; LAM, S. H. Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 6/9, p. 929-939, 2005.

KATSUDA, M. S. et al. Caracterização química, sensorial e de textura, de queijo tipo Prato com teor reduzido de gordura. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 39, p. 128-133, 1999.

KRAGGERUD, H. et al. Season and ripening temperature influence fatty acid composition and sensory properties of semi-hard cheese during maturation. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, n. 8, p. 801-810, 2008.

KUJAWSKI, M. et al. Effect of ripening temperature on proteolysis and organoleptic properties of Edam type cheese. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, Wroclaw, v. 6, n. 1, 2003. Disponível em: <<http://www.ejpau.media.pl/volume6/issue1/food/art-04.html>>. Acesso em: 3 mar. 2009.

LAW, B. A. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new

technologies. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4, p. 383-398, 2001.

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

LEITE, T. D.; PITARELLO, J.; PENNA, A. L. B. Aceleração da maturação de queijo prato pelo uso de enzima proteolítica do fruto verde de gravatá (*Bromelia fastuosa*). In: CONGRESO IBEROAMERICANO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS, 4., 2003, Valparaíso. **Resúmenes de Presentaciones...** Valparaíso: Universidad Técnica Federico Santa María, 2003. p. 65.

MAHAJAN, A.; DUA, S. Improvement of functional properties of rapessed (*Brassica campestris var toria*) meal by reducing antinutritional factors employing enzymatic modification. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 349-355, 1998.

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

MISTRY, V. V. Low fat cheese technology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4, p. 413-422, 2001.

MOHEDANO, A. F. et al. The effect of the cysteine proteinase from *Micrococcus* sp. INIA 528 on the ripening process of Manchego cheese. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 5, p. 391-396, 1998.

MORENO, I. et al. Evidências da autólise de bactérias lácticas e seu impacto na proteólise e formação de “flavour” de queijos. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 51, p. 62-66, 2004.

NARIMATSU, A. et al. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo Prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 177-182, 2003. Suplemento.

O'MAHONY, J. A. et al. Lipolysis and sensory characteristics of Cheddar cheeses ripened using different temperature-time treatments. **Lait**, Les Ulis, v. 86, n. 1, p. 59-72, 2006.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: fundamentos tecnológicos**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1986.

OLSON, N. F.; JOHNSON, M. E. Low-fat cheese technology. **Food Engineering International**, Highlands Ranch, v. 15, n. 10, p. 31-37, 1990.

ONG, L.; SHAH, N. P. Probiotic Cheddar cheese: influence of ripening temperature on proteolysis and sensory characteristics of Cheddar cheese. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, n. 5, p. 182-191, 2009.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnología de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 2v.

PASTORINO, A. J. et al. Temperature effect on structure opacity relationships of nonfat mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2106-2112, 2002.

PENNA, A. L. B. Ripening of low fat cheese: experiences from Brazil. In: CHEESE World. München, 2006. 1 CD-ROM.

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

PINHEIRO, M. V. S.; PENNA, A. L. B. Substitutos de gordura: tipos e aplicações em produtos lácteos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 175-186, 2004.

PROZYN. **Protemax**® 403. São Paulo, [200-]. Ficha técnica.

REHMAN, S. U. et al. Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurized milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 10, n. 1/2, p. 45-53, 2000a.

_____. et al. Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurized milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 10, n. 1/2, p. 55-665, 2000b.

ROCHA, F. A. **Análise da gordura total e do perfil de ácidos graxos em queijo Mussarela, Prato e Ricota e comparação dos resultados experimentais com os teóricos**. 2004. 82 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana)-Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

SABIONI, J. G. Contribuição da atividade lipolítica e proteolítica na formação de flavor em queijos e no desenvolvimento de produtos aromáticos de origem láctea. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 312, p. 30-39, 2000.

SHEEHAN, J. J.; O`SULLIVAN, K.; GUINEE, T. P. Effect of coagulant type and storage temperature on the functionality of reduced-fat Mozzarella cheese. **Lait**, Les Ulis, v. 84, n. 6, p. 551-566, 2004.

_____; WILKINSON, M. G.; McSWEENEY, P. L. H. Influence of processing and ripening parameters on starter, non-starter and propionic acid bacteria and on the ripening characteristics of semi-hard cheeses. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, n. 9, p. 905-917, 2008.

SIHUFE, G. A.; ZORRILLA, S. E.; RUBIOLO, A. C. Kinetic of proteolytic of β -casein during ripening of Fynbo cheese salted with NaCl or NaCl/KCl and ripened at different temperatures. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 2, p. 151-156, 2005.

_____; ZORRILLA, S. E.; RUBIOLO, A. C. Secondary proteolysis of Fynbo cheese salted with NaCl/KCl brine and ripened at various temperatures. **Food Chemistry**, London, v. 96, n. 2, p. 297-303, 2006.

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

_____; VAN DENDER, A. G. F. Produtos lácteos com teor reduzido de gordura: importância e estratégias para obtenção e otimização da qualidade sensorial. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 342, p. 3-12, 2005.

SILVA, C. R. B. **Efeito do uso de *Lactobacillus casei* como cultura adjunta na qualidade tecnológica de queijo Prato com reduzido teor de gordura.** 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

SOOD, V. K.; KOSIKOWSKI, F. V. Accelerated Cheddar cheese ripening by added microbial enzymes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 62, n. 12, p. 1865-1872, 1979.

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

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.

_____; VAN DEN BERG, G. The role of proteolytic enzymes in cheese ripening. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 371, p. 6-9, 2002.

WALLACE, J. M.; FOX, P. F. Effect of adding amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture developed. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, n. 2, p. 157-197, 1997.

WILKINSON, M. G. Use of enzyme preparations in cheesemaking (other than rennet). **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 371, p. 4, 2002.

_____; KILCAWLEY, K. N. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 6/9, p. 817-830, 2005.

_____; VAN DEN BERG, G.; LAW, B. A. Technological properties of commercially-available enzyme preparations other than coagulants. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 371, p. 16-19, 2002.

**CAPÍTULO 2: EFEITO DO TIPO DE ENZIMA E DA TEMPERATURA DE
MATURAÇÃO NA PROTEÓLISE DO QUEIJO PRATO COM TEOR REDUZIDO
DE GORDURA**

RESUMO

O queijo Prato tem uma importante participação no mercado nacional de produtos lácteos, sendo o principal queijo maturado brasileiro e o segundo tipo de queijo mais consumido no Brasil. Com a crescente preocupação com a saúde, a busca por lácteos, como o queijo Prato, com reduzido conteúdo de gordura, está aumentando. Porém, a redução ou retirada deste constituinte em queijos faz com que o produto necessite de um maior período de maturação para adquirir as características desejáveis. Durante este período ocorrem reações bioquímicas que promovem alterações de sabor, odor, textura e consistência. Visando amenizar as alterações provocadas pela redução do teor de gordura em queijos, o presente estudo verificou o efeito da temperatura de maturação (6°C e 12°C) e do tipo de enzima, origem vegetal (fastuosáina) e microbiana (Protamax® 403), em queijos Prato com teor reduzido de gordura. Foi feita a caracterização físico-química e avaliação dos índices de proteólise dos queijos. O tipo de enzima resultou em diferenças significativas nos índices de maturação dos queijos Prato com teor reduzido de gordura, sendo que os maiores valores foram obtidos com a enzima Protamax® 403 com atividade enzimática 1.200.000 U e temperatura de maturação de 12°C.

Palavras-chave: queijo *light*, enzima proteolítica, caracterização físico-química, alimentos de baixa caloria.

ABSTRACT

Prato cheese has an important participation in the national market of dairy products, being the main Brazilian ripened cheese and the second type most consumed in Brazil. Because of health concerns, the search for dairy products, such as Prato cheese, with reduced fat content is increasing. However, the reduction of this constituent requires a large period of cheese ripening to acquire the desirable characteristics. During the ripening process, the biochemical reactions promote changes in *flavour*, odor, texture and consistency. Aiming to verify the alterations resulted by the reduction of fat content in cheeses, the present study verified the effect of temperature of ripening (6 °C and 12 °C) and of the enzyme type, vegetal (fastuosáina) and microbial (Protemax® 403) origin in reduced fat Prato cheeses. The physicochemical characterization and the evaluation of the proteolysis indices of the cheeses were carried out. The type of enzyme resulted in significant differences in the proteolyses indices of the reduced fat Prato cheeses during ripening. The highest values were obtained using Protemax® 403 with enzymatic activity of 1.200.000 U. and 12 °C for ripening temperature.

Key words: light cheese, proteolytic enzyme, physicochemical characterization, low-calorie foods.

1 - INTRODUÇÃO

A origem do queijo Prato no Brasil não se relaciona com fabricações caseiras e sim com as primeiras fábricas já com finalidade comercial, visando fabricar queijos de massa semi-cozida do tipo holandês. A etapa de cozimento da massa confere ao queijo uma característica mais elástica e a etapa de maturação, que ocorre por no mínimo 25 dias para o queijo Prato, faz com que o sabor fique menos ácido e a textura mais cremosa (OLIVEIRA, 1986, BRASIL, 1997).

O queijo Prato tem uma importante participação no mercado nacional de produtos lácteos, sendo o principal queijo maturado brasileiro e o segundo tipo de queijo mais consumido no Brasil, com uma produção média anual de 133.000 t (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS, 2008). Este queijo é fabricado por coagulação enzimática, a massa é semi-cozida e maturada, apresentando entre 42-44% de umidade, 1,6-1,9% de sal, pH de 5,2 a 5,4 e 26-29% de gordura, sendo classificado como gordo e de média umidade (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994, BRASIL, 1997).

As características de textura e sabor dos queijos são influenciadas pelo teor de gordura. Sendo assim, a redução do teor de gordura em queijos promove alterações na firmeza, adesividade e palatabilidade do produto, tornando-o menos atraente para o consumidor. Visando amenizar estas alterações podem-se realizar algumas mudanças durante o processamento, como na temperatura e tempo de cozimento, pH durante a fabricação, quantidade de sal, uso de estabilizantes e substitutos de gordura, ou ainda, aumento do período de maturação (JOHNSON; CHEN, 1995, MISTRY, 2001).

Por outro lado, a alternativa de aumentar o período de maturação não é viável à indústria, uma vez que esta necessitaria de um maior espaço para manutenção das condições

ideais de maturação dos queijos. Entretanto, estudos mostraram o aumento da temperatura de maturação (FOLKERTSMA; FOX; McSWEENEY, 1996, FENELON et al., 1999, REHMAN et al., 2000a, REHMAN et al., 2000b, GUINEE; FEENEY; FOX, 2001, FEENEY; FOX; GUINEE, 2001, KUJAWSKI et al., 2003, SIHUFÉ et al., 2005, ALIZADEH; HAMEDÍ; KHOSROSHAHI, 2006, SIHUFÉ et al., 2006, KRAGGERUD et al., 2008) ou o uso de enzimas proteolíticas como alternativas para acelerar a maturação de queijos (TYE; HAARD; PATEL, 1988). Porém, são poucos os trabalhos referentes a queijo Prato (MINUSSI; FURTADO; MOSQUIM, 1995, SILVA, 1998, LEITE; PITARELLO; PENNA, 2003, GARCIA, 2007, GARCIA et al., 2009).

Silva (1998) obteve aumento dos índices de maturação com adição da enzima Neutrase® em queijo Prato e Garcia (2007) e Garcia et al. (2009) observaram que o uso da enzima proteolítica fastuosáina promoveu aumento dos índices proteolíticos do queijo Prato com teor reduzido de gordura.

A enzima proteolítica fastuosáina, extraída do fruto verde do gravatá (*Bromelia fastuosa*), é uma cisteíno-peptidase com atividade enzimática máxima em pH próximo ao neutro e temperatura entre 55-60°C (CABRAL, 2001; CABRAL, 2005). Esta enzima foi testada em queijos Prato com teor integral e reduzido de gordura, promovendo índices de proteólise superiores aos determinados em queijos sem adição de enzima (LEITE; PITARELLO; PENNA, 2003, GARCIA, 2007).

A degradação de proteínas pode resultar na formação de peptídeos com aminoácidos terminais hidrofóbicos, que apresentam uma tendência à formação de amargor dependente do grau de hidrólise e da estrutura dos peptídeos produzidos. A enzima Protemax® 403 (Prozyn Ind. e Com. Ltda) é um produto à base de endo e exopeptidases produzida por *Aspergillus oryzae* utilizada para hidrolisar proteínas de forma moderada a extensiva, reduzindo o amargor. Inicialmente, esta enzima promove a hidrólise protéica, por meio de endopeptidases,

resultando em pequenos peptídeos que possuem aminoácidos terminais hidrofóbicos e, posteriormente, a hidrólise com exopeptidases degrada estes peptídeos amargos. Esta enzima apresenta atividade enzimática máxima em pH entre 5,0 e 7,0 e temperatura entre 25°C e 60°C, porém seu uso ainda não foi testado em queijos (PROZYN, 200-).

Pela necessidade de estudos mais detalhados sobre o efeito da temperatura de maturação e do tipo de enzima (enzimas de origem microbiana e vegetal) em queijos, este trabalho visou analisar o efeito da enzima fastuosáina na maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura e os resultados foram comparados a uma peptidase comercial.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Enzimas proteolíticas

A enzima fastuosáina foi extraída dos frutos de *Bromelia fastuosa* (gravatá) segundo metodologia descrita por Garcia (2007) e a enzima proteolítica Protemax® 403, de origem microbiana, foi fornecida pela Prozyn Ind. e Com. Ltda, na forma liofilizada. Antes da fabricação dos queijos com utilização das enzimas foram realizados ensaios da atividade enzimática específica, seguindo o protocolo de Sarath; De La Motte e Wagner (1996), com modificações (GARCIA et al., 2009). A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976).

2.2 – Leite pasteurizado

O leite pasteurizado e padronizado utilizado na fabricação dos queijos foi submetido às seguintes análises físico-químicas: acidez - determinada por titulação com NaOH 0,1 N e solução de fenolftaleína como indicador - expressa em porcentagem de ácido láctico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) e verificação da presença de resíduos de antibióticos - determinada pelo Teste SnapTM Beta Lactam (TRONCO, 1997). Os parâmetros densidade, teor de gordura, sólidos não gordurosos e proteína foram obtidos por espectroscopia de ultrassom utilizando-se o equipamento Ekomilk (Ekomilk-Milkana Stara, Zagora, Bulgária).

2.3 - Fabricação dos queijos

A partir de 50 litros de leite pasteurizado padronizado a 1,5% de gordura, os queijos foram produzidos em um tanque mecanizado, com capacidade de 56 L, dotado de controle de temperatura, na Planta Piloto do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, IBILCE, UNESP. Foram utilizados 2,5 mL de coagulante microbiano Chy-Max (Christian Hansen, Valinhos, Brasil), 5,0 mL de corante vegetal comercial extraído do urucum, 40 mL da cultura láctica: *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* (LL50 A, DSM Food Specialties Dairy Ingredients, Holanda) equivalente a 10^{16} UFC/mL, 50 mL de cloreto de cálcio em solução a 50% adicionado ao leite pasteurizado e 6 g de ácido sórbico

(Clariant S.A., São Paulo, Brasil) dissolvidos em 150 mL de água destilada estéril, como conservante, conforme permitido pela legislação. A coagulação do leite, realizada à temperatura de 32°C, ocorreu após aproximadamente 45 minutos, sendo posteriormente realizado o corte em grãos (0,3 – 0,5 cm³) e primeira agitação, por 15 minutos. Após este período, foi realizada a primeira dessora, com drenagem de aproximadamente 30% do volume de soro. Um volume de 8,5 L de água aquecida a 80°C foi adicionado à massa de queijo visando seu aquecimento a 38°C, seguindo a razão de 1°C a cada 3 minutos, totalizando 24 minutos. Em seguida foram realizadas: a segunda agitação, por 20 minutos e a segunda dessora, na qual foram drenados aproximadamente 60% do volume de soro. A massa de queijo foi dividida em três partes.

Em 20 mL de água destilada estéril foram misturadas, separadamente, quantidades correspondentes à atividade enzimática de 1.200.000 U. das enzimas fastuosaína e Protemax® 403. À solução contendo a enzima fastuosaína foi adicionado cloridrato de L-cisteína 0,005M como ativador enzimático, sendo a solução incubada a 37 °C por 5 minutos.

A primeira parte de massa de queijo correspondeu ao queijo controle, à segunda parte foi adicionada a enzima fastuosaína e à terceira parte de massa de queijo foi adicionada a enzima Protemax® 403, ambas as enzimas com atividade enzimática de 1.200.000 U. As três partes de queijos foram incubadas a 42°C por 20 minutos, visando intensificar a ação enzimática. Após este período as massas foram colocadas em formas retangulares (13x7x9cm), obtendo-se 15 queijos, sendo 5 queijos controle, 5 com adição da enzima fastuosaína e 5 com adição da enzima Protemax® 403, os quais foram pré-prensados por 30 minutos, invertidos em relação à posição na forma e na prensa e prensados por 24 horas. Após este período, os queijos foram retirados das formas e submetidos à salga a 12°C por 5 horas, em seguida, retirados da salmoura e, após secagem a 12°C por 24 horas, foram embalados a vácuo e estocados em câmara de maturação com 80% de umidade relativa (UR). Este

processamento foi repetido duas vezes, sendo os queijos maturados na temperatura de 6°C ou 12°C, por 60 dias.

A salmoura foi preparada com cloreto de sódio comercial em concentração de 18%, seguida de pasteurização por 72 °C por 4 minutos. Em seguida foi resfriada, filtrada em dessorador e teve o pH ajustado a 5,2.

2.4 - Caracterização físico-química dos queijos controles e modificados

Após 1 dia de maturação os queijos foram randomicamente escolhidos, triturados em um multiprocessador e homogeneizados e submetidos às análises físico-químicas. A umidade (U) foi obtida pela secagem em estufa a vácuo por 24 horas a 70 °C, conforme recomendado pela *American Public Health Association* (CASE; BRADLEY JR.; WILLIAMS, 1985); o teor de gordura (G) foi quantificado pelo método de Gerber–Van Gulik (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985); o teor de cinzas foi obtido por incineração em mufla a 550 °C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), o teor de sal (expresso pela relação sal/umidade) foi determinado por titulação com tiocianato de amônio (SERRES; AMARIGLIO; PETRANSXIENE, 1973) e a atividade de água (a_w) foi obtida pelo método descrito por Van Dender et al. (1995).

Após 1, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação, a acidez e a proteólise foram avaliadas. O teor de acidez foi determinado por titulação com NaOH 0,1 N (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) e o teor de nitrogênio total (NT) foi obtido pelo método de Kjeldahl, sendo o teor de proteína total calculado multiplicando-se o valor do nitrogênio total por 6,38 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1997). Os teores de

nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) ou nitrogênio não caseíco (NNC) e nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS TCA 12%) ou nitrogênio não protéico (NNP) foram obtidos pela dosagem do nitrogênio total no filtrado após precipitação isoeletrica das caseínas em pH 4,6 e após precipitação da totalidade das proteínas em presença do ácido tricloroacético a 12%, respectivamente (SILVA et al., 1997). A proteólise foi avaliada pela relação entre NS pH 4,6/NT (índice de extensão da maturação) e NS TCA 12%/NT (índice de profundidade da maturação) (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

2.5 - Avaliação do rendimento dos queijos

O rendimento dos queijos embalados foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$\text{Rendimento (L leite/kg de queijo)} = \frac{\text{Volume de leite utilizado (L)}}{\text{Massa de queijo obtida (kg)}} \quad (1)$$

2.6 - Análise estatística dos resultados experimentais

Para a verificação da homogeneidade das variâncias dos resultados experimentais, realizou-se o teste de Levene. Para comparação dos resultados físico-químicos das amostras de leite e de queijos dos diferentes tratamentos, foi aplicado o teste de Mann-Whitney. A

análise estatística dos parâmetros relacionados à proteólise foi norteadada pela comparação entre as amostras contidas em um mesmo bloco, sendo questionada a aplicação da ANOVA ou do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A aplicação do teste de Levene resultou em valores de P inferiores ao nível de significância adotado, descartando a hipótese de aplicação da ANOVA. Nesse contexto, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis a um nível de significância de 0,05. O software utilizado para tais análises foi o Minitab *release* 15.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Resultados da caracterização das amostras de leite utilizadas para a fabricação dos queijos

Não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) no teor de gordura das amostras de leite utilizadas nos processos de fabricação de queijo Prato (Tabela 1). O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado estabelece que o leite com teor original de gordura é classificado como integral, com teores entre 0,6 e 2,9%, semidesnatados e com teor de gordura de no máximo 0,5% é classificado como desnatado. Desta forma, as amostras dos leites utilizados nos processos de fabricação dos queijos Prato puderam ser classificados como semidesnatados (BRASIL, 2002).

O leite é composto de 87,3% de água e 12,7% de sólidos totais, distribuídos em 3,3 a 3,5% de proteínas totais, 3,5 a 3,8% de gordura, 4,9% de lactose e 0,7% de minerais e vitaminas (SGARBIERI, 2005).

Os teores de gordura diferiram dos utilizados por outros autores para fabricação de queijo Prato. Katsuda et al. (1999) utilizaram leite com 1,7% de gordura na fabricação de queijo Prato com teor reduzido de gordura. Nos estudos de Silva (2006) e Garcia (2007), o leite continha aproximadamente 1,5%, enquanto Barros et al. (2006) utilizaram leite microfiltrado com 0,43% de gordura para fabricação de queijo Prato *light* com e sem adição de cultura adjunta. Amostras de leites com 1,34% de gordura foram utilizados por Cichoski et al. (2008) para fabricação de queijo Prato com teor reduzido de gordura contendo fibras e lactato de potássio.

Tabela 1 - Composição das amostras de leite pasteurizado padronizado, tipo A, utilizadas na fabricação dos queijos.

Parâmetro	6°C	12°C
Gordura (%)	1,52 ± 0,01	1,52 ± 0,00
SNG (%)	8,64 ± 0,00	8,67 ± 0,01
Densidade (g/mL)	1,032 ± 0,00	1,033 ± 0,00
Acidez (% ácido láctico)	0,16 ± 0,00	0,16 ± 0,00
Proteína (%)	3,14 ± 0,00	3,15 ± 0,00
Presença de antibiótico	Negativo	Negativo

SNG: sólidos não gordurosos.

Os valores de sólidos não gordurosos apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P = 0,035$) entre as amostras de leite, porém, todas estão de acordo com a

legislação, que estabelece que o teor de sólidos não gordurosos seja de, no mínimo, 8,4 g/100g para leite integral e de 8,52 g/100g (valor corrigido) para as amostras de leites analisadas (BRASIL, 2002).

As amostras de leite não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) em relação à acidez, estando todas de acordo com a legislação que estabelece variação entre 0,14 e 0,18% de ácido láctico (BRASIL, 2002). A acidez natural do leite deve-se a presença de caseína, albumina, dióxido de carbono e citratos. A transformação da lactose por enzimas microbianas, com formação de ácido láctico, pode elevar a acidez do leite, indicando alta atividade microbiana e tornando o produto impróprio ao consumo (VELOZO et al., 200-).

Nas amostras de leite utilizadas na fabricação dos queijos não se detectou a presença de antibiótico, indicando sua aptidão para a fabricação dos queijos. A presença de antibióticos pode inibir a coagulação do queijo ou alterar o tempo de maturação devido a alterações na microbiota láctica (PERRY, 2004). Apesar das diferenças estatísticas, estas variações na composição do leite são usuais e não comprometem a produção de derivados.

3.2 – Resultados da avaliação do rendimento dos queijos

Os resultados dos rendimentos dos diferentes processamentos dos queijos Prato com teor reduzido de gordura variaram de 12,57 a 14,15 L leite/kg queijo nos processamentos com maturação a 6°C e a 12°C, respectivamente. O rendimento do processo de fabricação de queijos é influenciado pela composição e qualidade do leite, práticas de manuseio, estocagem e pré-tratamento do leite, condições do processamento e composição do queijo, como, por exemplo, os teores de umidade e gordura (FOX et al., 2000).

Os rendimentos obtidos foram menores que os determinados em estudo com queijo Prato com teores de gordura variando de 20,84 a 25,21%, no qual se obtiveram rendimentos variando de 9,94 a 11,62 kg queijo/100 kg leite (aproximadamente 9,74 e 8,34 L leite/kg de queijo) (SPADOTI et al., 2003), porém semelhantes aos de Silva (2006), com variações de 11,87 a 14,52 L de leite/kg queijo, em queijo Prato com teor reduzido de gordura (18,5 a 19,5% G). Segundo Costa Júnior e Pinheiro (1998), o rendimento do queijo Prato tradicional varia de 9,0 a 9,5 L leite/kg queijo.

3.3 - Resultados da caracterização físico-química dos queijos controles e modificados

Houve diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) no conteúdo de umidade dos queijos adicionados de enzimas proteolíticas, comparados aos queijos controles. Segundo Oliveira (1986), durante o processo de prensagem em prensas coletivas verticais, comum para queijo Prato e Minas, ocorre prensagem desigual, uma vez que o queijo inferior recebe a maior pressão e o superior, a menor. Apesar da possibilidade de amenizar este problema alternando-se as posições dos queijos no momento da viragem, é praticamente impossível a padronização da umidade final dos queijos. Todas as amostras de queijos analisadas encontram-se de acordo com a legislação (Tabela 2), que enquadra o queijo Prato como de média umidade (36 a 46%), apresentando conteúdo de extrato seco total variando de 54 a 64% (BRASIL, 1997).

Tabela 2 – Mediana dos parâmetros físico-químicos dos queijos controles e modificados pela adição de enzima, expressos em %.

Bloco	Tratamento	Umidade	Gordura	Cinzas	PT	S/U	a_w
6°C	Controle	43,71	20,5	4,98	26,45	4,14	0,95
	Fastuosáina	42,93	20,0	4,64	26,98	3,98	0,97
	Protemax® 403	42,59	20,0	4,51	27,12	4,38	0,97
12°C	Controle	39,89	20,5	4,51	31,37	4,70	0,97
	Fastuosáina	39,47	20,0	4,56	31,78	4,86	0,97
	Protemax® 403	41,36	20,5	4,36	31,44	4,56	0,97

PT: proteína total; S/U: sal/umidade; a_w: atividade de água.

Os conteúdos de umidade foram menores que os observados por Barros et al. (2006) em queijo Prato *light* sem e com adição de cultura adjunta, 52,47 e 55,26% (47,53 e 44,74% umidade), respectivamente, por Barros, Ribeiro, Viotto (2006) em queijo Prato com teor reduzido de gordura com utilização de leite submetido ao processo de ultrafiltração, aproximadamente 53% (47% umidade) e por Cichoski et al. (2008) em queijo Prato com teor reduzido de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio 50,49% (49,51% umidade). Porém, os teores de umidade foram semelhantes aos analisados por outros autores em estudos com queijo Prato, como Katsuda et al. (1999), em queijo Prato com teor reduzido de gordura, 48,63%, Mazal et al. (2007) em estudos sobre o efeito de células somáticas na composição de queijo Prato, 42,9 a 44,9%, por Sauer-Leal, Okada; Peralta-Zamora (2008) em queijos Prato comerciais, 42,36%, Garcia et al. (2009) em queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica fastuosáina, com variações entre 39 e 45%, demonstrando a alta variabilidade em relação ao teor de umidade de queijos Prato.

O queijo Prato tradicional apresenta teor de gordura variando entre 26 e 29%. Segundo a Portaria nº 29 de 13 de janeiro de 1998, para que o queijo possa ser classificado como *light*, deve sofrer redução de no mínimo 25% do teor de gordura. Desta forma, todos os queijos analisados puderam ser classificados como *light* ou como queijo com teor reduzido de gordura (OLIVEIRA, 1986, FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994, BRASIL, 1998). Os teores de gordura dos queijos foram maiores que os observados por outros autores em estudos com queijo Prato com teor reduzido de gordura. Katsuda et al. (1999) obtiveram 18,6%; Barros et al. (2006), uma variação entre 5,63 e 5,75% e Barros; Ribeiro e Viotto (2006) variação entre 6,10 e 6,40%. Porém, os valores foram menores que os observados por Garcia et al. (2009), com valores variando de 22 a 25%.

Segundo Van Dender et al. (1986), o teor de cinzas em queijos varia de 2,1 a 5,3%, estando, portanto, todas as amostras analisadas compreendidas neste intervalo de variação e apresentando resultados semelhantes aos de Katsuda et al. (1999), de 4,65%, de Silva (2006), com variação entre 4,01 a 5,09% e de Garcia (2007), com variação entre 4,10 a 4,75%. Após a queima da matéria orgânica, que é transformada em CO₂, H₂O e NO₂, ainda restam resíduos inorgânicos, os quais representam o teor de cinzas. Em produtos lácteos estes resíduos são constituídos principalmente por cálcio, fósforo, sódio e enxofre (CECCHI, 1999).

Segundo Banks (2004), a redução do conteúdo de gordura resulta em um aumento significativo no conteúdo de proteína. Os valores de proteína total foram semelhantes aos observados por Katsuda et al. (1999), de 27,85%, por Barros et al. (2006), com variação entre 30,00 e 31,43% e por Garcia et al. (2009), com variação entre 25,88 a 30,08%, porém menores que os observados por Barros, Ribeiro e Viotto (2006), com variação entre 32,31 e 33,76%.

Segundo Fox et al. (2000) o conteúdo de sal está relacionado à qualidade de queijos, sendo que altos conteúdos de sal podem causar alterações na textura devido, principalmente, a

um processo proteolítico deficiente. O teor de sal do queijo Prato é de aproximadamente 1,7%. Durante o processo de salga, devido à diferença na pressão osmótica entre a salmoura e a massa, parte da umidade é liberada, arrastando proteínas do soro, ácido lático e minerais dissolvidos, enquanto o NaCl é absorvido. Ocorre ainda a troca de íons Ca^{+2} por Na^{+} nas moléculas de *para-caseína*, deixando a massa mais macia (OLIVEIRA, 1986; PERRY, 2004). O teor de sal absorvido pelos queijos é influenciado pelas condições de salga, como temperatura, concentração, pH e tempo (LOURENÇO NETO, 1996). O pH ideal da salmoura é de 5,2 a 5,3 e a concentração entre 18 e 23% de NaCl para temperaturas entre 10 e 14°C. Valores de pH abaixo de 5,0 fazem com que haja mais íon H^{+} do que Ca^{+2} ligados às moléculas de *para-caseína* e menor incorporação de Na^{+} , deixando o queijo duro e quebradiço. Porém, em pH acima de 5,8 ocorre excesso de íons Ca^{+2} , resultando em um excesso de íons Na^{+} na molécula, deixando o queijo demasiado macio (PERRY, 2004). Os maiores valores de mediana, em relação ao teor de sal/umidade, foram observados nos queijos submetidos ao tratamento a 12°C, demonstrando que o aumento na temperatura de maturação pode ter proporcionado maior difusão do NaCl devido ao aumento no tamanho dos poros na matriz protéica (FOX et al., 2000).

Os teores de sal/umidade foram maiores que os observados em estudos com queijo Prato com teor integral de gordura por Narimatsu et al. (2003), com variação entre 3,14 a 3,27%, por Moreno et al. (2002), com variação entre 2,34 a 4,22%, por Cichoski et al. (2002), 1,84% no primeiro dia de maturação, por Spadoti, Dornellas e Roig (2005), com variação entre 3,09 a 3,31% e em estudos com queijo Prato com teor reduzido de gordura por Barros, Ribeiro e Viotto (2006), com variação entre 3,02 a 3,14% e por Barros et al. (2006), com valores de 3,60 e 3,46% para queijos Prato *light* sem e com adição de cultura adjunta, respectivamente.

A atividade de água de um alimento está diretamente relacionada com o crescimento e atividade metabólica dos micro-organismos e com as reações hidrolíticas (ORDÓÑEZ, 2005). Como não houve diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) em relação à atividade de água, os diferentes tratamentos não apresentaram condições diferentes para o crescimento microbiano e ação enzimática. A atividade de água dos queijos variou de 0,95 a 0,97, valores acima da atividade de água ótima para o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que é de 0,93 (FERREIRA, 2004).

O aumento do teor de acidez durante a maturação foi observado em todos os tratamentos, demonstrando por meio da correlação de Pearson e da Figura 1, uma associação positiva significativa entre o teor de acidez dos queijos e os dias de maturação. O aumento no teor de acidez em queijos com teor reduzido de gordura é um parâmetro a ser considerado, pois, com o aumento da umidade e redução da temperatura de cozimento, as bactérias lácticas se propagam e produzem excesso de ácidos e gosto amargo, sendo importante a lavagem da massa e redução do tempo de maturação visando controlar a acidez nestes queijos (NABUCO; MORETTI; PENNA, 2004; DRAKE; SWANSON, 1995).

Os queijos submetidos à maturação a 12°C apresentaram os maiores teores de acidez, demonstrando que o aumento da temperatura pode ter contribuído para o desenvolvimento de bactérias lácticas favorecendo a produção de ácidos, como ácido láctico, ácido acético e outros ácidos orgânicos (SILVA, 1998). Além disso, os queijos nos quais se adicionou a enzima Protemax® 403 apresentaram os maiores teores de acidez, fazendo-se pressupor uma alta ação proteolítica desta enzima com liberação de compostos com caráter ácido, como aminoácidos e ácidos orgânicos.

O aumento do teor de acidez durante a maturação também foi observado em outros estudos com queijo Prato (SILVA, 1998, CICHOSKI et al., 2002, NABUCO; MORETTI; PENNA, 2004, MORETTI; NABUCO; PENNA, 2004, SILVA et al., 2005, GARCIA, 2007,

GARCIA et al., 2009). Silva (1998), Garcia (2007) e Garcia et al. (2009) em estudos com queijo Prato com adição de enzimas proteolíticas também observaram maior teor de acidez nos queijos nos quais se adicionou enzima proteolítica.

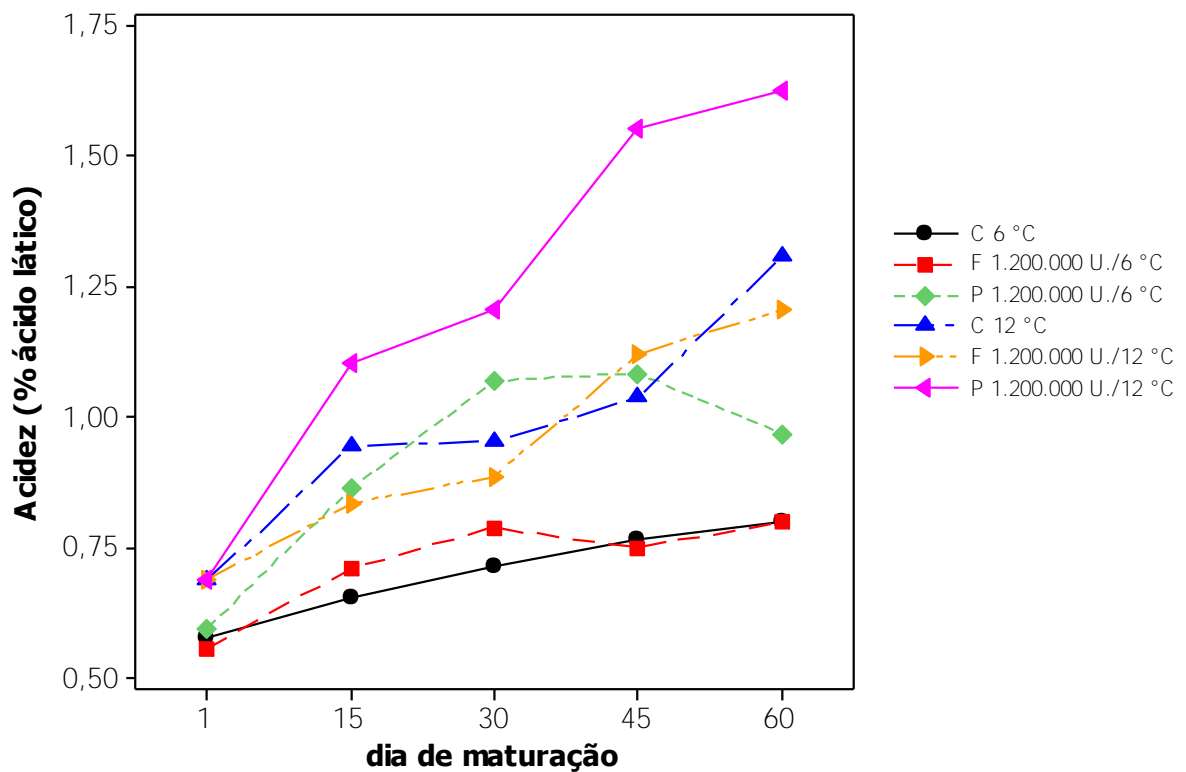


Figura 1 – Evolução do teor de acidez (mediana) durante a maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura. C: controle; F: fastuosaína; P: Protemax® 403.

O índice de extensão da maturação (NS pH 4,6/NT) é caracterizado pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis na fase aquosa dos queijos, resultantes da degradação da caseína, pela ação principalmente das enzimas naturais do leite e coagulantes, com liberação de frações nitrogenadas solúveis em água e em pH 4,6, e acumuladas durante a maturação (FOX et al., 2000). Este parâmetro permite avaliar a proteólise dos queijos em relação à composição final e às características organolépticas.

O aumento dos índices de extensão da maturação foi observado em todos os tratamentos, demonstrando por meio da correlação de Pearson e ilustrado na Figura 2, uma associação positiva significativa entre o NS pH 4,6/NT dos queijos e os dias de maturação, conforme relataram estudos realizados com queijo Prato (KATSUDA et al., 1999, MORENO et al., 2002, NABUCO; MORETTI; PENNA, 2004, MORETTI; NABUCO; PENNA, 2004, DRUNKLER; KATSUDA; DRUNKLER, 2004, SILVA et al., 2005).

Houve diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) na proteólise dos queijos controle e modificados quando submetidos aos mesmos tratamentos, desde o primeiro dia de maturação. Os maiores valores de mediana foram observados para os queijos adicionados de enzima Protemax® 403, seguido dos queijos com adição da enzima fastuosáina e do queijo controle. Considerando-se que ambas as enzimas foram adicionadas em quantidades correspondentes à mesma atividade enzimática total, demonstrou-se maior ação proteolítica da enzima de origem microbiana em relação à de origem vegetal. Esses resultados pressupõem que a enzima Protemax® 403 pode ter contribuído mais extensivamente para a degradação da caseína, principalmente em compostos de altas e médias massas moleculares, que a enzima fastuosáina.

Nos queijos submetidos ao tratamento com adição de enzimas proteolíticas e maturados a 12°C, observou-se o efeito mais pronunciado da enzima Protemax® 403 em relação aos queijos controle e com adição da enzima fastuosáina, sendo que aos 30 dias de maturação os queijos nos quais se adicionou a enzima Protemax® 403 apresentaram NS pH 4,6/NT maiores que os obtidos aos 60 dias nos queijos controle e com adição da enzima fastuosáina.

Os resultados obtidos diferem dos encontrados em outros estudos com adição de enzimas proteolíticas em queijo Prato, nos quais os maiores NS pH 4,6/NT foram obtidos nos casos em que se utilizaram enzimas com menores atividades enzimáticas (SILVA, 1998,

GARCIA, 2007). A evolução do índice de extensão da maturação dos queijos controles, demonstrou que quanto maior a temperatura de maturação, maiores os índices de extensão da maturação, fazendo-se pressupor que a temperatura exerceu um efeito mais pronunciado no NS pH 4,6/NT que a atividade enzimática, conforme mencionado em estudos anteriores (FEENEY; FOX; GUINEE, 2001, SHEEHAN; O'SULLIVAN; GUINEE, 2004, O'MAHONY et al., 2006).

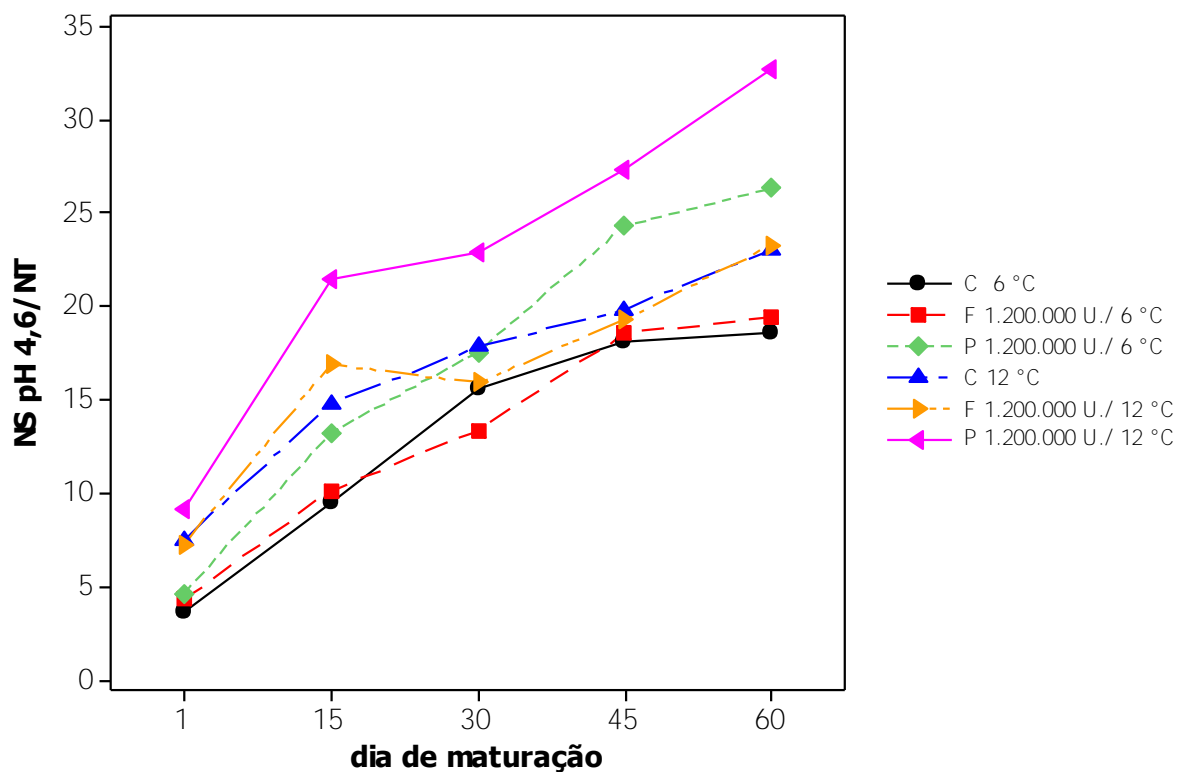


Figura 2 – Evolução do índice de extensão da maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura. C: controle; F: fastuosaína; P: Protamax® 403.

O índice de profundidade da maturação (NS TCA 12%/NT) é proporcional à ação de endo e exopeptidases bacterianas que liberam aminoácidos e outros compostos nitrogenados de baixa massa molecular, sendo um parâmetro importante para a avaliação da atividade peptidolítica da cultura láctica (COSTA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998, FOX et al., 2000).

Houve um aumento dos índices de profundidade da maturação em todos os tratamentos demonstrando, por meio da correlação de Pearson e ilustrado na Figura 3, uma associação positiva significativa entre o NS TCA12%/NT e os dias de maturação, conforme relataram estudos realizados com queijo Prato (KATSUDA et al., 1999, MORENO et al., 2002, NABUCO; MORETTI; PENNA, 2004, MORETTI; NABUCO; PENNA, 2004, DRUNKLER; KATSUDA; DRUNKLER, 2004, SILVA et al., 2005).

Com a adição de enzimas (atividade enzimática 1.200.000U) e maturação a 12°C, houve diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre o índice de profundidade da maturação dos queijos controle e modificados a partir de 15 dias de maturação. Os maiores valores de mediana foram observados para os queijos adicionados de enzima Protemax® 403.

Os índices de profundidade da maturação aumentaram com a elevação da temperatura de maturação para os queijos tratados com a enzima Protemax® 403 pois, nos tratamentos com atividade enzimática de 1.200.000U a 6°C e a 12°C, se observaram maiores valores de NS TCA 12%/NT na maior temperatura, pressupondo-se o efeito desta variável, capaz de promover a degradação protéica em compostos de baixa massa molecular, como aminoácidos, oligopeptídeos e aminas, acumulados durante a maturação (SILVA, 1998).

Os resultados são semelhantes aos apresentados em estudo com queijo Prato com adição de enzima Neutrase®, em que os queijos modificados apresentaram os maiores NS TCA 12%/NT (SILVA, 1998). Os índices de profundidade da maturação obtidos foram maiores que os de outros estudos com queijo Prato *light* com e sem adição de cultura adjunta (BARROS et al., 2006), porém semelhantes ao de Silva (2006) em estudo com queijo Prato com teor reduzido de gordura com adição de cultura adjunta e por Garcia (2007) e Garcia et al. (2009) em estudo com queijo Prato com teor reduzido de gordura com adição da enzima fastuosáina.

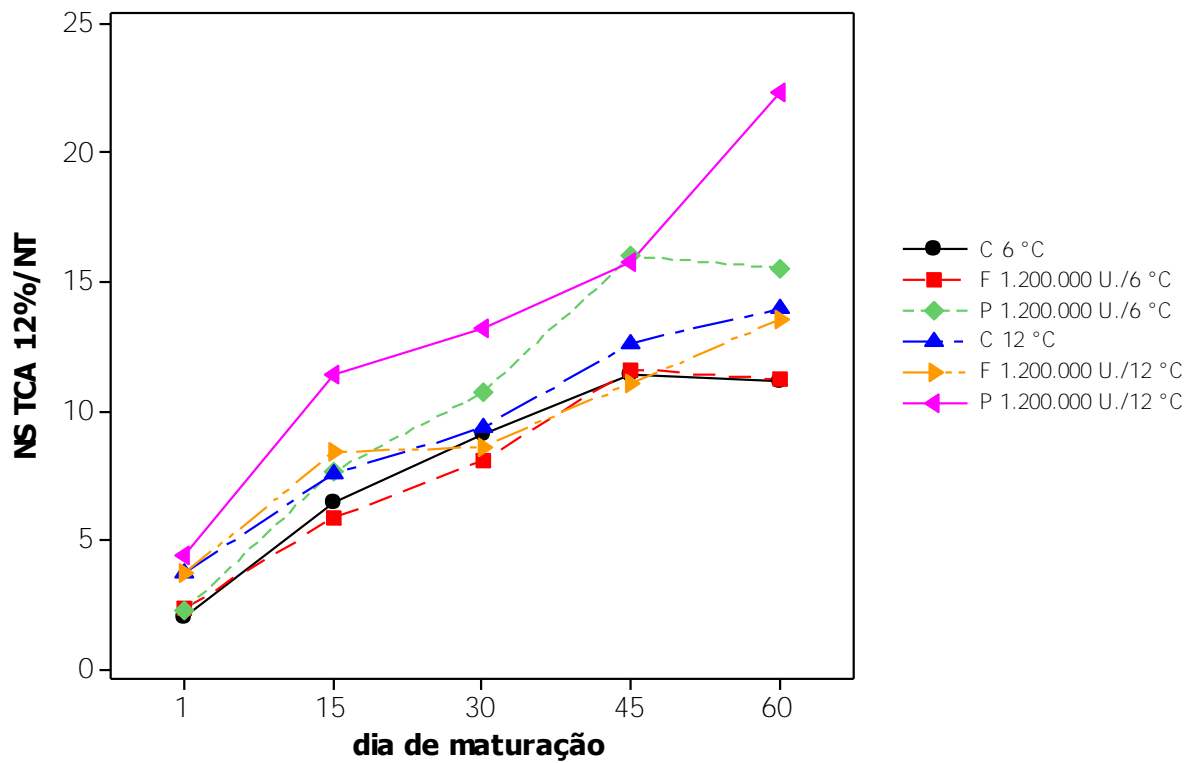


Figura 3 - Evolução do índice de profundidade da maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura. C: controle; F: fastuosáina; P: Protemax® 403.

CONCLUSÕES

As enzimas fastuosáina e Protemax® 403 promoveram diferenças estatisticamente significativas nos índices de maturação dos queijos Prato com teor reduzido de gordura, sendo que os maiores valores de medianas foram obtidos com o uso da enzima Protemax® 403 com atividade enzimática 1.200.000 U e temperatura de maturação de 12°C. A temperatura exerceu considerável influência na maturação dos queijos, sendo que os maiores índices de maturação foram obtidos na temperatura de 12°C.

REFERÊNCIAS

ALIZADEH, M.; HAMED, M.; KHOSROSHAHI, A. Modeling of proteolysis and lipolysis in Iranian white brine cheese. *Food Chemistry*, London, v. 97, n. 2, p. 294-301, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS. **Queijos: mercado total brasileiro**. São Paulo, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Dairy Products. In: _____. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington, 1997.

BANKS, J. M. The technology of low-fat cheese manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 4, p. 199-207, 2004.

_____.; RIBEIRO, A. C. O.; VIOTTO, W. H. Impact of low concentration factor ultrafiltration on the composition and yield of reduced fat Prato cheese. **Desalination**, Amsterdam, v. 200, n. 1/3, p. 555-556, 2006.

_____. et al. Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo Prato *light*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 11-18, 2006.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. New York, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico identidade e qualidade de leite pasteurizado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 set. 2002.

_____. Portaria nº 27 de 16 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 jan. 1998.

_____. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 172, 8 set. 1997. p. 19690.

CABRAL, H. **Análise funcional e estrutural comparativa da fastuosaina com papaína e bromelinas**. 2005. 150 f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular)–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2005.

_____. **Isolamento e caracterização de uma cisteíno-peptidase de frutos de *Bromelia fastuosa* (gravatá)**. 2001. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.

CASE, R. A.; BRADLEY JUNIOR, R. L.; WILLIAMS, R. R. Chemical and physical methods. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. 15. ed. Washington, p. 327-404, 1985.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Ed. da UNICAMP, 1999.

CICHOSKI, A. J. et al. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physico-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 4, p. 329-336, 2002.

_____. et al. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 214-219, 2008.

COSTA JÚNIOR, L. C. G.; PINHEIRO, A. J. R. Influência da relação caseína/gordura nas características físico-químicas do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, n. 305, p. 29-49, 1998.

DRAKE, M. A.; SWANSON, B. G. Reduced and low-fat Cheese technology: a review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 6, n. 11, p. 366-369, 1995.

DRUNKLER, N. L.; KATSUDA, M. S.; DRUNKLER, D. A. Efeito da padronização do teor caseína/gordura sobre as características físico-químicas do queijo Prato durante a maturação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 386-388, 2004.

FEENEY, E. P.; FOX, P. F.; GUINEE, T. P. Effect of ripening temperature on the quality of low moisture Mozzarella cheese: 1. Composition and proteolysis. **Lait**, Les Ulis, v. 81, n. 4, p. 463-474, 2001.

FENELON, M. A. et al. Elevated temperature ripening of reduced fat Cheddar made with or without lacticin 3147 producing starter culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 1, p. 10-22, 1999.

FERREIRA, C. L. L. F. Fatores que afetam o crescimento de microrganismos em queijo. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 12, n. 76, p. 90-96, 2004.

FOLKERTSMA, B.; FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. **International Dairy Journal**, Champaign, v. 6, n. 11, p. 1117-1134, 1996.

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

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

GARCIA, G. A. C. **Efeito do uso de enzimas proteolíticas na maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura**. 2007. 154 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

_____. et al. Composição de macronutrientes e evolução da maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica fastuosaína. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, p. 69-77, 2009.

GUINEE, T. P.; FEENEY, E. P.; FOX, P. F. Effect of ripening temperature on low moisture Mozzarella cheese. II. Texture and functionality. **Lait**, Les Ulis, v. 81, n. 4, p. 475-485, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo, 1985.

JOHNSON, M. E.; CHEN, C. M. Technology of manufacturing reduced-fat Cheddar cheese. In: MALIN, E. L.; TUNICK, M. H. (Ed.). **Chemistry of structure-functions relationships in cheese**. New York: Plenum Press, 1995. p. 331-338.

KATSUDA, M. S. et al. Caracterização química, sensorial e de textura, de queijo tipo Prato com teor reduzido de gordura. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 309, p. 128-133, 1999.

KRAGGERUD, H. et al. Season and ripening temperature influence fatty acid composition and sensory properties of semi-hard cheese during maturation. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, n. 8, p. 801-810, 2008.

KUJAWSKI, M. et al. Effect of ripening temperature on proteolysis and organoleptic properties of Edam type cheese. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, Wrocław, v. 6, n. 1, 2003. Disponível em: <<http://www.ejpau.media.pl/volume6/issue1/food/art-04.html>>. Acesso em: 3 mar. 2009.

LEITE, T. D.; PITARELLO, J.; PENNA, A. L. B. Aceleração da maturação de queijo prato pelo uso de enzima proteolítica do fruto verde de gravatá (*Bromelia fastuosa*). In: CONGRESO IBEROAMERICANO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS, 4., 2003, Valparaíso. **Resúmenes de Presentaciones...** Valparaíso: Universidad Técnica Federico Santa María, 2003. p. 65.

LOURENÇO NETO, J. P. M. A salga de queijos em salmoura. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 5, n. 30, p. 37-52, 1996.

MAZAL, G. et al. Effect of somatic cell count on Prato cheese composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 2, p. 630-636, 2007.

MINUSSI, R. C.; FURTADO, M. M.; MOSQUIM, M. C. A. V. Avaliação de métodos para a aceleração da maturação do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 291, p. 24-30, 1995.

MISTRY, V. V. Low fat cheese technology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4, p. 413-422, 2001.

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.

MORETTI, B. R.; NABUCO, A. C.; PENNA, A. L. B. Evolução dos índices de maturação do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 363-366, 2004.

NABUCO, A. C.; MORETTI, B. R.; PENNA, A. L. B. Avaliação do perfil de tirosina e triptofano durante a maturação do queijo tipo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 360-363, 2004.

NARIMATSU, A. et al. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo Prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 177-182, 2003. Suplemento.

O'MAHONY, J. A. et al. Lipolysis and sensory characteristics of Cheddar cheeses ripened using different temperature-time treatments. **Lait**, Les Ulis, v. 86, n. 1, p. 59-72, 2006.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: fundamentos tecnológicos**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1986.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 1 v.

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

PROZYN. **Protemax @ 403**. São Paulo, [200-]. Ficha técnica.

REHMAN, S. U. et al. Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurized milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 10, n. 1/2, p. 45-53, 2000a.

_____. et al. Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurized milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 10, n. 1/2, p. 55-66, 2000b.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1996. cap. 3, p. 25-55.

SAUER-LEAL, E.; OKADA, F. M.; PERALTA-ZAMORA, P. Caracterização físico-química de queijo Prato por espectroscopia no infravermelho e regressão de mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1621-1625, 2008.

SERRES, L.; AMARIGLIO, S.; PETRANSKIENE, D. **Contrôle de la qualité des produits laitiers**. Paris: Ministère de l'Agriculture; Direction des Services Vétérinaires, 1973. tome I: Analyse Physique et Chimique, chap. VII, p. 6.

SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas da proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHEEHAN, J. J.; O'SULLIVAN, K.; GUINEE, T. P. Effect of coagulant type and storage temperature on the functionality of reduced-fat Mozzarella cheese. **Lait**, Les Ulis, v. 84, n. 6, p. 551-566, 2004.

SIHUFU, G. A. et al. Kinetic of proteolytic of β -casein during ripening of Fynbo cheese salted with NaCl or NaCl/KCl and ripened at different temperatures. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 2, p. 151-156, 2005.

_____. et al. Secondary proteolysis of Fynbo cheese salted with NaCl/KCl brine and ripened at various temperatures. **Food Chemistry**, London, v. 96, n. 2, p. 297-303, 2006.

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

SILVA, C. R. B. **Efeito do uso de Lactobacillus casei como cultura adjunta na qualidade tecnológica de queijo Prato com reduzido teor de gordura**. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

_____. et al. Maturação de queijo Prato: comparação entre o produto integral e o produzido com teor reduzido de gordura. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 235-238, 2005.

SILVA, P. H. F. et al. **Físico-química do leite e derivados**: métodos analíticos. Juiz de Fora: Oficina de Impressão, 1997.

SPADOTI, L. M. et al. Avaliação do rendimento do queijo tipo Prato obtido por modificações no processo tradicional de fabricação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 492-499, 2003.

_____; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Proteolysis of Prato type cheese produced using ultrafiltration. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 3, p. 235-239, 2005.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 2. ed. Santa Maria: Ed UFSM, 2003. 192 p.

TYE, T. M.; HAARD, N. F.; PATEL, T. R. Effect of bacterial protease on the quality of Cheddar cheese. **Canadian Institute of Science and Technology Journal**, Ottawa, v. 21, n. 4, p. 373-377, 1988.

VAN DENDER, A. G. F. et al. Determinação da atividade de água de queijos usando crioscopia eletrônica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 50, n. 3, p. 18-26, 1995.

_____. et al. Estudo de métodos de aceleração no processo de fabricação do queijo tipo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 41, n. 247, p. 3-13, 1986.

VELOZO, E. S. et al. **Química do leite**: teoria da prática. Salvador: UFBA. Disponível em: <<http://www.lapemm.ufba.br/HP2000/leite.htm>>. Acesso em: 22 jul. 2009.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Revista Boletim do Leite**, São Paulo, v. 55, n. 661, p. 1-8, 1983.

**CAPÍTULO 3: PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM
QUEIJO PRATO COM TEOR REDUZIDO DE GORDURA ADICIONADO DE
ENZIMAS PROTEOLÍTICAS**

RESUMO

Durante o processo de maturação em queijos, a proteólise promove degradação da caseína pela ação de enzimas naturais do leite, do coagulante e de peptidases de bactérias ácido-láticas, originando pequenos peptídeos e aminoácidos livres, os quais são convertidos em compostos responsáveis pelo *flavour* de queijos. O conteúdo de ácidos graxos livres contribui para as propriedades reológicas e tecnológicas dos queijos, como propriedades emulsificantes, aromatizantes, umectantes, além de promover melhoria na textura e no desenvolvimento do *flavour*. Apesar da grande contribuição dos lipídios nos alimentos, sua ingestão excessiva tem sido relacionada a doenças coronarianas, incentivando a busca por produtos com teor reduzido de gordura. Queijos *light* apresentam características indesejáveis, tais como corpo borrachento e sabor e aroma atípicos em relação aos seus correspondentes com teor integral de gordura. Visando o desenvolvimento do queijo Parto com teor reduzido de gordura com melhores características físicas e sensoriais, o presente estudo verificou o efeito da adição de enzimas proteolíticas (fastuosáina e Protemax® 403) e da temperatura de maturação (6°C e 12°C) na formação de compostos voláteis e sobre o perfil de ácidos graxos livres, após 1 e 60 dias de maturação. O aumento da temperatura de maturação e a adição de enzimas proteolíticas proporcionaram aumento na concentração de compostos voláteis e não influenciaram o perfil de ácidos graxos durante a maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura. Entre os voláteis, foi verificada a presença de ácidos carboxílicos, álcoois, cetonas e compostos sulfurados. O perfil dos ácidos graxos demonstrou predominância de ácidos graxos de cadeia longa, saturados e monoinsaturados.

Palavras-chave: queijo *light*, proteólise, *flavour*, temperatura de maturação.

ABSTRACT

During the ripening process in cheeses, proteolysis promotes casein degradation, by the action of natural enzymes present in milk, by the coagulant and peptidases of lactic acid bacteria, originating small peptides and free amino acids, which are converted into compounds responsible for the flavour of cheeses. The content of free fatty acid contributes to the rheological and technological properties of the cheeses, and also to the improvement of texture and development of flavour. Despite the great contribution of the lipids in foods, its extreme ingestion has been related to coronary diseases, stimulating the search for products with reduced fat content. Light cheeses present undesirable characteristics, such as rubbery texture, atypical flavour and aroma in comparison to the correspondent full fat cheese. Aiming the development of reduced fat cheese with better physical and sensory characteristics, the present study verified the effect of the addition of proteolytic enzymes (fastuosaína and Protemax® 403) and of the ripening temperature (6°C and 12°C) on the volatile compounds and on the free fatty acid profile, after 1 and 60 days of ripening. The increase of the ripening temperature and the addition of proteolytic enzyme promoted increase in the volatile compounds concentration and they had no influence in the free fatty acid profile of the reduced fat Prato cheese, during ripening. Among the volatile compounds, the presence of carboxylic acid, alcohol, ketones and sulphur compounds was verified. The free fatty acid profile demonstrated predominance of long chain, saturated and monounsaturated fatty acids.

Key words: light cheese, proteolysis, flavour, ripening temperature.

1 - INTRODUÇÃO

Os componentes envolvidos no desenvolvimento de sabor e aroma em queijos são resultantes de mudanças bioquímicas relacionadas à proteólise, lipólise e à glicólise. Durante o processo de maturação os principais compostos de *flavour* gerados a partir da caseína são: peptídeos, aminoácidos, ácido acético, amônia, piruvato, aldeído, fenóis, álcoois, ácidos carboxílicos e compostos sulfurosos. A partir da gordura são obtidos ácidos graxos, cetoácidos, metilcetonas e lactonas e, a partir da lactose e do citrato: lactato, piruvato, dióxido de carbono, diacetil, acetoína, 2,3-butanodiol, acetaldeído, ácido acético e etanol (SILVA; MORENO; VAN DENDER, 2006).

Cerca de 400 ácidos graxos livres foram identificados na gordura do leite bovino, sendo os principais: butanóico (C_{4:0}), hexanóico (C_{6:0}), octanóico (C_{8:0}), decanóico (C_{10:0}), dodecanóico (C_{12:0}), tetradecanóico (C_{14:0}), hexadecanóico (C_{16:0}), octadecanóico (C_{18:0}), cis-9-octadecanóico (C_{18:1}), cis-9,12-octadecadienóico (C_{18:2}) e 9,12,15-octadecatrienóico (C_{18:3}) (FOX et al., 2000, COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003).

Os lipídios presentes em alimentos podem sofrer degradações oxidativas ou hidrolíticas. As degradações oxidativas não ocorrem de forma significativa em queijos devido ao baixo potencial de óxido-redução desses produtos. A hidrólise enzimática dos triacilgliceróis com formação de ácidos graxos e glicerol, mono e diacilgliceróis é essencial para o desenvolvimento de *flavour* em algumas variedades de queijos, ocorrendo devido à presença de enzimas lipolíticas (esterases ou lipases) (SABIONI, 2000; COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003).

O conteúdo de ácidos graxos livres em queijos é influenciado por fatores como o tipo, qualidade e tratamento térmico do leite, pela cultura lática, pela temperatura de maturação, pela concentração de sal e por lipases presentes no leite e no coagulante (DE WIT et al.,

2005). As lipases presentes nos queijos são originadas do leite, do coagulante, da cultura láctica e de culturas adjuntas, de bactérias não lácticas e de lipases exógenas adicionadas (COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003). Coagulantes comerciais, extraídos de animais adultos, utilizados na maioria das variedades de queijo, normalmente não apresentam atividades lipolíticas. Entretanto, coagulantes tradicionais, presentes no estômago de ruminantes jovens, como os utilizados em queijos italianos, têm altas atividades lipolíticas devidos aos seus conteúdos de esterases pregástricas, que hidrolisam, preferencialmente, ácidos esterificados de cadeias curtas, liberando ácidos graxos livres, C_{4:0}-C_{10:0}. Estes ácidos graxos livres estão relacionados às características picantes destes queijos, conforme observado em estudo com queijo Feta que testaram o efeito do uso de coagulantes tradicional e uma mistura de 60% de coagulante tradicional e 40% comercial (GEORGALA et al., 2005).

Os lipídios contribuem para as propriedades reológicas dos queijos, sendo que os ácidos graxos poliinsaturados causam efeitos indesejáveis na textura, sendo aceitáveis em baixas concentrações. Entre as funções tecnológicas, podem-se destacar as propriedades emulsificantes, aromatizantes, umectantes, além da propriedade de melhoria na textura e de servir como fonte de ácidos graxos, principalmente os de cadeias curtas, que contribuem com o desenvolvimento do *flavour* (MORENO et al., 2002).

Apesar da grande contribuição dos lipídios para o *flavour* de queijos, a ingestão excessiva de gorduras tem sido relacionada a doenças coronarianas, incentivando a busca por produtos com teor reduzido de gordura (FOX et al., 2000; JORGE, 2009).

Queijos com teor reduzido de gordura apresentam características como corpo borrachento e sabor e aroma atípicos em relação aos seus correspondentes com teor integral de gordura. Quando o teor de gordura é reduzido, a proteína é responsável pelo desenvolvimento da textura dos queijos que ocorre, principalmente, devido à degradação da α_{s1} -caseína durante a maturação. Compostos como o 2-butanona e 2-heptanona são altamente

liberados durante a mastigação de queijos com teor reduzido de gordura, alterando a percepção global do *flavour* (DELAHUNTY et al., 1996).

Vários estudos envolvendo alterações nos processos de fabricação estão sendo realizados visando o desenvolvimento de queijos com teor reduzido de gordura com características semelhantes aos de seus correspondentes com teor integral de gordura, como: mudanças de temperatura e tempo de cozimento, seleção de cultura lática, uso de aditivos, como substitutos de gordura, uso de enzimas exógenas e elevação da temperatura de maturação (MISTRY, 2001).

O presente estudo verificou o efeito da adição de enzimas proteolíticas, de origens microbiana e vegetal e da temperatura de maturação sobre o perfil de ácidos graxos livres e de compostos voláteis durante a maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Fabricação dos queijos

A partir de 50 litros de leite pasteurizado padronizado a 1,5% de gordura, os queijos foram produzidos em um tanque mecanizado, com capacidade de 56 L, dotado de controle de temperatura, na Planta Piloto do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, IBILCE, UNESP. Foram utilizados 2,5 mL de coagulante microbiano Chy-Max (Christian Hansen, Valinhos, Brasil), 5,0 mL de corante vegetal comercial extraído do urucum, 40 mL da cultura lática: *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* (LL50

A, DSM Food Specialties Dairy Ingredients, Holanda) equivalente a 10^{16} UFC/mL, 50 mL de cloreto de cálcio em solução a 50% adicionado ao leite pasteurizado e 6 g de ácido sórbico (Clariant S.A., São Paulo, Brasil) dissolvidos em 150 mL de água destilada estéril, como conservante, conforme permitido pela legislação. A coagulação do leite, realizada à temperatura de 32°C, ocorreu após aproximadamente 45 minutos, sendo posteriormente realizado o corte em grãos (0,3 – 0,5 cm³) e primeira agitação, por 15 minutos. Após este período, foi realizada a primeira dessora, com drenagem de aproximadamente 30% do volume de soro. Um volume de 8,5 L de água aquecida a 80°C foi adicionado à massa de queijo visando seu aquecimento a 38°C, seguindo a razão de 1°C a cada 3 minutos, totalizando 24 minutos. Em seguida foram realizadas: a segunda agitação, por 20 minutos e a segunda dessora, na qual foram drenados aproximadamente 60% do volume de soro. A massa de queijo foi dividida em três partes.

Em 20 mL de água destilada estéril foram misturadas, separadamente, quantidades correspondentes à atividade enzimática de 1.200.000 U. das enzimas fastuosaína e Protemax® 403. À solução contendo a enzima fastuosaína foi adicionado cloridrato de L-cisteína 0,005M como ativador enzimático, sendo a solução incubada a 37°C por 5 minutos.

A primeira parte de massa de queijo correspondeu ao queijo controle, à segunda parte foi adicionada a enzima fastuosaína e à terceira parte de massa de queijo foi adicionada a enzima Protemax® 403, ambas as enzimas com atividade enzimática de 1.200.000 U. As três partes de queijos foram incubadas a 42°C por 20 minutos, visando intensificar a ação enzimática. Após este período as massas foram colocadas em formas retangulares (13x7x9cm), obtendo-se 15 queijos, sendo 5 queijos controle, 5 com adição da enzima fastuosaína e 5 com adição da enzima Protemax® 403, os quais foram pré-prensados por 30 minutos, invertidos em relação à posição na forma e na prensa e prensados por 24 horas. Após este período, os queijos foram retirados das formas e submetidos à salga a 12°C por 5 horas,

em seguida, retirados da salmoura e, após secagem a 12°C por 24 horas, foram embalados a vácuo e estocados em câmara de maturação com 80% de umidade relativa (UR). Este processamento foi repetido duas vezes, sendo os queijos maturados na temperatura de 6°C ou 12°C, por 60 dias.

A salmoura foi preparada com cloreto de sódio comercial em concentração de 18%, seguida de pasteurização por 72 °C por 4 minutos. Em seguida foi resfriada, filtrada em dessorador e teve o pH ajustado a 5,2.

2.2 - Caracterização dos compostos voláteis por cromatografia gasosa

Amostras de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionados de enzimas proteolíticas após 1 e 60 dias de maturação foram trituradas e 1 g de cada amostra foi acondicionado em frascos de vidro com capacidade de 10 mL e tampa de borracha e mantido em bloco de aquecimento eletrônico à uma temperatura de 40 °C por 30 minutos, para atingir o equilíbrio térmico. Posteriormente, foi inserida no frasco a fibra de micro-extração em fase sólida (SPME) constituída de carboxen/polidimetilsiloxano (Supelco®) durante 15 minutos. Os compostos voláteis retidos na fibra foram injetados no cromatógrafo gasoso 5890 Series II (Hewlett Packard®, Palo Alto, EUA), empregando-se uma coluna capilar HP-FFAP de polietilenoglicol (50m x 0,22mm x 0,5µm) e detecção por ionização de chama (FID). Empregou-se como gás de arraste o nitrogênio numa vazão de fluxo de 1,5 mL/min, com injeção *splitless*. A temperatura inicial de aquecimento da coluna cromatográfica foi de 50°C por 2 minutos, com taxa de aquecimento de 10°C/min, temperatura final de 220°C por 10 minutos e temperatura do injetor e detector de 250°C, correspondendo a uma corrida de 28

minutos. Os padrões analíticos utilizados (1-hexanol, 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona, 2-butanona, 2-metil propanol, 2-propanol, 2-propanona, 2-propanona, 3-hidróxi 2-butanona, 3-metil 1-butanal, 3-metil 1-butanol, ácido etanóico, ácido butanóico, ácido hexanóico, butanal, butanoato de etila, butanol, dimetil sulfeto, estireno, etanal, etanoato de butila, etanol, etil benzeno, heptano, hexanal, hexanoato de etila, limoneno, metanotiol, pentanal, pentanol, propanol, tolueno e xileno) foram diluídos a uma concentração de 10 ppm.

2.3 – Caracterização de ésteres metílicos de ácidos graxos por cromatografia gasosa

Os lipídios das amostras foram extraídos a frio segundo o método de Bligh e Dyer (1959), após 1 e 60 dias de maturação.

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram obtidos segundo procedimento descrito pela *American Oil Chemists Society* (AOCS) Ce 2-66 (2002). Para análise cromatográfica de ésteres metílicos de ácidos graxos, utilizou-se um cromatógrafo a gás, marca Varian (Walnut Creek, USA), modelo GC 3900, equipado com detector de ionização de chama, injetor *split* e amostrador automático. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 de 60 m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,20 µm. A programação de temperatura da coluna foi iniciada em 90°C por 4 minutos, aquecida a 10°C/min até 195°C e mantida em isoterma durante 16 minutos. A temperatura utilizada no injetor foi de 230°C e no detector de 250°C. As amostras foram injetadas no volume de 1 µL, adotando-se a razão de divisão de 1:30. O gás de arraste foi o hidrogênio com velocidade linear de 30 mL/minutos. Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção de padrões puros de ésteres metílicos de ácidos

graxos Supelco 37 component FAME mix (Supelco, Bellefonte, USA), com pureza entre 99,1 e 99,9% e a quantificação foi feita por normalização de área (%).

2.4 – Análise estatística

A análise dos dados coletados foi realizada por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de comparação entre médias de Tukey a um nível de significância de 0,05. O software utilizado para tais análises foi o Minitab *release* 15.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Identificação dos compostos voláteis

Os compostos voláteis detectados nas análises de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzimas proteolíticas pertencem aos grupos químicos ácidos carboxílicos, álcoois, cetonas e compostos sulfurosos (Tabela 1).

Tabela 1 – Compostos voláteis identificados em queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzimas proteolíticas.

COMPOSTO	TR	PROCESSAMENTO					
		6°C			12°C		
		C	F	P	C	F	P
dimetil sulfeto	2,1	ND	-	0	ND	-	0
etanol	3,2	+	-	-	-	-	+
3-metil 1-butanol	6,4	ND	-	0	ND	-	-
3-hidróxi 2-butanona (acetoína)	8,0	-	-	0	-	-	-
ácido etanóico (ácido acético)	10,0	0	-	+	-	-	+
ácido butanóico	12,4	+	+	+	+	+	-
ácido hexanóico	15,2	+	0	+	0	+	-

TR: tempo de retenção (minutos); ND: não detectado; -: redução da concentração do composto durante a maturação; +: aumento da concentração do composto durante a maturação; 0: concentração do composto se manteve constante durante a maturação. C: controle; F: fastuosaína; P: Protemax® 403.

As Figuras 1 a 4, ilustram o perfil dos compostos voláteis nos queijos Prato com teor reduzido de gordura controle e adicionados de enzimas proteolíticas.

Foi detectada a presença de dimetil sulfeto nas amostras de queijo em que foram adicionadas enzimas proteolíticas, tanto a fastuosaína, de origem vegetal, como a Protemax® 403 de origem microbiana (Figuras 1 a 3). O dimetil sulfeto é produzido por meio da degradação de aminoácidos sulfurados, como a metionina, durante a maturação, demonstrando a ação das enzimas proteolíticas. Os resultados foram semelhantes aos descritos por Silva (2006), que verificou que a concentração de dimetil sulfeto em queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de cultura adjunta permaneceu constante durante a maturação. Segundo Fox et al. (2000) o dimetil sulfeto é um composto muito importante para o desenvolvimento de aroma em queijos.

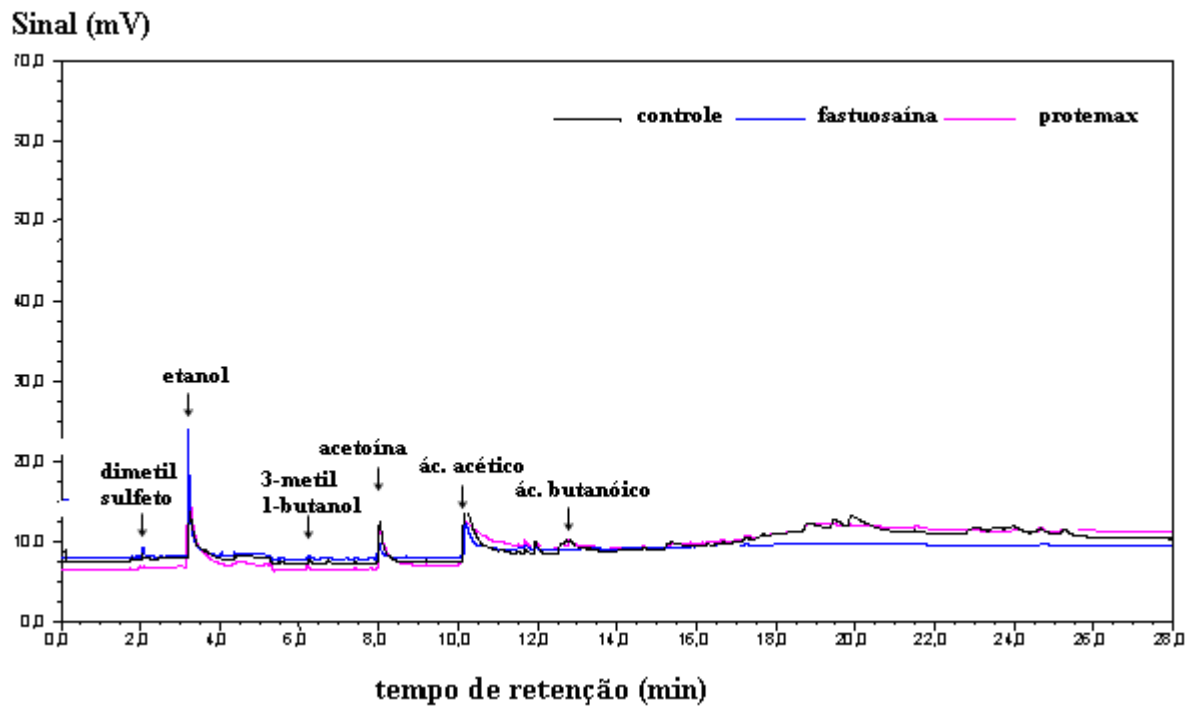


Figura 1 – Cromatograma das amostras dos queijos Prato com teor reduzido de gordura adicionado de 1.200.000 U. de enzima e maturado a 6°C, com 1 dia de maturação.

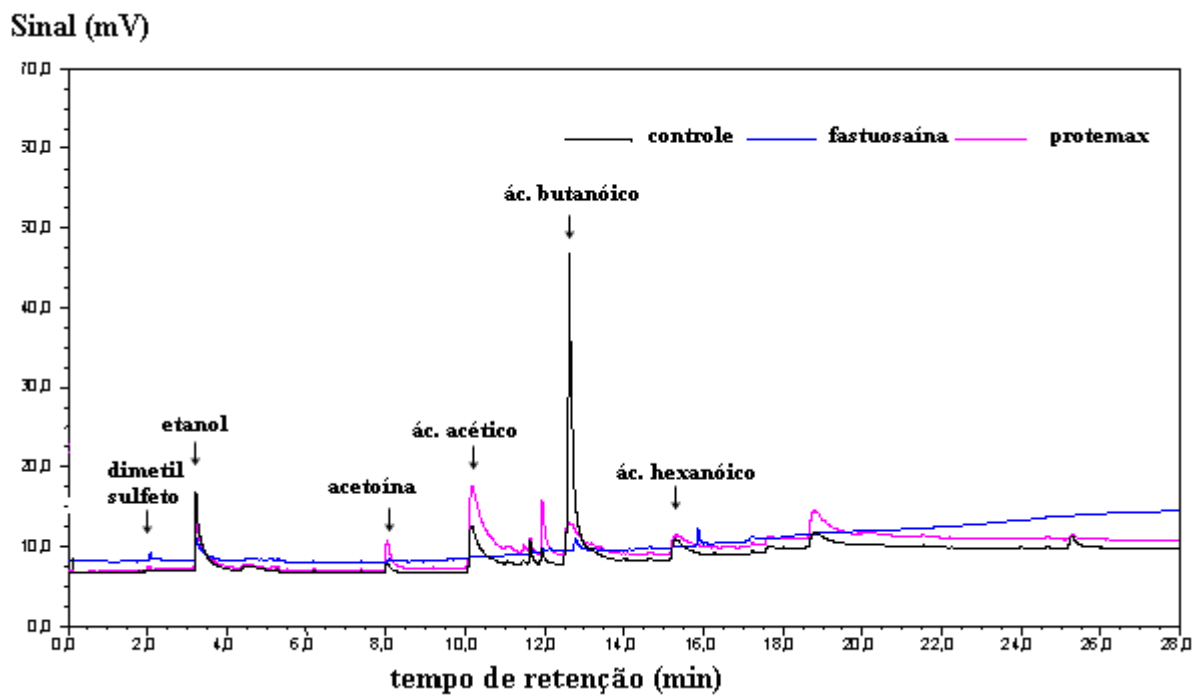


Figura 2 - Cromatograma das amostras dos queijos Prato com teor reduzido de gordura adicionado de 1.200.000 U. de enzima e maturado a 6°C, aos 60 dias de maturação.

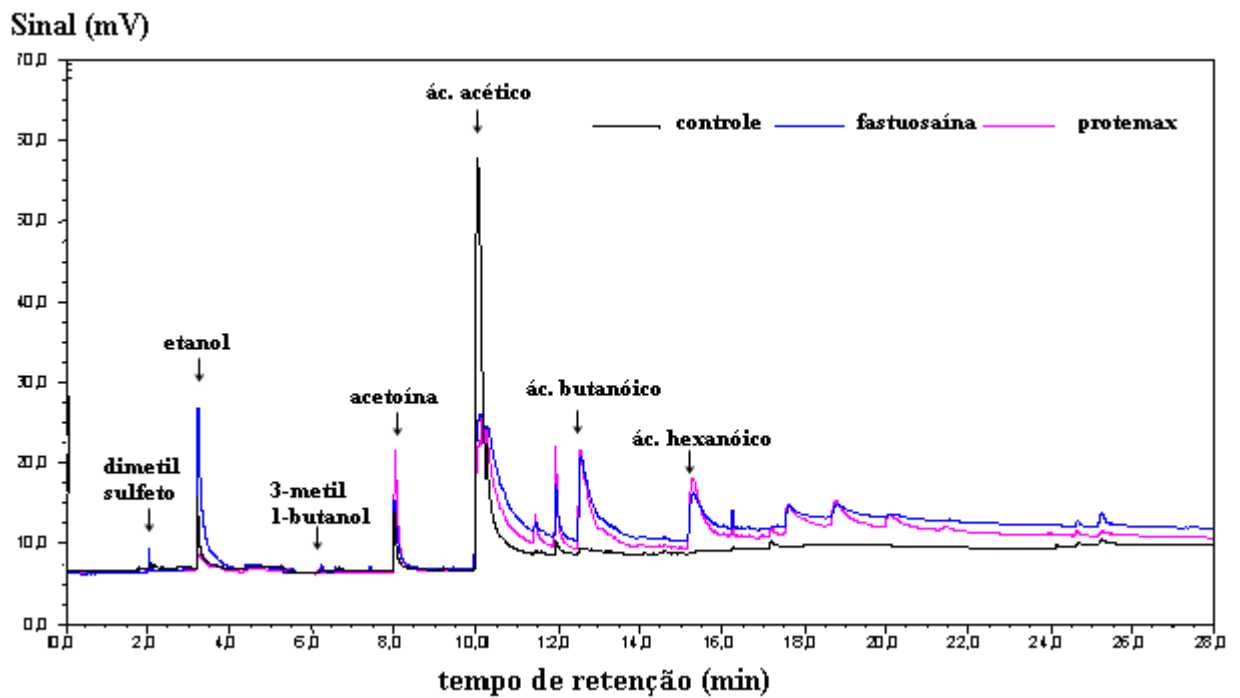


Figura 3 - Cromatograma das amostras dos queijos Prato com teor reduzido de gordura adicionado de 1.200.000 U. de enzima e maturado a 12°C, com 1 dia de maturação.

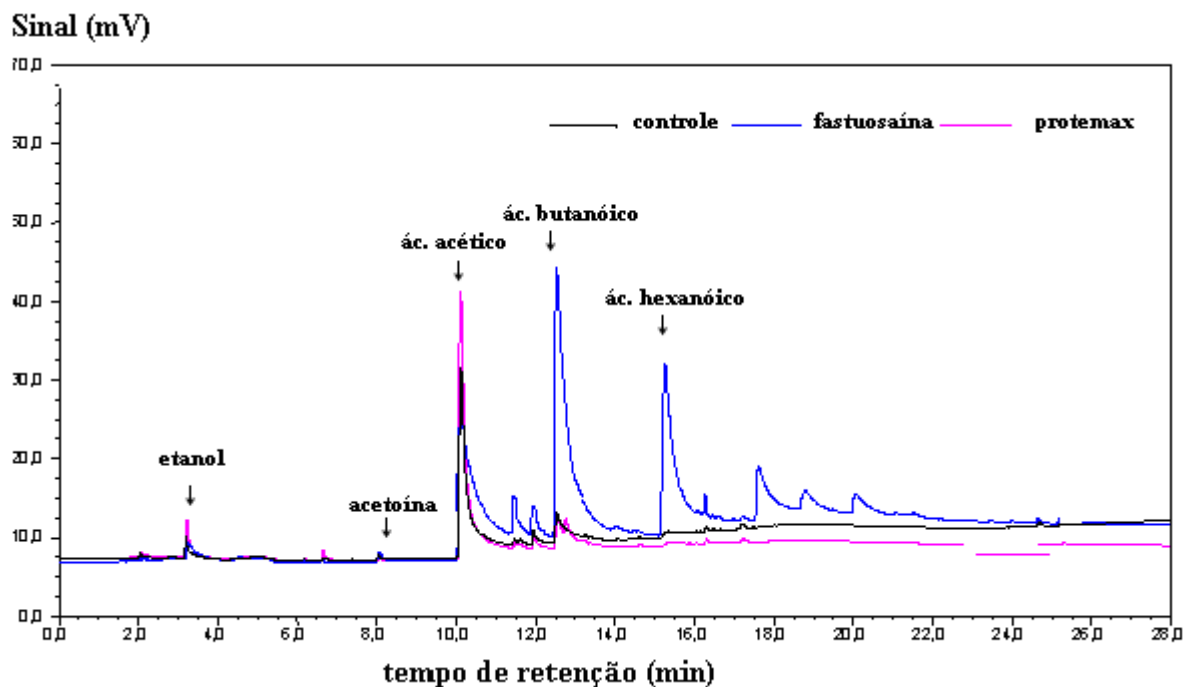


Figura 4 - Cromatograma das amostras dos queijos Prato com teor reduzido de gordura adicionado de 1.200.000 U. de enzima e maturado a 12°C, aos 60 dias de maturação.

Segundo Silva, Moreno e Van Dender (2006), etanol e ácido acético podem ser produzidos a partir da fermentação da lactose e de acordo com Rodrigues-Alonso, Centeno e Garabal (2009), compostos como a 2,3-butanodiona (diacetil) e os produtos de sua redução, 3-hidróxi 2-butanona (acetoína), 2-butanona, 2,3-butanodiol e 2-butanol são formados principalmente pelo metabolismo do citrato, ambos os processos por ação de bactérias ácido-láticas. A redução na concentração destes compostos durante a maturação, pode ser relacionada à diminuição de células viáveis capazes de produzir estes compostos. Mauriello et al. (2003) relacionaram a presença de álcoois como o 3-metil 1-butanol e o 2-fenil etanol, a compostos voláteis responsáveis pelo aroma de queijo fresco. Segundo Engels et al. (1997), o álcool 3-metil 1-butanol é formado pela redução de seu aldeído correspondente, derivado da leucina. A presença de álcoois pode ser associada a aromas de frutas e nozes em determinadas variedades de queijos, porém, podem ser responsáveis por defeitos no sabor, como no Gouda e Cheddar, quando presentes em altas concentrações (SILVA, 2006). Segundo Rodrigues-Alonso, Centeno e Garabal (2009), a presença de etanol não contribui diretamente para o desenvolvimento de *flavour*, mas se relaciona à formação de etil ésteres responsáveis pelo aroma de queijos.

Verificou-se, em geral, aumento nas concentrações dos ácidos butanóico e hexanóico durante a maturação. No primeiro dia de maturação, os queijos com adição de enzimas proteolíticas maturados a 12°C (Figura 3) apresentaram maiores concentrações destes ácidos em relação aos queijos controles e os maturados a 6°C (Figuras 1 e 2), pressupondo-se maior ação das enzimas proteolíticas com aumento da temperatura de maturação. Aos 60 dias, os queijos com adição da enzima fastuosaína maturados a 12°C apresentaram concentrações muito superiores às dos demais queijos, o que pode ser relacionado à ação desta enzima por um período superior ao da enzima Protemax® 403 (Figura 4).

Segundo Nogueira, Lubachevsky e Rankin (2005), os ácidos graxos livres são resultantes tanto da hidrólise da gordura, como do metabolismo da lactose, desaminação de aminoácidos e oxidação lipídica. O *flavour* de queijos com teor reduzido de gordura tem sido associado a baixos níveis de ácidos graxos como ácidos butanóico, hexanóico e metil cetonas. Os dados obtidos sugerem que nos queijos Prato com teor reduzido de gordura, a formação dos ácidos butanóico e hexanóico tenha ocorrido, principalmente, devido à proteólise, que foi intensificada com a adição de enzimas proteolíticas. Dependendo da concentração, os ácidos graxos podem contribuir positiva ou negativamente com o aroma dos queijos (COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003). Segundo Georgala et al. (2005) o ácido butanóico contribui com o desenvolvimento de *flavour* e gosto picante em queijo Feta. Silva (2006) detectou presença dos ácidos acético, butanóico e hexanóico em amostras de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de cultura adjunta. Segundo Frank, Owen e Patterson (2004), metanotiol, metional, dimetil trissulfeto e ácido butanóico são os componentes responsáveis pelo aroma básico em queijos. O ácido butanóico contribui com *flavour* característico de ranço, o hexanóico com *flavour* picante e de queijos azuis (COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003).

Mauriello et al. (2003) detectaram 27 compostos voláteis de queijo Mussarela e identificam 18, entre álcoois, aldeídos, cetonas, alcanos, ácidos graxos, compostos sulfurados e nitrogenados, lactonas e terpenos. Não foi detectada a presença de ésteres, que segundo os autores aparecem em produtos lácteos em baixas concentrações.

Horne et al. (2005) em estudos com queijo Piacentinu, fabricado com leite de ovelhas, observou alta concentração de ácido hexanóico, além da presença de aldeídos como nonanal, nonenal, decanal e vanilina, de ésteres como etilbutanoato e etilhexanoato, de dimetil sulfeto e dimetil trissulfeto. Compostos como 2,4-decadienal, 2-isopropil-3-metoxipirazina e 2-acetilhiazolina foram observados apenas após 4 meses de maturação, enquanto compostos

como ácido hexanóico, 1-octen-3ona e 2,6-dimetil-3-etilpirazina foram detectados após 2 a 4 meses de maturação.

Quian e Reineccius (2002) relataram a presença de ésteres em queijo Parmigiano-Reggiano, entre eles: etilbutanoato, etilhexanoato, etiloctanoato, etilpropanoato, etilpentanoato, etilhexanoato e etildecanoato. Identificaram ainda compostos responsáveis pelo odor, como 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, 2,4-hexadienal, 2-butenal, pentanal, hexanal, heptanal, diacetil, fenilacetaldeído, dimetiltrisulfeto e metional.

Nogueira, Lubachevsky e Rankin (2005) detectaram a presença de compostos como os ácidos acético, propanóico, 2-metilpropanóico, butanóico, pentanóico, hexanóico, 2-etilhexanóico, heptanóico, octanóico, nonanóico e decanóico em amostras de queijo Minas, sendo que as maiores concentrações foram de ácidos butanóico e hexanóico.

Partidário, Barbosa e Vilas Boas (1998) em estudos com queijo Serra da Estrela observaram aumento na concentração de ácidos graxos até a terceira semana de maturação e a presença de vinte compostos voláteis associados ao aroma de queijos, como acetaldeído, diacetil e cetonas.

Metabólitos secundários resultantes da lipólise, como metilcetonas, principalmente, 2-heptanona e 2-nonanona, são responsáveis pelo inconfundível *flavour* de queijos azuis. 2-Octanona, 2-nonanona, 2-decanona, 2-undecanona e 2-tridecanona apresentam notas de frutas, florais e de mofos. As lactonas contribuem, em geral, com as características de manteiga nos queijos, sendo as δ -lactonas responsáveis por notas de frutas, como de pêra e coco. Em queijos com teor reduzido de gordura o conteúdo de δ -decalactonas permanece praticamente constante durante a maturação, sendo responsável por notas amanteigadas em queijo Gouda (DIRINCK; DE WINNE, 1999). Ésteres foram associados a notas de frutas em queijos Gruyere e Parmesão, o que são consideradas indesejáveis em queijos Cheddar. Álcoois secundários, como 2-propanol, 2-butanol, 2-octanol e 2-nonanol são associados a

compostos aromáticos característicos de queijos azuis (COLLINS; McSWEENEY; WILKINSON, 2003).

Durante a maturação a 6°C, houve aumento nas concentrações dos ácidos butanóico, acético e hexanóico e a 12°C, houve redução na concentração de etanol e acetoína e aumento na concentração dos ácidos butanóico e hexanóico, demonstrando que a temperatura de maturação influenciou na liberação de compostos voláteis. Kraggerud et al. (2008) observaram que o aumento da temperatura de maturação foi o fator que mais influenciou as propriedades sensoriais dos queijos holandeses semi-duros, sendo positivamente relacionado ao odor, à intensidade de *flavour*, doçura e odor acético. Observaram ainda redução na intensidade de aromas sulfurosos durante a maturação.

3.2 – Identificação de ésteres metílicos de ácidos graxos

Os ácidos graxos predominantes nas amostras de queijo Prato foram: oléico (C_{18:1n9c}), esteárico (C_{18:0}), palmítico (C_{16:0}), mirístico (C_{14:0}), araquídico (C_{20:0}), butanóico (C_{4:0}), cáprico (C_{10:0}), láurico (C_{12:0}) e hexanóico (capróico) (C_{6:0}) (Figura 5 e Tabelas 2 e 3), semelhante aos relatados por Rocha (2004) que analisou o perfil de ácidos graxos em queijo Prato e verificou predominância destes ácidos, além de elaídico e palmitoléico. Perotti et al. (2005), em estudos com queijo Reggiano Argentino, observaram que os ácidos graxos que apresentaram maiores concentrações foram: oléico, palmítico, mirístico e esteárico.

As maiores concentrações foram de ácidos graxos de cadeias longas (> 12 carbonos), devido ao período de maturação relativamente curto. Estes ácidos graxos de cadeias longas desempenham um papel secundário no desenvolvimento de *flavour* em queijos. Em estudos

com queijo Parmigiano-Reggiano, um queijo de massa dura e de longa maturação, Quian e Reineccius (2002) relataram que os ácidos graxos livres predominantes foram os ácidos butanóico, hexanóico, octanóico e decanóico e Malacarne et al. (2009) relataram aumento no teor de ácidos graxos livres de cadeia curta, mais extensivamente que os de cadeia média, durante os 12 primeiros meses de maturação deste queijo e redução no teor de ácidos graxos de cadeia longa.

Queiroga et al. (2009) em estudos com queijos de leite de cabra comercializados no estado de Paraíba observaram predominância dos ácidos graxos palmítico ($C_{16:0}$), cáprico ($C_{10:0}$), oléico ($C_{18:1}$) e mirístico ($C_{14:0}$) nestes produtos.

Hauff e Vetter (2009) em estudos com queijos Mozzarella, Camembert e *Goat cream cheese*, com aproximadamente 45% de gordura no extrato seco, observaram que os ácidos graxos predominantes nas amostras foram palmítico ($C_{16:0}$), oléico ($C_{18:1}$), mirístico ($C_{14:0}$), esteárico ($C_{18:0}$).

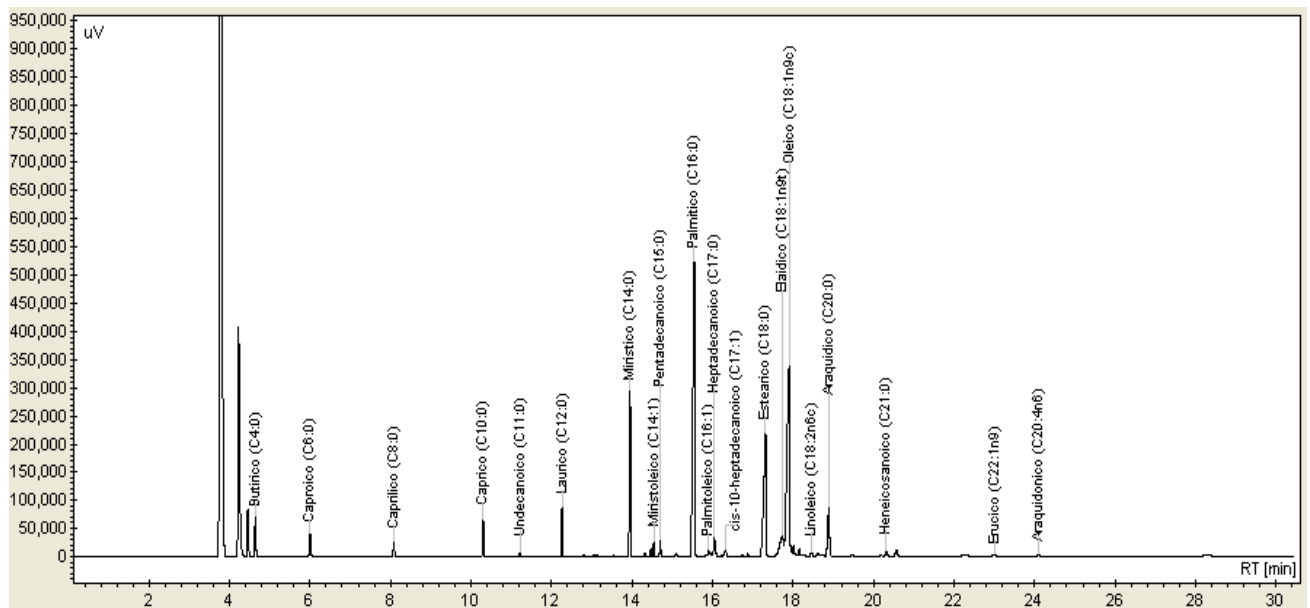


Figura 5 – Ilustração do perfil de ácidos graxos característico das amostras dos queijos Prato com teor reduzido de gordura controle e com adição de enzimas proteolíticas.

Com o aumento da temperatura de maturação de 6°C para 12°C nas amostras de queijo Prato com teor reduzido de gordura não se observaram alterações consideráveis nas concentrações de ácidos graxos livres (Tabela 2). Em ambos os tratamentos observaram-se maiores concentrações de ácidos graxos saturados, os quais são mais estáveis diante de processo degradativo da rancidez oxidativa (JORGE, 2009). Segundo Queiroga et al. (2009), as gorduras que contém ácidos graxos saturados, como os ácidos láurico, mirístico e palmítico, elevam os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) no sangue humano.

Os ácidos graxos monoinsaturados foram detectados em quantidades significativas nas amostras de queijo Prato com teor reduzido de gordura, sendo que o ácido oléico foi o que predominou em todas as amostras. Ácidos monoinsaturados, como oléico e os poliinsaturados, α -linolênico e linoléico, detectado nas amostras de queijo Prato, reduzem os níveis de LDL-colesterol e, conseqüentemente, os riscos de obesidade, câncer e doenças cardiovasculares (QUEIROGA et al., 2009). Os resultados demonstram que os queijos com teor reduzido de gordura apresentam elevada proporção de ácidos graxos saturados, e, portanto, devem ser consumidos de forma moderada.

Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos dos queijos Prato com teor reduzido de gordura controle e adicionados de enzimas proteolíticas e maturados a 6°C (Valores expressos em %).

ÁCIDO GRAXO	Controle		Fastuosáina		Protemax® 403	
	1 dia	60 dias	1 dia	60 dias	1 dia	60 dias
Butírico (C _{4:0})	3,34 ± 0,14 ^a	3,17 ± 0,04 ^{ab}	3,08 ± 0,12 ^{ab}	3,23 ± 0,18 ^{ab}	2,90 ± 0,13 ^{ab}	2,78 ± 0,12 ^b
Capróico (C _{6:0})	1,83 ± 0,07 ^a	1,73 ± 0,04 ^a	1,75 ± 0,05 ^a	1,82 ± 0,08 ^a	1,70 ± 0,08 ^a	1,67 ± 0,05 ^a
Caprílico (C _{8:0})	1,00 ± 0,04 ^a	0,97 ± 0,00 ^a	0,97 ± 0,02 ^a	1,00 ± 0,05 ^a	0,95 ± 0,05 ^a	0,94 ± 0,01 ^a
Cáprico (C _{10:0})	2,14 ± 0,06 ^a	2,17 ± 0,08 ^a	2,10 ± 0,03 ^a	2,13 ± 0,06 ^a	2,07 ± 0,10 ^a	2,08 ± 0,04 ^a
Undecanóico (C _{11:0})	0,18 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,00 ^a	0,18 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,01 ^a
Láurico (C _{12:0})	2,06 ± 0,03 ^a	2,02 ± 0,03 ^a	2,03 ± 0,03 ^a	2,05 ± 0,04 ^a	2,01 ± 0,08 ^a	2,02 ± 0,03 ^a
Mirístico (C _{14:0})	7,31 ± 0,00 ^a	7,31 ± 0,04 ^a	7,26 ± 0,04 ^a	7,29 ± 0,08 ^a	7,19 ± 0,26 ^a	7,28 ± 0,08 ^a
Miristoléico (C _{14:1})	0,45 ± 0,00 ^a	0,48 ± 0,08 ^a	0,44 ± 0,01 ^a	0,45 ± 0,03 ^a	0,44 ± 0,01 ^a	0,41 ± 0,02 ^a
Pentadecanóico (C _{15:0})	0,65 ± 0,01 ^a	0,65 ± 0,01 ^a	0,62 ± 0,03 ^a	0,65 ± 0,06 ^a	0,61 ± 0,05 ^a	0,51 ± 0,21 ^a
Palmítico (C _{16:0})	20,17 ± 0,01 ^a	20,33 ± 0,09 ^a	20,30 ± 0,04 ^a	20,18 ± 0,09 ^a	20,01 ± 0,76 ^a	20,34 ± 0,09 ^a
Palmitoléico (C _{16:1})	0,95 ± 0,20 ^a	0,90 ± 0,01 ^a	0,79 ± 0,08 ^a	0,59 ± 0,06 ^a	0,64 ± 0,01 ^a	0,81 ± 0,05 ^a
Heptadecanóico (C _{17:0})	0,94 ± 0,04 ^{ab}	0,81 ± 0,01 ^b	1,00 ± 0,01 ^a	1,01 ± 0,02 ^a	0,97 ± 0,08 ^a	0,98 ± 0,04 ^a
Cis-10-heptadecanóico (C _{17:1})	0,46 ± 0,01 ^a	0,44 ± 0,00 ^{abc}	0,45 ± 0,01 ^{ab}	0,44 ± 0,02 ^{abc}	0,39 ± 0,01 ^{bc}	0,39 ± 0,02 ^c
Esteárico (C _{18:0})	21,70 ± 0,01 ^a	21,60 ± 0,23 ^a	21,99 ± 0,17 ^a	21,82 ± 0,40 ^a	21,74 ± 0,91 ^a	22,16 ± 0,03 ^a
Elaídico (C _{18:1n9t})	0,64 ± 0,04 ^a	0,68 ± 0,01 ^a	0,64 ± 0,05 ^a	0,64 ± 0,01 ^a	0,55 ± 0,01 ^a	0,64 ± 0,11 ^a
Oléico (C _{18:1n9c})	30,46 ± 0,21 ^a	30,94 ± 0,02 ^a	30,73 ± 0,06 ^a	30,88 ± 0,03 ^a	32,05 ± 2,67 ^a	30,99 ± 0,41 ^a
Linoléico (C _{18:2n6c})	0,17 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,04 ^a	0,22 ± 0,06 ^a	0,18 ± 0,00 ^a
Araquídico (C _{20:0})	4,94 ± 0,06 ^a	4,91 ± 0,01 ^a	4,94 ± 0,01 ^a	4,94 ± 0,10 ^a	4,92 ± 0,18 ^a	5,01 ± 0,00 ^a
Araquidônico (C _{20:4n6})	0,14 ± 0,00 ^a	0,14 ± 0,00 ^a	0,14 ± 0,00 ^a	0,14 ± 0,00 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,00 ^a
Heneicosanóico (C _{21:0})	0,30 ± 0,06 ^a	0,23 ± 0,04 ^a	0,25 ± 0,00 ^a	0,25 ± 0,02 ^a	0,25 ± 0,01 ^a	0,26 ± 0,00 ^a
Erúcico (C _{22:1n9})	0,20 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,00 ^a	0,22 ± 0,01 ^a	0,20 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,03 ^a	0,16 ± 0,00 ^a
Saturado	66,54	66,07	66,44	66,52	65,43	66,17
Monoinsaturado	33,16	33,62	33,26	33,19	34,22	33,38
Poliinsaturado	0,31	0,32	0,30	0,30	0,36	0,31

^{a, b, c} Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos dos queijos Prato com teor reduzido de gordura controle e adicionados de enzimas proteolíticas e maturados a 12°C (Valores expressos em %).

ÁCIDO GRAXO	Controle		Fastuosáina		Protemax® 403	
	1 dia	60 dias	1 dia	60 dias	1 dia	60 dias
Butírico (C _{4:0})	3,26 ± 0,16 ^a	3,16 ± 0,30 ^a	3,01 ± 0,11 ^a	2,85 ± 0,08 ^a	3,03 ± 0,07 ^a	2,98 ± 0,02 ^a
Capróico (C _{6:0})	1,68 ± 0,06 ^a	1,68 ± 0,18 ^a	1,60 ± 0,06 ^a	1,54 ± 0,01 ^a	1,63 ± 0,02 ^a	1,58 ± 0,00 ^a
Caprílico (C _{8:0})	0,87 ± 0,02 ^a	0,89 ± 0,09 ^a	0,84 ± 0,04 ^a	0,83 ± 0,01 ^a	0,86 ± 0,01 ^a	0,81 ± 0,00 ^a
Cáprico (C _{10:0})	1,83 ± 0,02 ^a	1,85 ± 0,17 ^a	1,78 ± 0,08 ^a	1,75 ± 0,02 ^a	1,80 ± 0,01 ^a	1,74 ± 0,01 ^a
Undecanóico (C _{11:0})	0,16 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,00 ^a	0,15 ± 0,00 ^a	0,15 ± 0,00 ^a
Láurico (C _{12:0})	1,78 ± 0,01 ^a	1,80 ± 0,10 ^a	1,75 ± 0,08 ^a	1,73 ± 0,03 ^a	1,77 ± 0,01 ^a	1,74 ± 0,04 ^a
Mirístico (C _{14:0})	6,98 ± 0,02 ^a	7,08 ± 0,17 ^a	6,92 ± 0,38 ^a	6,96 ± 0,12 ^a	6,93 ± 0,03 ^a	7,04 ± 0,18 ^a
Miristoléico (C _{14:1})	0,45 ± 0,00 ^a	0,47 ± 0,05 ^a	0,47 ± 0,03 ^a	0,46 ± 0,00 ^a	0,48 ± 0,02 ^a	0,50 ± 0,01 ^a
Pentadecanóico (C _{15:0})	0,60 ± 0,09 ^a	0,52 ± 0,22 ^a	0,66 ± 0,03 ^a	0,64 ± 0,01 ^a	0,63 ± 0,01 ^a	0,68 ± 0,02 ^a
Palmítico (C _{16:0})	20,03 ± 0,13 ^a	20,24 ± 0,05 ^a	19,81 ± 1,35 ^a	20,15 ± 0,23 ^a	19,96 ± 0,35 ^a	20,50 ± 0,38 ^a
Palmitoléico (C _{16:1})	0,57 ± 0,14 ^a	0,71 ± 0,01 ^a	0,67 ± 0,06 ^a	0,69 ± 0,01 ^a	0,70 ± 0,02 ^a	0,71 ± 0,01 ^a
Heptadecanóico (C _{17:0})	1,06 ± 0,05 ^a	1,11 ± 0,01 ^a	1,11 ± 0,01 ^a	1,13 ± 0,02 ^a	1,10 ± 0,04 ^a	1,14 ± 0,02 ^a
Cis-10-heptadecanóico (C _{17:1})	0,41 ± 0,04 ^a	0,42 ± 0,02 ^a	0,41 ± 0,04 ^a	0,41 ± 0,04 ^a	0,40 ± 0,02 ^a	0,41 ± 0,03 ^a
Estearíco (C _{18:0})	21,07 ± 0,34 ^a	21,29 ± 0,60 ^a	20,82 ± 1,73 ^a	21,40 ± 0,11 ^a	21,03 ± 0,34 ^a	21,98 ± 0,36 ^a
Elaídico (C _{18:1n9t})	0,74 ± 0,04 ^a	0,35 ± 0,16 ^a	0,24 ± 0,34 ^a	0,65 ± 0,08 ^a	0,69 ± 0,00 ^a	0,41 ± 0,27 ^a
Oléico (C _{18:1n9c})	32,68 ± 0,01 ^a	32,15 ± 0,01 ^a	34,06 ± 4,91 ^a	32,82 ± 0,18 ^a	33,26 ± 0,57 ^a	31,78 ± 0,79 ^a
Linoléico (C _{18:2n6c})	0,22 ± 0,00 ^a	0,25 ± 0,06 ^a	0,16 ± 0,11 ^a	0,21 ± 0,00 ^a	0,21 ± 0,00 ^a	0,22 ± 0,01 ^a
Araquídico (C _{20:0})	5,06 ± 0,08 ^a	5,12 ± 0,20 ^a	5,00 ± 0,35 ^a	5,03 ± 0,05 ^a	4,98 ± 0,03 ^a	5,13 ± 0,08 ^a
Araquidônico (C _{20:4n6})	0,13 ± 0,00 ^a	0,13 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,00 ^a	0,14 ± 0,01 ^a
Heneicosanóico (C _{21:0})	0,29 ± 0,00 ^a	0,29 ± 0,03 ^a	0,29 ± 0,02 ^a	0,29 ± 0,00 ^a	0,30 ± 0,01 ^a	0,30 ± 0,01 ^a
Erúico (C _{22:1n9})	0,19 ± 0,05 ^{abc}	0,26 ± 0,01 ^a	0,16 ± 0,03 ^{abc}	0,21 ± 0,01 ^{ab}	0,10 ± 0,00 ^c	0,12 ± 0,03 ^{bc}
Saturado	64,63	65,17	63,71	64,43	64,14	65,74
Monoinsaturado	35,03	34,34	36,00	35,23	35,61	34,25
Poliinsaturado	0,35	0,38	0,29	0,35	0,34	0,35

^{a, b, c} Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

CONCLUSÕES

O aumento da temperatura de maturação e a adição de enzimas proteolíticas proporcionaram aumento na concentração de compostos voláteis e não influenciaram o perfil de ácidos graxos durante a maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura. Entre os voláteis, foi verificada a presença de ácidos graxos, álcoois, cetonas e compostos sulfurados. O perfil dos ácidos graxos demonstrou predominância de ácidos graxos de cadeia longa, saturados e monoinsaturados.

REFERÊNCIAS

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign, 2002.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

COLLINS, Y. F.; McSWEENEY, P. L. H.; WILKINSON, M. G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 11, p. 841-866, 2003.

DE WIT, M. et al. A comparative study of lipolysis and proteolysis in Cheddar cheese and yeast-inoculated Cheddar cheeses during ripening. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, n. 6, p. 606-616, 2005.

DELAHUNTY, C. M. et al. Comparison of dynamic flavor release from hard cheeses and analysis of headspace volatiles from mouth and flavor perception during consumption. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 71, n. 3, p. 273-281, 1996.

DIRINCK, P.; DE WINNE, A. Flavour characterization of cheeses by gas chromatographic-mass spectrometric profiling. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 847, n. 1/2, p. 203-208, 1999.

- ENGELS, W. J. M. et al. A comparative study of volatile compounds in water-soluble fraction of various types of ripened cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, n. 4, p. 255-263, 1997.
- FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publication, 2000. 587 p.
- FRANK, D. C.; OWEN, C. M.; PATTERSON, J. Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. **Food Science and Technology**, London, v. 37, n. 2, p. 139-154, 2004.
- GEORGALA, A. et al. Evolution of lipolysis during the ripening of traditional Feta cheese. **Food Chemistry**, London, v. 93, n. 1, p. 73-80, 2005.
- HAUFF, S.; VETTER, W. Quantification of fatty acids as methyl esters and phospholipids in cheese samples after separation of triacylglycerides and phospholipids. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 636, n. 2, p. 229-235, 2009.
- HORNE, J. et al. Differences in volatiles, and chemical, microbial and sensory characteristics between artisanal and industrial Piacentinu Ennese cheeses. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 6/9, p. 605-617, 2005.
- JORGE, N. **Química e tecnologia de óleos vegetais**. São Paulo: Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista; Pró Reitoria de Graduação, 2009. 165 p.
- KRAGGERUD, H. et al. Season and ripening temperature influence fatty acid composition and sensory properties of semi-hard cheese during ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, n. 8, p. 801-810, 2008.
- MALACARNE, M. et al. Free fatty acid profile of Parmigiano-Reggiano cheese throughout ripening: comparison between the inner and outer regions of the wheel. **International Dairy Journal**, Barking, v. 19, n. 10, p. 637-641, 2009.
- MAURIELLO, G. et al. Relationships between flavoring capabilities, bacterial composition, and geographical origin of natural whey cultures used for traditional water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 2, p. 486-497, 2003.
- MISTRY, V. V. Low fat cheese technology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4, p. 413-422, 2001.
- 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.
- NOGUEIRA, M. C. L.; LUBACHEVSKY, G.; RANKIN, S.A. A study of the volatile composition of Minas cheese. **Food Science and Technology**, London, v. 38, n. 5, p. 555-563, 2005.
- PARTIDÁRIO, A. M.; BARBOSA, M.; VILAS BOAS, L. Free fatty acids, triglycerides and volatile compounds in Serra da Estrela cheese – changes throughout ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 10/11, p. 873-881, 1998.

PEROTTI, M. C. et al. Free fatty acid profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 11, p. 1150-1155, 2005.

QUEIROGA, R. C. R. E. et al. Características físico-químicas, microbiológicas e perfil de ácidos graxos de queijos de leite de cabra comercializados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 3, p. 411-418, 2009.

QUIAN, M.; REINECCIUS, G. Identification of aroma compounds in Parmigiano-Reggiano cheese by gas chromatography/olfactometry. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 6, p. 1362-1369, 2002.

ROCHA, F. A. **Análise da gordura total e do perfil de ácidos graxos em queijos Mussarela, Prato e Ricota e comparação dos resultados experimentais com os teóricos**. 2004. 82 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana)–Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2004.

RODRÍGUEZ-ALONSO, P.; CENTENO, J. A.; GARABAL, J. I. Comparison of the volatile profiles of Arzúa-Ulloa and Tetilla cheeses manufactured from raw and pasteurized milk. **Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 10, p. 1722-1728, 2009.

SABIONI, J. G. Contribuição da atividade lipolítica e proteolítica na formação de flavor em queijos e no desenvolvimento de produtos aromáticos de origem láctea. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 312, p. 30-39, 2000.

_____; MORENO, I.; VAN DENDER, A. G. F. Principais transformações químicas que influenciam o “flavour” e a textura dos queijos maturados. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, ano 10, n. 61, p. 58-63, 2006.

SILVA, C. R. B. **Efeito do uso de *Lactobacillus casei* como cultura adjunta na qualidade tecnológica de queijo Prato com reduzido teor de gordura**. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

**CAPÍTULO 4: EFEITO DA ENZIMA PROTEOLÍTICA PROTEMAX® 403 NA
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E NAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS,
FÍSICAS E SENSORIAIS DE QUEIJO PRATO COM TEOR REDUZIDO DE
GORDURA**

RESUMO

O queijo Prato é o principal queijo maturado brasileiro e um dos queijos mais consumidos no país, com importante participação no mercado nacional de produtos lácteos. A procura por produtos lácteos de baixas calorias tem aumentado em função da crescente preocupação dos consumidores com a saúde. Porém, a produção de queijos com redução na gordura, sem alteração do processo de fabricação, resulta em um produto com textura mais dura e borrachenta, com redução na adesividade e coesividade. Além disso, a gordura no queijo tradicional é importante para mascarar o gosto amargo promovido pela proteólise. Neste trabalho, foi feito o estudo do uso da enzima proteolítica Protemax® 403 na produção de queijo e avaliada a composição química e as características microbiológicas, físicas e sensoriais durante a maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura. O uso da enzima proteolítica Protemax® 403 com atividade enzimática 1.200.000U. não influenciou a composição físico-química e microbiológica e a capacidade de derretimento dos queijos Prato com teor reduzido de gordura. Porém, modificou os valores de pH, a acidez, os índices de maturação, a textura, a microestrutura e as características sensoriais, demonstrando ação significativa da enzima.

Palavras-chave: queijo *light*, textura, microestrutura, bactérias lácticas, maturação.

ABSTRACT

Prato cheese is the main Brazilian ripened cheese, the most consumed cheese in country and has a important participation on national market of dairy products. The search for low calories dairy products has been increasing because of the concern with health. However, the reduction of the fat in cheeses without alteration in the technological process results in harder and rubbery texture, with reduction in the adhesiveness and cohesiveness. Moreover, the fat of traditional cheese is important to mask the bitterness taste promoted by proteolysis. In this work, the study of the use of the proteolytic enzyme Protemax® 403 on cheese production and the chemical composition, microbiological, physical and sensory characteristics of reduced fat Prato cheese during ripening was evaluated. The use of the proteolytic enzyme (Protemax® 403) with enzymatic activity 1.200.000U did not influence the physicochemical and microbiological characteristics and the meltability of the reduced fat Prato cheese. However, it modified the pH values, acidity, proteolysis indices, texture, microstructure and sensorial characteristics demonstrating a significant action of the enzyme.

Key words: light cheese, texture, microstructure, lactic bacteria, ripening.

1 – INTRODUÇÃO

A demanda por produtos lácteos com teor reduzido de gordura está aumentando em função da preocupação dos consumidores com a saúde, devido ao consumo de gordura de origem animal apresentar relação com doenças coronarianas e carcinogênicas. Porém, a redução da gordura em queijos sem alterações no processo tecnológico faz com que o produto adquira uma textura mais dura e borrachenta, com redução na adesividade e coesividade. Além disso, nos queijos tradicionais, a gordura pode mascarar o gosto amargo promovido pela proteólise (KATSUDA et al., 1999).

Queijos com teor reduzido de gordura normalmente necessitam de um maior período de maturação, devido às modificações nas propriedades físicas, como alterações na firmeza, adesividade e palatabilidade, uma vez que a gordura é considerada um importante ingrediente para os aspectos sensoriais e fisiológicos dos alimentos, sendo determinantes na sua textura. Para o queijo Prato a maturação é de no mínimo 25 dias (BRASIL, 1997). Para minimizar as alterações decorrentes da redução da gordura, é necessário que se utilize uma tecnologia que preserve a qualidade do produto final.

O sistema proteolítico dos *Lactococcus*, usados como cultura láctica na fabricação de queijos, envolve uma peptidase associada à parede celular e um sistema de transporte de aminoácidos e peptídeos, além de peptidases. As peptidases apresentam duas diferentes especificidades: a PI peptidase hidrolisa principalmente β -caseína e até certo ponto a κ -caseína, enquanto a PIII peptidase atua nas frações α_{s1} -, β - e κ - caseínas. A região C-terminal da fração β -caseína é totalmente hidrofóbica, produzindo peptídeos responsáveis pelo desenvolvimento de gosto amargo em queijos (FOX et al., 2000).

Preparados enzimáticos comerciais tais como NaturAge, Accelase, FlavourAge e DCA 50 podem acelerar a proteólise em queijos (FOX et al., 2000). A enzima proteolítica fastuosaína, extraída do fruto *Bromelia fastuosa* (gravatá) teve seu efeito estudado em queijo Prato com teor integral e com teor reduzido de gordura, mostrando redução no tempo de maturação e desenvolvimento de características desejáveis (LEITE; PITARELLO; PENNA, 2003, PENNA, 2006, GARCIA, 2007, GARCIA et al., 2009). A enzima comercial Neutrase[®], uma endopeptidase produzida por *Bacillus subtilis*, foi adicionada em queijo Prato com teor integral de gordura, mostrando redução no tempo de maturação (SILVA, 1998).

A enzima Protemax[®] 403 é um produto à base de endo e exopeptidases de grau alimentício derivada de uma cepa selecionada não geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae*, estando de acordo com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de grau alimentício definidas pela Organização Mundial de Saúde (FAO/WHO) e *Food Chemical Codex* (FCC). É utilizada para hidrolisar proteínas, de forma moderada a extensiva, reduzindo o amargor dos hidrolisados. Essa enzima é eficiente na hidrólise de diferentes tipos de proteínas, como gelatina, caseína, hemoglobina e proteínas de ovos, peixes, aves, entre outras proteínas animais. As condições recomendadas para atuação da enzima proteolítica ProteMax[®] 403 são pH entre 4,0 a 8,0, com um ótimo entre 5,0 e 7,0 e temperatura entre 25°C e 60°C, com um ótimo em 50°C (PROZYN, 200-).

Por outro lado, muitos autores relatam o desenvolvimento de gosto amargo em queijos com adição de enzimas e em queijos com baixo teor de gordura (SILVA et al, 2006, GARCIA, 2007). A análise sensorial permite identificar a presença ou ausência de diferenças perceptíveis, identificar e quantificar características importantes de forma rápida, além de identificar problemas particulares que não poderiam ser detectados por outros procedimentos analíticos (PENNA; HOFFMANN; BOZZETTI, 2002).

As características de textura em queijos maturados estão relacionadas principalmente à degradação das proteínas, que pode ser influenciada por fatores como umidade, sal, atividade proteolítica e peptidolítica das culturas lácticas (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987). Como os queijos com teor reduzido de gordura apresentam maturação lenta e alteração da relação sal/umidade, é comum o desenvolvimento de textura atípica.

O presente estudo avaliou o efeito da enzima proteolítica Protemax® 403 sobre a composição química e sobre as características microbiológicas, físicas e sensoriais de queijo Prato com teor reduzido de gordura durante a maturação.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Fabricação dos queijos

A partir de 50 litros de leite pasteurizado padronizado a 1,5% de gordura, os queijos foram produzidos em um tanque mecanizado, com capacidade de 56 L, dotado de controle de temperatura, na Planta Piloto do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, IBILCE, UNESP. Foram utilizados 2,5 mL de coagulante microbiano Chy-Max (Christian Hansen, Valinhos, Brasil), 5,0 mL de corante vegetal comercial extraído do urucum, 40 mL da cultura láctica: *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* (LL50 A, DSM Food Specialties Dairy Ingredients, Holanda) equivalente a 10^{16} UFC/mL, 50 mL de cloreto de cálcio em solução a 50% adicionado ao leite pasteurizado e 6 g de ácido sórbico (Clariant S.A., São Paulo, Brasil) dissolvidos em 150 mL de água destilada estéril, como

conservante, conforme permitido pela legislação. A coagulação do leite, realizada à temperatura de 32°C, ocorreu após aproximadamente 45 minutos, sendo posteriormente realizado o corte em grãos (0,3 – 0,5 cm³) e primeira agitação, por 15 minutos. Após este período, foi realizada a primeira dessora, com drenagem de aproximadamente 30% do volume de soro. Um volume de 8,5 L de água aquecida a 80°C foi adicionado à massa de queijo visando seu aquecimento a 38°C, seguindo a razão de 1°C a cada 3 minutos, totalizando 24 minutos. Em seguida foram realizadas: a segunda agitação, por 20 minutos e a segunda dessora, na qual foram drenados aproximadamente 60% do volume de soro. A massa de queijo foi dividida em duas partes.

Em 20 mL de água destilada estéril foram misturadas quantidades correspondentes à atividade enzimática de 1.200.000 U. da enzima Protemax® 403. A primeira parte de massa de queijo correspondeu ao queijo controle, à segunda parte foi adicionada a enzima Protemax® 403. As duas partes de queijos foram incubadas a 42°C por 20 minutos, visando intensificar a ação enzimática (SILVA, 1998, GARCIA, 2007, GARCIA et al., 2009). Após este período as massas foram colocadas em formas retangulares (13x7x9cm), obtendo-se 14 queijos, sendo 7 queijos controle e 7 com adição da enzima Protemax® 403, os quais foram pré-prensados por 30 minutos, invertidos em relação à posição na forma e na prensa e prensados por 24 horas. Após este período, os queijos foram retirados das formas e submetidos à salga a 12°C por 5 horas, em seguida, retirados da salmoura e, após secagem a 12°C por 24 horas, foram embalados a vácuo e estocados em câmara de maturação a 12°C com 80% de umidade relativa (UR) por 60 dias.

A salmoura foi preparada com cloreto de sódio comercial em concentração de 18%, seguida de pasteurização por 72 °C por 4 minutos. Em seguida foi resfriada, filtrada em dessorador e teve o pH ajustado a 5,2.

2.2 – Contagem de bactérias ácido-láticas

Para avaliar a viabilidade das bactérias lácticas *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* utilizadas no processamento de queijo Prato, foram realizadas contagens dos micro-organismos após 1, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação, com inoculação por profundidade em placas de Petri, utilizando-se o meio M17 Ágar. Após a inoculação, as placas foram incubadas invertidas a 30°C por 48 horas em aerobiose (FONTÁN et al., 2001; HYNES et al., 2002).

2.3 - Composição físico-química

A determinação da composição físico-química dos queijos foi realizada em triplicata, após 1 dia de fabricação. O teor do extrato seco total (EST) foi obtido por secagem em estufa a vácuo por 24 horas a 70°C (CASE; BRADLEY JR.; WILLIAMS, 1985) e a umidade foi calculada por $\text{Umidade (\%)} = 100 - \text{EST}$. O teor de gordura (G) foi obtido por Gerber–Van Gulik (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) e o teor de gordura no extrato seco (GES) foi calculado por $\text{GES (\%)} = (\text{G}/\text{EST}) \times 100$. As cinzas foram obtidas por incineração em mufla a 550°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) e o teor de sal foi quantificado por titulação com tiocianato de amônio (SERRES; AMARIGLIO; PETRANSXIENE, 1973). O teor de nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método de Kjeldahl, sendo o teor de proteína total calculado multiplicando-se o valor do nitrogênio total por 6,38 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1997).

2.4 – Caracterização dos parâmetros relacionados à maturação

Após 1, 30 e 60 dias, os seguintes parâmetros foram determinados, em triplicata. A acidez foi obtida por titulação com NaOH 0,1 N e solução de fenolftaleína como indicador, sendo expressa em porcentagem de ácido láctico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). O teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH4,6) foi determinado pela dosagem do nitrogênio total no filtrado após precipitação isoelétrica das caseínas e o teor de nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS TCA12%) obtido pela dosagem de nitrogênio total no filtrado após precipitação da totalidade das proteínas em presença do ácido tricloroacético a 12% (SILVA et al., 1997). Os índices de extensão (NS pH4,6/NT) e profundidade da maturação (NS TCA 12%/NT) foram determinados segundo Wolfschoon-Pombo (1983):

$$NS_{pH4,6} / NT = \frac{NNC}{NT} \times 100 \quad (1)$$

$$NSTCA12\% / NT = \frac{NNP}{NT} \times 100 \quad (2)$$

Para a avaliação das frações protéicas por eletroforese em gel de poliacrilamida (Urea-PAGE), as amostras de queijos Prato controle e modificado foram coletadas após 1, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação e congeladas para posterior avaliação, usando o método descrito por Shalabi e Fox (1987). Os géis foram corados *overnight* com Coomassie Brilliant Blue G-250 e descorado com solução de metanol/ácido acético/água 3:1:6.

2.5 – Características físicas

Capacidade de Derretimento

A capacidade de derretimento (CD) foi determinada, em quintuplicata, após 1, 30 e 60 dias de maturação pelo método modificado de Schreiber, conforme descrito por Kosikowski e Mistry (1997), consistindo em retirar da peça de queijo um cilindro de 36 mm de diâmetro. Com o auxílio de um fatiador, foram cortados discos de 5 mm de espessura. As fatias foram colocadas em placas de Petri divididas em 8 áreas iguais por meio de diâmetros. Após 1 hora a temperatura ambiente, foram medidos 8 diâmetros iniciais (D_i) da amostra e as placas transferidas para a estufa a 130°C por 10 minutos (NONOGAKI; MONTEIRO; GIGANTE, 2004). Posteriormente, as placas foram deixadas por 30 minutos à temperatura ambiente e os diâmetros finais (D_f) de cada amostra foram medidos, sendo a capacidade de derretimento calculada por:

$$CD(\%) = \frac{(D_f^2 - D_i^2)}{D_i^2} \times 100 \quad (3)$$

Perfil de textura

O perfil de textura dos queijos foi avaliado após 1 e 60 dias de maturação utilizando-se o texturômetro TA-XT2 Stable Micro Systems (Stable Micro Systems, Haslemere, Inglaterra). As amostras de queijo foram cortadas em formato cilíndrico, com 2,5 cm de diâmetro e 2,0 cm de altura. O procedimento adotado foi o de dupla compressão, utilizando-se um cilindro de acrílico (probe) de 3,5 cm de diâmetro, com velocidade de deslocamento de 2,0 mm/s e distância percorrida de 6,0 mm. Foram determinados, em quintuplicata, os parâmetros: dureza, fraturabilidade, elasticidade, coesividade, mastigabilidade, gomosidade, adesividade e resiliência (GONZÁLEZ et al., 1998).

Microestrutura em microscópio eletrônico de transmissão (TEM)

A caracterização da microestrutura por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica do IBILCE – UNESP, nas amostras de queijo Prato com teor reduzido de gordura controle e com adição da enzima proteolítica Protemax® 403, após 1 e 60 dias (GARCIA, 2007).

2.6 – Avaliação sensorial - Teste de aceitação

Os testes de aceitação, aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, foram realizados nas amostras de queijo tipo Prato controle e com adição da enzima Protemax ® 403 após 30 e 60 dias de maturação. Foram avaliados os atributos aparência, aroma, sabor, textura e impressão global por meio de escala hedônica estruturada de nove pontos, em que 1 = desgostei extremamente e 9 = gostei extremamente. Para a intenção de compra, foi utilizada escala estruturada de cinco pontos, em que 1 = certamente não compraria e 5 = certamente compraria. Foram recrutados, aleatoriamente, 30 provadores não treinados para cada dia de análise. As avaliações sensoriais foram realizadas nos períodos da manhã (entre 9 e 11 horas) e tarde (entre 15 e 17 horas) em cabines individuais, sob luz branca. Os provadores receberam uma bandeja contendo as amostras de queijos, apresentadas de forma monádica em pratos descartáveis brancos, codificados com três dígitos, água e uma ficha de avaliação. As amostras de queijos estavam cortadas em cubos de aproximadamente 2 cm de aresta, a uma temperatura de 12°C, sendo aleatória a ordem de apresentação aos provadores (BARROS, 2005).

2.7 – Análise estatística dos resultados

Para a verificação da homogeneidade das variâncias dos resultados experimentais, realizou-se o teste de Levene. Para comparação dos resultados físico-químicos entre as amostras de queijos controle e com adição da enzima Protemax® 403 foram aplicados o teste

t para amostras emparelhadas para análises referentes a um mesmo período de maturação e a análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey foram aplicados para as análises dos resultados de queijos submetidos a um mesmo tratamento em diferentes dias de maturação.

Para a avaliação dos resultados sensoriais aplicou-se o teste de Mann-Whitney para análises estatísticas para comparação dos tratamentos (controle e com adição de Protemax® 403) e também para os períodos de maturação (30 e 60 dias).

As análises estatísticas foram realizadas considerando-se um nível de significância de 0,05, utilizando-se o programa computacional Minitab *release* 15.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Evolução da população de bactérias ácido-láticas

Houve redução na contagem dos micro-organismos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* durante o período de maturação (Figura 1).

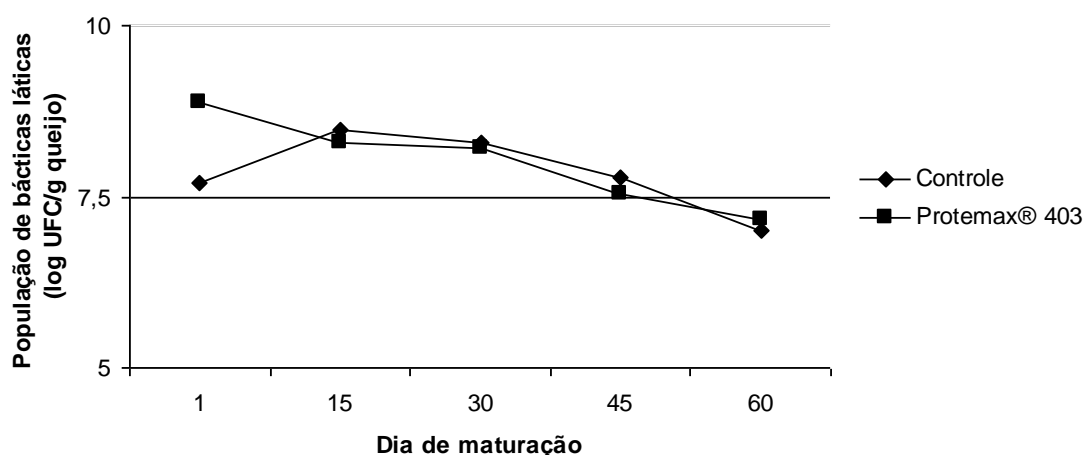


Figura 1 – Evolução da cultura láctica durante a maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura.

Populações das grandezas encontradas são comuns em queijo Prato. Barros (2005) obtiveram contagem da ordem de 10^7 UFC/g queijo de *Lactococcus* em queijo Prato com teor reduzido de gordura. Vianna et al. (2008) obtiveram contagens de aproximadamente 9 log UFC/g queijo em queijo Prato fabricado com leite com diferentes níveis de células somáticas. Ambos verificaram redução na contagem microbiana durante a maturação. Segundo Fontán et al. (2001), as maiores contagens de bactérias lácticas são obtidas nas duas primeiras semanas de maturação, conforme verificado em estudo com queijo San Simon e também com as amostras de queijos deste experimento. As bactérias lácticas predominam a microbiota durante a maturação aproximadamente até o 56º dia, sendo que, após este período, elas se tornam inviáveis em decorrência da autólise celular e liberação de enzimas intracelulares na matriz do queijo. Nas fases intermediárias e finais da maturação, as bactérias não pertencentes à cultura láctica tornam-se dominantes na microbiota do queijo (BERESFORD et al., 2001).

O *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* é responsável por conferir melhor *flavour* aos queijos e o *Lc. lactis* subsp. *lactis* é capaz de se desenvolver a 40°C e na presença de até 4%

de NaCl, produzindo NH_3 a partir da arginina e fermentando a maltose, além de produzir ácido γ -aminobutírico a partir do glutamato (FOX et al., 2000).

A análise estatística não revelou diferenças estatisticamente significativas durante a maturação ($P = 0,2453$) entre as contagens de bactérias lácticas dos queijos Prato controle e com adição da enzima Protemax® 403, pressupondo-se que a enzima não influenciou o desenvolvimento da cultura láctica durante a maturação.

3.2 – Composição físico-química dos queijos

As amostras de queijo Prato controle e com adição da enzima Protemax® 403 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) em relação à composição físico-química (Tabela 1).

Os queijos puderam ser classificados como de média umidade (36 a 46%) (BRASIL, 1997). Porém, apresentaram valores de umidade menores que os descritos em outros estudos com queijo Prato com teor reduzido de gordura (BARROS, 2005, SILVA, 2006, GARCIA, 2007).

O queijo Prato integral é classificado como gordo, devendo apresentar de 45,0 a 59,9% de gordura no extrato seco. Um produto para ser considerado “light” deve apresentar uma redução mínima de 25% em relação ao conteúdo comparativo de nutrientes (BRASIL, 1998). Considerando-se o valor médio de 48% de gordura no extrato seco, os queijos Prato controle e com adição de enzima proteolítica apresentaram uma redução de 25% em relação ao integral. O teor de gordura dos queijos foi superior aos determinados por Barros (2005), de

aproximadamente 19%, por Silva (2006), de aproximadamente 17% e por Garcia (2007), aproximadamente 18%, em queijos Prato com teor reduzido de gordura.

Os queijos apresentaram baixo teor de sal (Tabela 1). Segundo Furtado e Lourenço Neto (1994), o teor médio de sal em queijos situa-se entre 1,6 e 1,9% (relação sal/umidade de aproximadamente 3,8 a 4,5%), sendo assim, os valores encontrados nas amostras analisadas estão abaixo dos citados na literatura, uma vez que os queijos com menor teor de umidade apresentarem menor difusão de sal na massa, resultando em menor absorção.

Tabela 1 – Composição físico-química dos queijos Prato com teor reduzido de gordura.

Parâmetro	Tratamento		Valor P
	Controle	Protemax® 403	
Umidade %	42,39 ± 0,04 ^a	42,09 ± 0,13 ^a	0,081
Gordura %	21,0 ± 0,0 ^a	21,0 ± 0,0 ^a	1,000
GES %	36,45 ± 0,02 ^a	36,27 ± 0,08 ^a	0,081
Cinzas %	4,63 ± 0,05 ^a	4,55 ± 0,02 ^a	0,081
Proteína total %	28,69 ± 0,41 ^a	29,18 ± 0,28 ^a	0,081
Sal %	1,17 ± 0,03 ^a	1,15 ± 0,10 ^a	1,000
sal/umidade %	2,76 ± 0,03 ^a	2,73 ± 0,10 ^a	1,000

GES: gordura no extrato seco. ^a Letras iguais na mesma linha não apresentam diferenças estatisticamente significativas (P > 0,05).

A comparação entre os queijos controle e com adição de enzima Protemax® 403 apresentou diferenças estatisticamente significativas (P < 0,05) em relação aos parâmetros acidez, NS pH 4,6/NT e NS TCA12%/NT, considerando-se o mesmo dia de maturação, sendo que as maiores médias foram obtidas para as amostras de queijos com adição de enzima proteolítica (Figuras de 2 a 5).

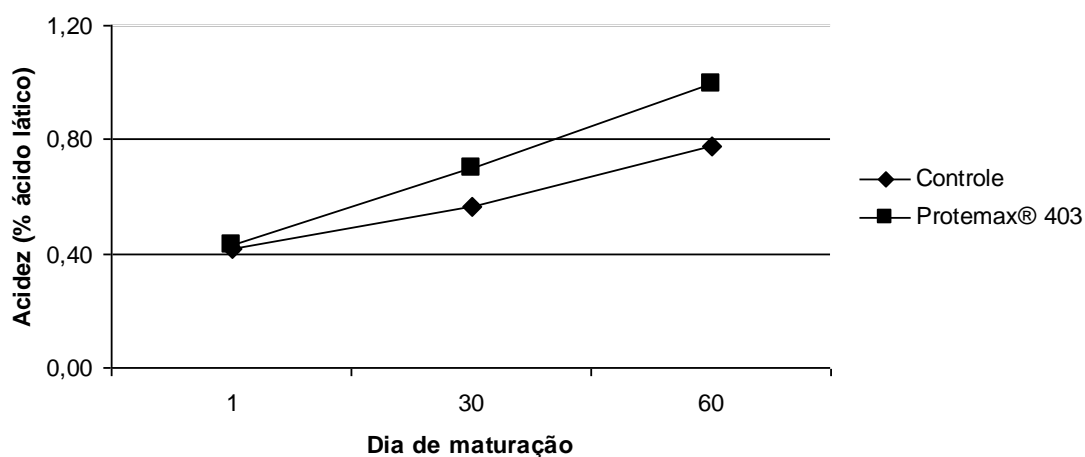


Figura 2 – Evolução da acidez dos queijos Prato com teor reduzido de gordura controle e com adição da enzima Protemax® 403, durante a maturação.

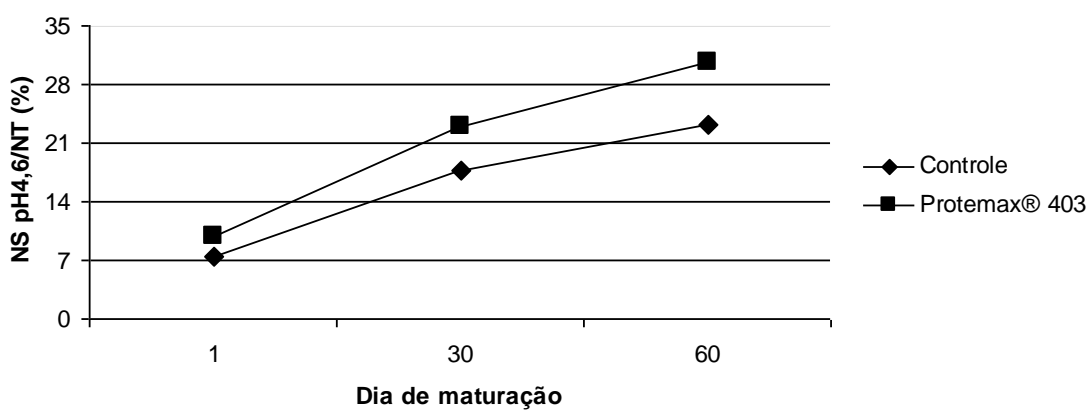


Figura 3 – Evolução da extensão da maturação (NS pH 4,6/NT) dos queijos Prato com teor reduzido de gordura controle e com adição da enzima Protemax® 403, durante a maturação.

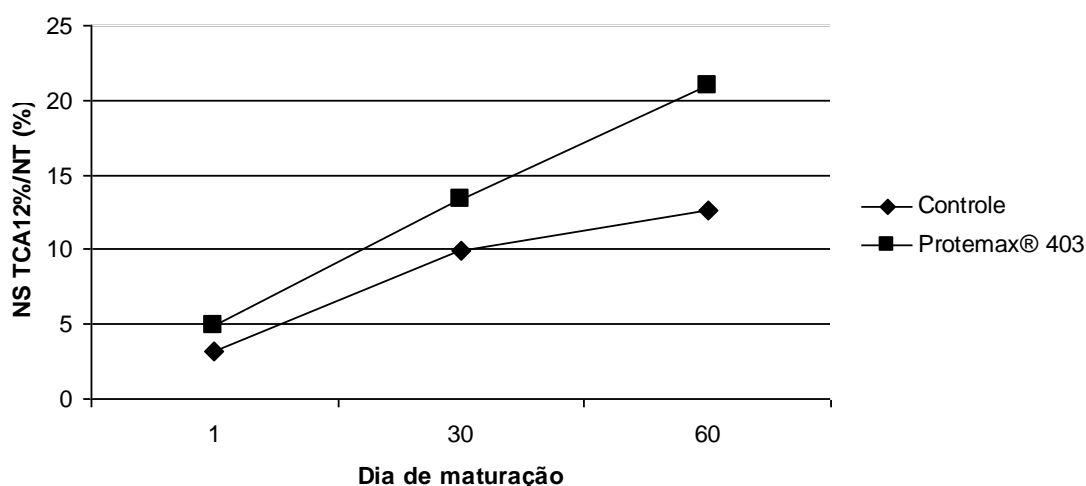


Figura 4 – Evolução da profundidade da maturação (NS TCA 12%/NT) dos queijos Prato com teor reduzido de gordura controle e com adição da enzima Protemax® 403, durante a maturação.

Houve aumento significativo da acidez (Figura 2) e da proteólise (Figuras 3 e 4), em ambos os processos, com o tempo de maturação, para queijos submetidos ao mesmo tratamento ($P < 0,05$). Este aumento pode ser relacionado ao crescimento de bactérias ácido láctica, devido à fermentação da lactose, com formação de ácido láctico e à liberação de aminoácidos, particularmente leucina, isoleucina e valina a partir da caseína (FOX et al., 2000). A partir do 15º dia de maturação observou-se redução na população de bactérias lácticas, podendo-se relacionar, portanto, o aumento da acidez durante a maturação à autólise da cultura láctica com liberação de peptidases intracelulares que atuaram juntamente com a enzima proteolítica Protemax® 403, degradando os peptídeos presentes no meio.

A ação da enzima proteolítica fica evidenciada pelo maior aumento dos índices de extensão e profundidade de maturação em relação aos queijos controle, demonstrando que a enzima atuou tanto na degradação de peptídeos de alto como de baixa massa molecular.

Os índices de extensão e profundidade da maturação, expressos por NS pH 4,6/NT e NS TCA 12%/NT foram superiores aos obtidos por Moreno et al., 2002, Narimatsu et al., 2003, Barros et al., 2006 e Garcia et al. (2009), em estudos com queijo Prato, demonstrando a ação significativa da enzima na maturação do queijo Prato com teor reduzido de gordura. A enzima Protemax® 403 promove a hidrólise protéica, por meio de endopeptidases, resultando em pequenos peptídeos que possuem aminoácidos terminais hidrofóbicos e a hidrólise posterior com exopeptidases, que degradam estes peptídeos (PROZYN, 200-).

O perfil eletroforético em gel de poliacrilamida Urea-PAGE (Figura 5) representa a proteólise dos queijos Prato com teor reduzido de gordura controle e com adição de Protemax® 403, com a degradação da caseína (CN) nas frações β , α_{s1} , α_{s1-I} e frações da α_{s2} -CN.

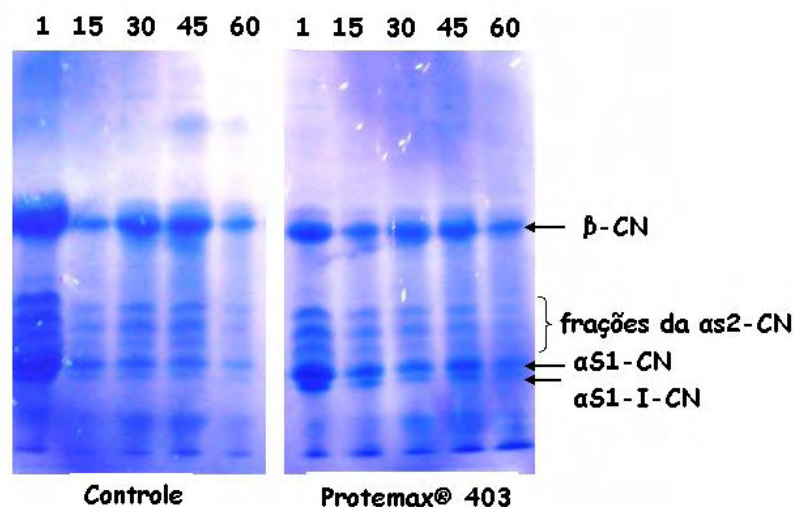


Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (Urea-PAGE) dos queijos controle e com adição da enzima Protemax® 403 durante a maturação. 1, 15, 30, 45 e 60: Dias de maturação.

Não se observou degradação significativa da fração β -CN, em γ -CN nos queijos Prato controle e com adição da enzima Protemax® 403. Esta degradação ocorre devido à ação, principalmente, da plasmina, enzima natural do leite. Estes resultados diferem dos observados

por Silva (1998) em queijos Prato com adição de enzima proteolítica, que observou maior degradação da β -caseína nos queijos modificados em relação ao tradicional.

As frações da α_{s2} desapareceram gradualmente durante a maturação dos queijos (Figura 5), principalmente na amostra de queijo com adição da enzima proteolítica, provavelmente pela ação das exopeptidases da Protemax® 403.

O aparecimento da α_{s1} -I caseína a partir da degradação da α_{s1} -CN foi mais extensa que a degradação da fração β -CN e maior para os queijos com adição da enzima, conforme relatado por outros autores em estudos com queijo Prato (SILVA, 1998; BARROS, 2005; SILVA, 2006; GARCIA, 2007). Na maioria das variedades de queijos, a fração β -caseína é mais resistente à degradação que a α_{s1} -CN (FOX; McSWEENEY, 1997).

Os queijos com reduzido teor de gordura apresentam maior conteúdo de proteína no extrato seco do que os queijos com teor integral de gordura, o que pode alterar a atividade proteolítica das enzimas e a subsequente degradação da proteína nestes queijos, observada por meio da eletroforese (SILVA, 2006).

3.3 – Características físicas

Derretimento

Apesar da diferença numérica (Tabela 2), os queijos Prato controle e com adição da enzima Protemax® 403 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação à capacidade de derretimento ($P = 0,997$, $P = 0,979$ e $P = 0,315$) no 1º, 30º e 60º dias

de maturação, respectivamente, comparando-se os queijos submetidos aos diferentes tratamentos.

O derretimento tende a ser maior com o aumento da degradação protéica (SANCHEZ, 1999), o que não se observou para o queijo com adição da enzima proteolítica embora este tenha apresentado índices de extensão (NS pH 4,6/NT) e de profundidade (NS TCA 12%/NT) da maturação superiores aos do queijo controle. Os queijos apresentaram capacidade de derretimento menor que as observadas em queijos Prato com teor integral de gordura (NARIMATSU et al., 2003, NONOGAKI; MONTEIRO; GIGANTE, 2007).

Queijos com teor reduzido de gordura apresentam insuficiente difusão da gordura na superfície a 38°C, na qual começa a se tornar líquida. Em altas temperaturas, a superfície desidrata-se rapidamente, ocorrendo formação de bolhas e resultando em uma aparência atípica. Além disso, queijos com baixo teor de umidade, conforme o observado no presente estudo, influenciam negativamente o derretimento de queijos com baixo teor de gordura (COSTA; FURTADO, 2002). Frente a tais resultados, torna-se necessário o desenvolvimento de um método para melhor expressar a capacidade de derretimento de queijos com teor reduzido de gordura.

Tabela 2 – Capacidade de derretimento dos queijos Prato controle e modificados.

Tratamentos	1 dia	30 dias	60 dias
Controle	-75,38 ± 119,49 ^a	10,54 ± 106,92 ^a	-22,46 ± 26,16 ^a
Protemax® 403	-75,08 ± 9,64 ^a	11,58 ± 51,61 ^a	35,25 ± 88,55 ^a

^aLetras iguais na mesma linha não apresentam diferenças estatisticamente significativas (P > 0,05).

O aumento da capacidade de derretimento durante a maturação está mais relacionado à hidrólise secundária das proteínas do que com a hidrólise inicial. Estudos em queijo Cheddar

não encontraram associação entre a hidrólise da α_{s1} -CN e derretimento, mas a degradação da β -CN foi correlacionada com o aumento do derretimento do queijo (BOGENRIEF; OLSON, 1995). Dave et al. (2003) sugerem que o padrão de degradação das proteínas do queijo, principalmente da α_{s1} -CN, pode variar e então ocupar um importante papel na funcionalidade.

Perfil de textura

A comparação entre os queijos controle e com adição de enzima Protemax® 403 no primeiro dia de maturação, apresentou diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$), em relação aos parâmetros dureza ($P = 0,003$), coesividade ($P = 0,003$), gomosidade ($P = 0,001$) e mastigabilidade ($P = 0,024$) e aos 60 dias de maturação houve diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) em relação à: fraturabilidade ($P = 0,046$), coesividade ($P = 0,017$) e resiliência ($P = 0,003$), sendo que as menores médias foram sempre observadas para os queijos em que se adicionou a enzima proteolítica (Tabela 3).

A adição da enzima Protemax® 403 resultou em queijos com menor coesividade (Tabela 3), que se relaciona a extensão a que um material pode ser deformado antes da ruptura. Os valores obtidos foram maiores que os citados para queijo Prato com baixo teor de gordura. Garcia (2007) obteve valores de coesividade que variaram de 0,43 a 0,80, enquanto Katsuda et al. (1999), obtiveram valores variando de 0,45 a 0,56. Silva (2006), em estudos com adição de cultura adjunta em queijo Prato com teor reduzido de gordura, observou variação nos valores de coesividade de 0,40 a 0,87. Porém, em estudos com queijo Prato com teor integral de gordura, Leite et al. (2004) obtiveram variação de 1,02 a 1,09. Este parâmetro

pode ser relacionado ao teor de gordura dos queijos, considerada um importante ingrediente que proporciona maciez e cremosidade em alimentos, influenciando a textura (PINHEIRO, PENNA, 2004).

Tabela 3 – Perfil de textura dos queijos Prato com teor reduzido de gordura.

Parâmetros	1 dia		60 dias	
	Controle	Protamax® 403	Controle	Protamax® 403
Dureza (gf)	7215,05 ± 336,47 ^{Aa}	6818,00 ± 282,87 ^{Bb}	5172,60 ± 148,58 ^{Aa}	5087,34 ± 527,50 ^{Ba}
Fraturabilidade	10,24 ± 0,23 ^{Aa}	11,99 ± 1,66 ^{Aa}	10,85 ± 0,27 ^{Aa}	9,55 ± 0,25 ^{Ab}
Adesividade (gf.s)	-14,53 ± 5,26 ^{Aa}	-37,87 ± 13,68 ^{Ba}	-48,22 ± 12,76 ^{Aa}	-96,66 ± 35,24 ^{Ba}
Elasticidade	0,93 ± 0,02 ^{Aa}	0,94 ± 0,01 ^{Aa}	0,93 ± 0,05 ^{Aa}	0,84 ± 0,04 ^{Aa}
Coesividade	0,88 ± 0,00 ^{Aa}	0,86 ± 0,00 ^{Bb}	0,87 ± 0,00 ^{Aa}	0,83 ± 0,00 ^{Bb}
Gomosidade	6312,16 ± 294,08 ^{Aa}	5848,21 ± 250,47 ^{Ab}	4494,30 ± 586,03 ^{Aa}	3606,11 ± 414,57 ^{Aa}
Mastigabilidade	5845,22 ± 408,46 ^{Aa}	5505,85 ± 277,14 ^{Bb}	4159,33 ± 620,23 ^{Aa}	3066,19 ± 414,57 ^{Ba}
Resiliência	0,50 ± 0,00 ^{Aa}	0,49 ± 0,00 ^{Aa}	0,48 ± 0,00 ^{Aa}	0,40 ± 0,01 ^{Ab}

^{A, B} Letras iguais na mesma linha, para as mesmas amostras (Controle ou Protamax® 403), não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$). ^{a, b} Letras iguais na mesma linha, para os mesmos dias de maturação, não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

Observou-se que os parâmetros dureza, adesividade, gomosidade e mastigabilidade, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre os dias de maturação para os queijos submetidos ao mesmo tratamento, demonstrando o efeito do processo de maturação nas características de textura dos queijos. Porém, em geral, não se verificou efeito considerável da adição de enzima proteolítica em relação aos parâmetros de textura instrumental e sensorial.

Segundo Merrill et al. (1996), queijos com teor reduzido de gordura exibem textura mais firme e elástica que queijos com teor integral de gordura devido à existência de poucos glóbulos de gordura para romper a matriz protéica.

Microestrutura em microscópio eletrônico de transmissão (TEM)

A matriz protéica tornou-se mais densa após 60 dias, pois a perda da aparência fibrosa e o desenvolvimento de uma matriz mais densa, homogênea e compacta são as principais mudanças estruturais ocorridas durante a maturação (STANLEY; EMMONS, 1977), também observado por outros autores (MERRIL et al., 1996; BARROS, 2005; SILVA, 2006, GARCIA, 2007).

A redução da população de bactérias lácticas pode ser verificada por meio da análise de microestrutura, na qual no 1º dia de maturação as células microbianas apresentaram-se em processos de divisão celular e aos 60 dias pode-se verificar a presença de lise celular (Figuras 6 a 10). Independente do período de maturação analisado, as células estavam localizadas nos glóbulos de gordura e em geral, agrupadas, conforme relatado por Lopez et al. (2006), que observaram o crescimento das bactérias na interface gordura/proteína, além da organização destas em colônias, em queijo Emmental. Silva (2006) e Garcia (2007) observaram a presença de bactérias agrupadas e isoladas, sempre próximas aos glóbulos de gordura, em queijo Prato com reduzido teor de gordura.

Laloy et al. (1996) verificaram que a estrutura da matriz do queijo e as características físico-químicas dos glóbulos de gordura influenciam a localização de bactérias lácticas em queijos. Queijos Cheddar com teor integral de gordura proporcionaram maior retenção de

células quando comparado aos queijos com 50% de redução no teor de gordura, estando estes micro-organismos próximos aos glóbulos de gordura.

O estudo da microestrutura do queijo indica a presença de glóbulos de tamanhos e formas variados. Estudos com queijo Cheddar contendo diferentes teores de gordura mostraram que a maioria dos glóbulos de gordura apresentou diâmetro menor que $2\mu\text{m}$, sendo menores nos queijos com menor teor de gordura. Verificaram ainda que a matriz protéica em queijos com teor reduzido de gordura pode prevenir mudanças no tamanho e formas dos glóbulos de gordura (GUNASEKARAN; DING, 1999).

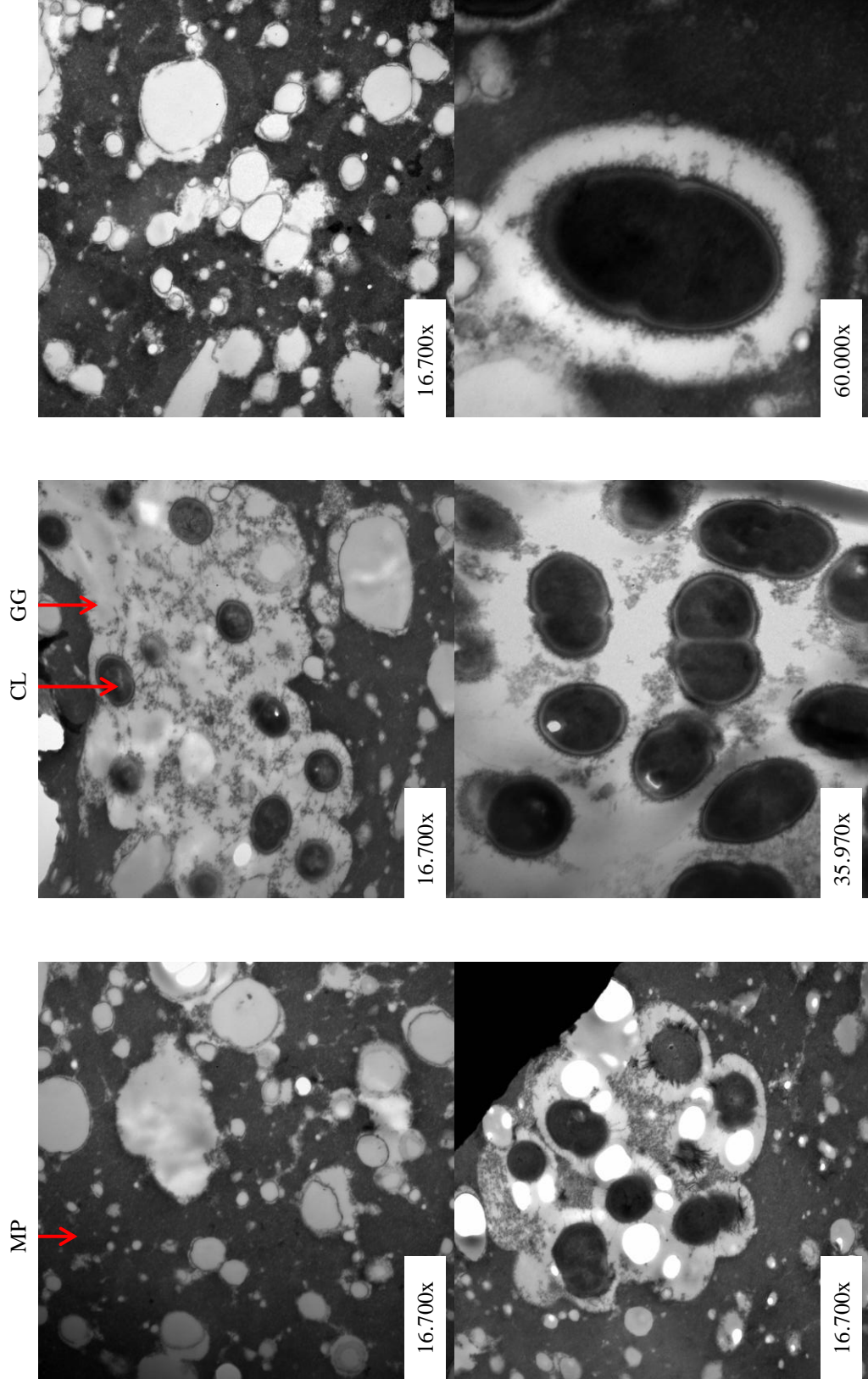


Figura 6 – Microestrutura eletrônica de transmissão de amostras de queijo Prato controle com 1 dia de maturação. MP: matriz protéica; GG: glóbulo de gordura; CL: cultura lática.

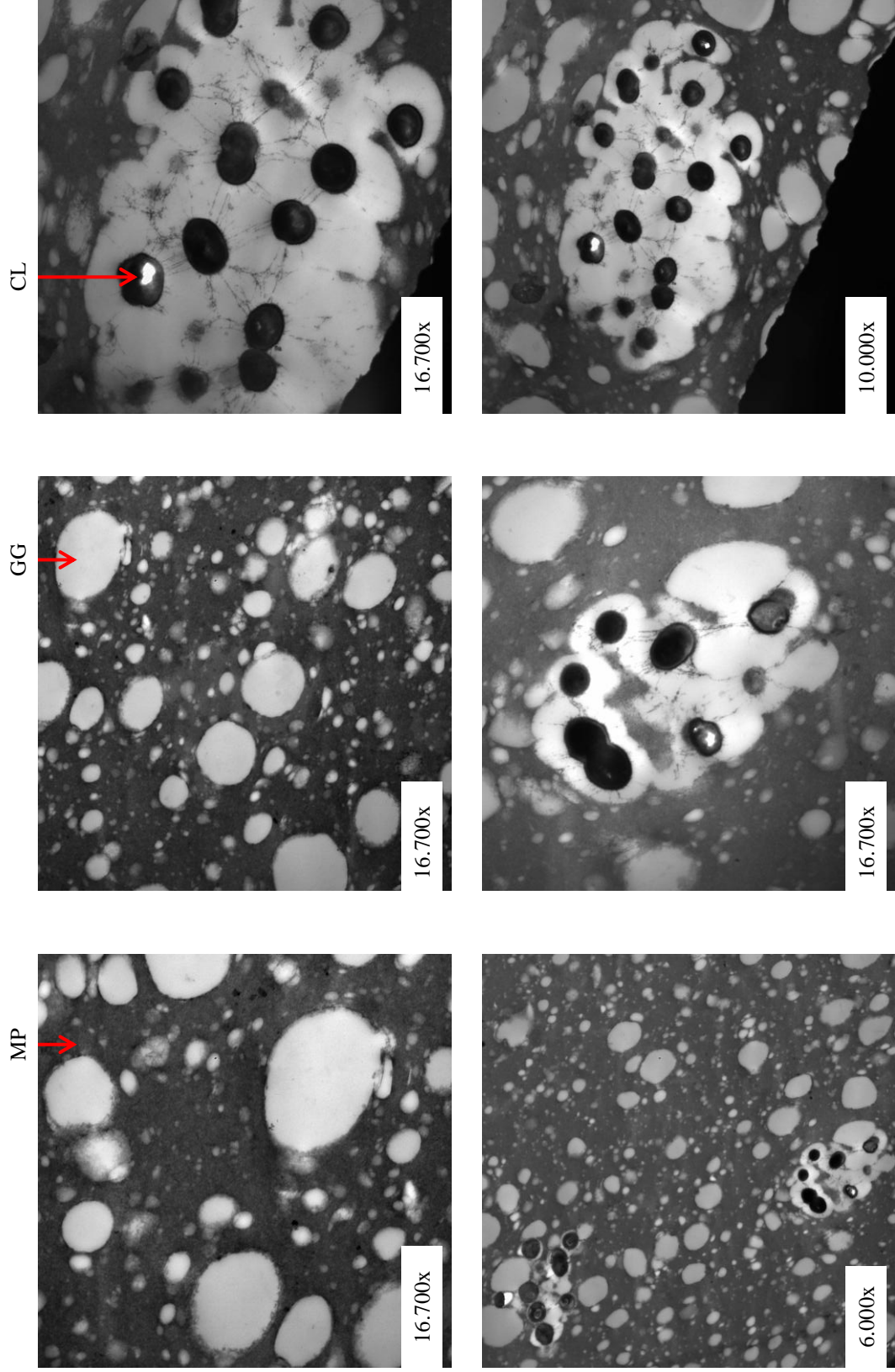


Figura 7 – Microestrutura eletrônica de transmissão de amostras de queijo Prato controle aos 60 dias de maturação. MP: matriz protéica; GG: glóbulo de gordura; CL: cultura láctica.

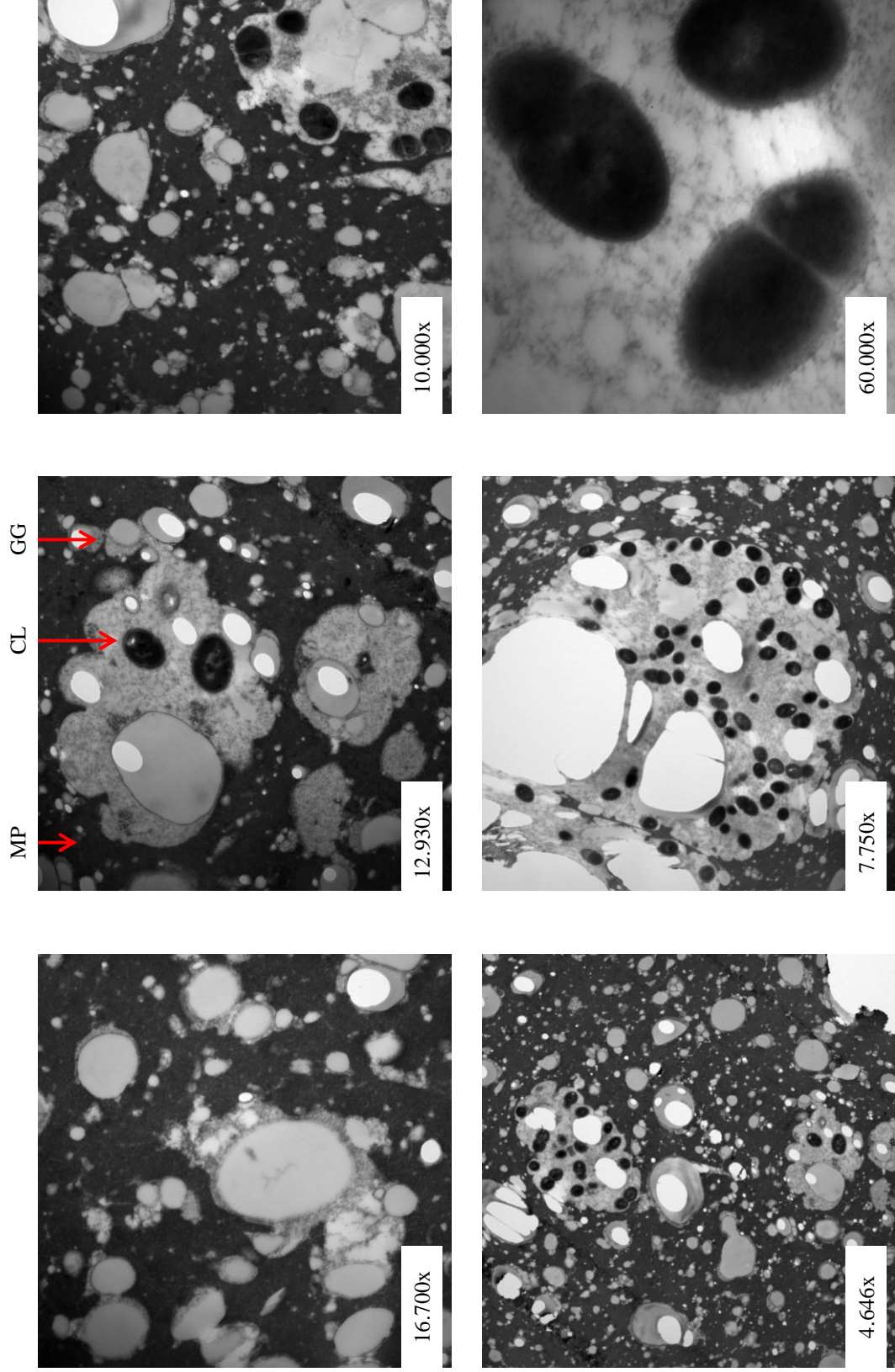


Figura8 – Microestrutura eletrônica de transmissão de amostras de queijo Prato com adição da enzima Protemax® 403 com 1 dia de maturação. MP: matriz protéica; GG: glóbulo de gordura; CL: cultura láctica.

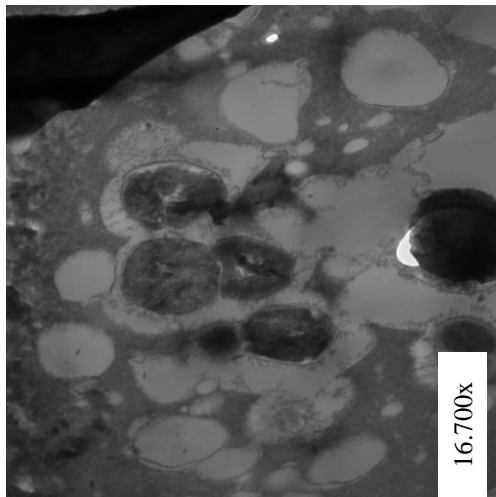
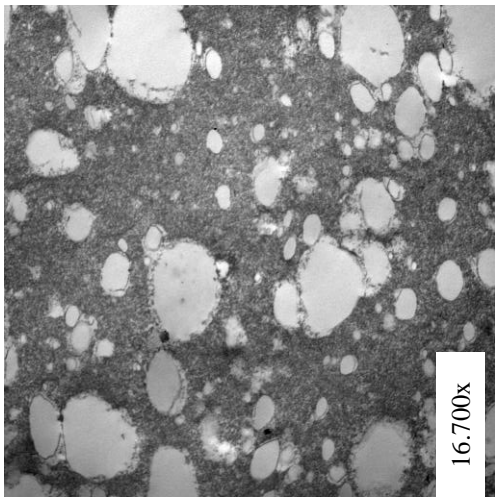
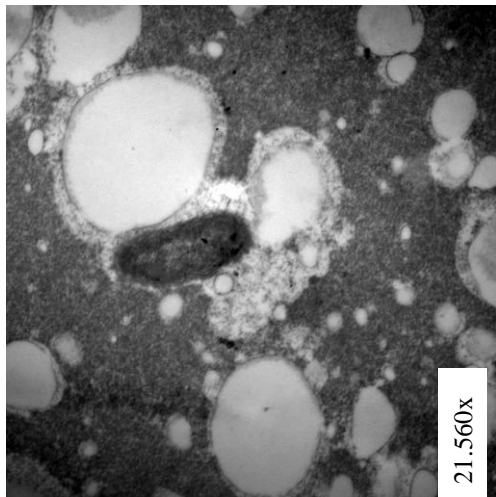
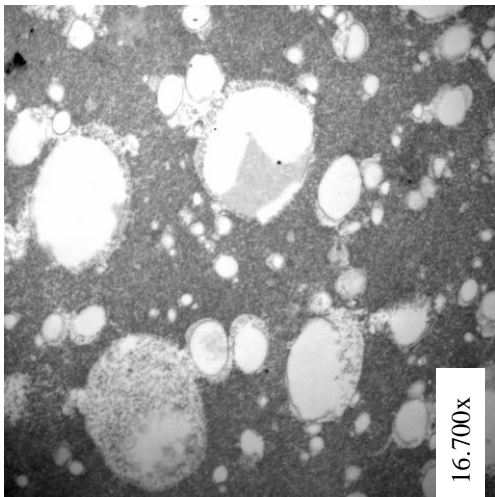
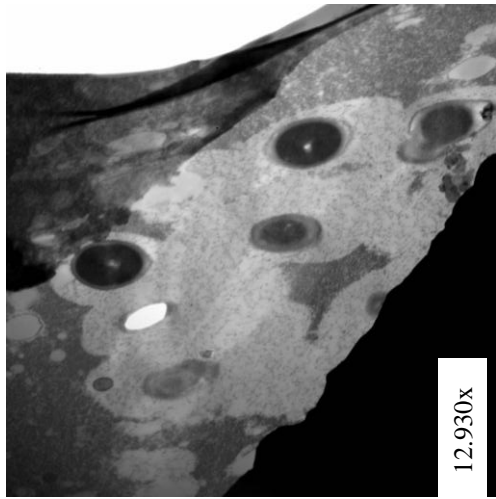
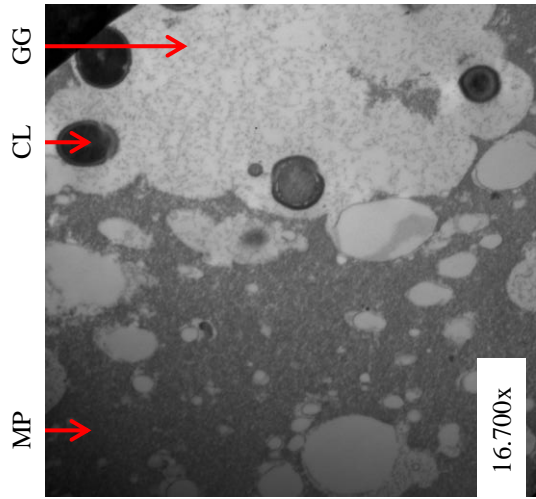
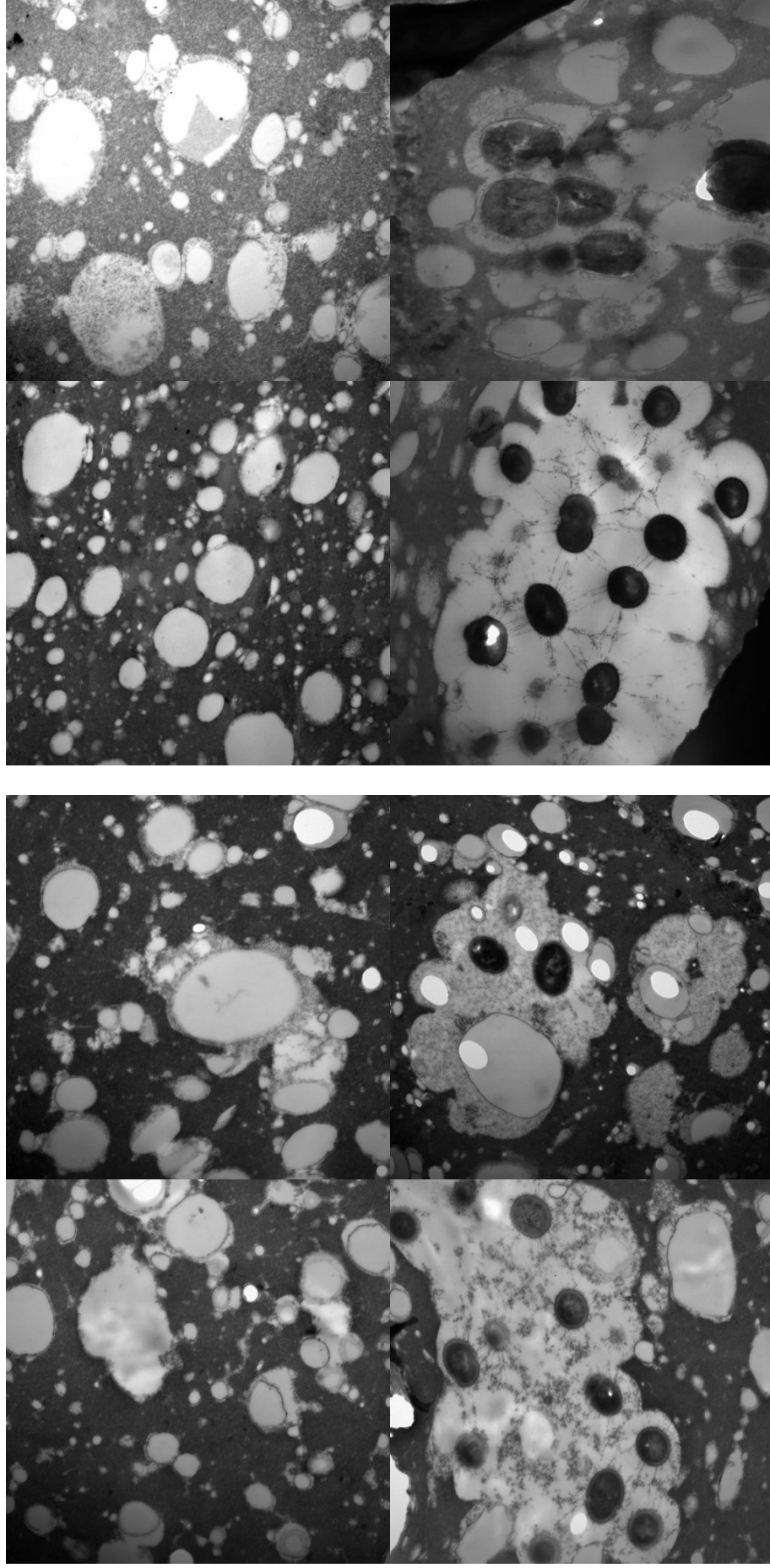


Figura 9 – Microestrutura eletrônica de transmissão de amostras de queijo Prato com adição da enzima Protemax® 403 aos 60 dias de maturação. MP: matriz protéica; GG: glóbulo de gordura; CL: cultura láctica.



Protamax® 403
60 dias

Controle
60 dias

Protamax® 403
1 dia

Controle
1 dia

Figura 10 – Microestrutura eletrônica de transmissão de amostras de queijos Prato controle e com adição da enzima Protamax® 403 com 1 e 60 dias de maturação. Aumento: 16.700x.

3.4 – Análise sensorial - teste de aceitação

Apenas os atributos: sabor ($P = 0,023$), impressão global ($P = 0,0284$) e intenção de compra ($P = 0,0335$) aos 60 dias de maturação apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre os queijos controle e com adição da enzima Protemax® 403, sendo que as maiores medianas foram obtidas para as amostras do queijo controle (Tabela 4).

As notas foram superiores às obtidas por Barros et al. (2006) em relação aos mesmos parâmetros em amostras de queijo Prato *light* sem e com uso de cultura adjunta.

Os queijos com adição da enzima Protemax® 403 apresentaram gosto levemente amargo, após 60 dias de maturação, apesar da aprovação pelos provadores em relação à textura e intenção de compra. Aproximadamente 83,5% dos consumidores atribuíram notas de 3=talvez compraria/talvez não compraria a 5=certamente compraria em relação à intenção de compra. O amargor é, em geral, sentido em queijos com teor reduzido de gordura devido à formação de compostos hidrofóbicos produzidos pela proteólise, que são mais perceptíveis nestes queijos, uma vez que estes compostos são adsorvidos pela gordura (OLSON; JOHNSON, 1990).

De acordo com a avaliação sensorial, os queijos controle e com adição de enzima não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) em relação à aceitação da textura aos 60 dias de maturação, podendo-se relacionar as notas atribuídas pelos provadores à ausência de diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$), neste mesmo período, em relação aos parâmetros instrumentais de textura: dureza, adesividade, elasticidade e mastigabilidade, que são os indiretamente analisados durante a avaliação sensorial por provadores não treinados.

Tabela 4 – Notas em relação aos atributos sensoriais dos queijos Prato com teor reduzido de gordura, após 30 e 60 dias de maturação.

Atributos	Tratamentos			
	Controle		Protemax® 403	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Aparência	7,80 ± 0,48	7,90 ± 1,13	7,70 ± 0,92	7,53 ± 1,41
Aroma	7,70 ± 0,88	7,50 ± 1,31	7,60 ± 0,72	7,07 ± 1,57
Sabor	7,23 ± 1,04	7,43 ± 1,78	6,73 ± 2,12	6,13 ± 1,72
Textura	6,63 ± 1,65	7,27 ± 1,56	7,43 ± 0,94	7,30 ± 1,54
Impressão Global	7,40 ± 0,68	7,50 ± 1,36	7,33 ± 1,18	6,63 ± 1,61
Intenção de compra	3,70 ± 0,65	3,77 ± 0,90	3,53 ± 0,90	3,27 ± 0,83

Notas para os atributos sensoriais: 1 = desgostei extremamente a 9 = gostei extremamente. Notas para a intenção de compra: 1 = certamente não compraria a 5 = certamente compraria.

CONCLUSÕES

O uso da enzima proteolítica Protemax® 403 com atividade enzimática 1.200.000U não influenciou a população de bactérias lácticas, a composição físico- química e a capacidade de derretimento dos queijos Prato com teor reduzido de gordura. Porém, modificou os valores de pH, a acidez, os índices de maturação, a textura, a microestrutura e as características sensoriais, demonstrando ação significativa da enzima.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Dairy products. In: _____. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington, 1997.

BARROS, C. M. V. **Uso de culturas adjuntas e ultrafiltração para melhoria de sabor e textura de queijo prato com reduzido teor de gordura**. 2005. 243 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2005.

_____. et al. Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades viscoelásticas e aceitação sensorial de queijo Prato *light*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 11-18, 2006.

BERESFORD, T. P. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.

BOGENRIEF, D. D.; OLSON, N. F. Hydrolysis of β -casein increases Cheddar cheese meltability. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 50, n. 12, p. 678-682, 1995.

BRASIL. Portaria nº 27 de 16 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 jan. 1998.

_____. Portaria nº 358, de 04 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 172, 8 set. 1997. p. 19690.

CASE, R. A.; BRADLEY JUNIOR, R. L.; WILLIAMS, R. R. Chemical and physical methods. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. 15. ed. Washington, 1985. p. 327-404.

COSTA, R. G. B.; FURTADO, M. M. Propriedades funcionais da mussarela para pizza: derretimento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 324, p. 18-28, 2002.

DAVE, R. I. et al. Influence of coagulant level on proteolysis and functionality of Mozzarella cheeses made using direct acidification. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 1, p. 114-126, 2003.

FONTÁN, M. C. G. et al. Microbiological changes in 'San Simon' cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 1, p. 25-33, 2001.

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

_____; McSWEENEY, L. H. Rennets: their role in milk coagulation and cheese ripening. In: LAW, B. A. **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. 2. ed. Chapman e Hall, 1997. 365 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 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

_____. et al. Composição de macronutrientes e evolução da maturação de queijo Prato com teor reduzido de gordura adicionado de enzima proteolítica *fastuosaína*. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, p. 69-77, 2009.

GONZÁLEZ, V. et al. Influência do tamanho da amostra e da lubrificação na determinação da textura de queijo tipo Minas Frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 1998. v. 3, p. 2067-2069.

GUNASEKARAN, S.; DING, K. Three dimensional characteristics of fat globules in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 9, p. 1890-1896, 1999.

HYNES, E. et al. The influence of starter and adjunct Lactobacilli culture on the ripening of washed curd cheeses. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 397-402, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo, 1985.

KATSUDA, M. S. et al. B. Caracterização química, sensorial e de textura, de queijo tipo Prato com teor reduzido de gordura. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 309, p. 128-133, 1999.

KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. **Cheese and fermented milk foods**. 3. ed. Ann Arbor: Edwards Bros., 1997.

LALOY, E. et al. Influence of the fat content of Cheddar cheese on retention and localization of starters. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 7, p. 729-740, 1996.

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

LEITE, T. D. et al. Estudo comparativo entre técnicas de fabricação do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 379-382, 2004.

_____; PITARELLO, J.; PENNA, A. L. B. Aceleração da maturação de queijo Prato pelo uso de enzima proteolítica do fruto verde de gravatá (*Bromelia fastuosa*). In: CONGRESSO IBEROAMERICANO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS, 4., 2003, Valparaíso. **Resúmenes de Presentaciones...** Valparaíso: Universidad Técnica Federico Santa María, 2003. p. 65.

LOPEZ, C. et al. Lipolysis during ripening of Emmental cheese considering organization of fat and preferential localization of bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 16, p. 5855-5867, 2006.

MERRIL, R. K. et al. Microstructure and physical properties of a reduced fat Mozzarella cheese made using *Lactobacillus casei* ssp. *casei* adjunct culture. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, London, v. 29, n. 8, p. 721-728, 1996.

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.

NARIMATSU, A. et al. M. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo Prato obtido por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 177-182, 2003. Suplemento.

NONOGAKI, C. O.; MONTEIRO, V. S.; GIGANTE, M. L. Metodologia para avaliar a capacidade de derretimento de queijo Prato. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 1, p. 71-77, 2007.

_____; MONTEIRO, V. S.; GIGANTE, M. L. Metodologia para avaliar a capacidade de derretimento de queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 230-233, 2004.

OLSON, N. F.; JOHNSON, M. E. Low-fat cheese technology. **Food Engineering International**, Highlands Ranch, v. 15, n. 10, p. 31-37, 1990.

PENNA, A. L. B. Ripening of low fat cheese: experiences from Brazil. In: **CHEESE World**. München, 2006. 1 CD-ROM.

_____; HOFFMANN, F. L.; BOZZETTI, V. Avaliação sensorial de queijos usando o modelo Etana. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 17-26, 2002.

PINHEIRO, M. V. S.; PENNA, A. L. B. Substitutos de gordura: tipos e aplicações em produtos lácteos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 175-186, 2004.

PROZYN. **Protemax** ® 403. São Paulo, [200-]. Ficha técnica.

SANCHEZ, V. A. A. G. **Evolução de ácidos graxos e do perfil da textura durante a maturação de queijo Prato**. 1999. 116 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica)–Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

SERRES, L.; AMARIGLIO, S.; PETRANSXIENE, D. **Contrôle de la qualité des produits laitiers**. Paris: Ministère de l'Agriculture; Direction des Services Vétérinaires, 1973. tome I: Analyse Physique et Chimique, chap. VII, p. 6.

SHALABI, S. I.; FOX, P. F. Eletrophoretic analysis of cheese: comparison of methods. **Irish Journal of Food Science Technology**, Dublin, v. 11, n. 2, p. 135-151, 1987.

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

SILVA, C. R. B. **Efeito do uso de *Lactobacillus casei* como cultura adjunta na qualidade tecnológica de queijo Prato com reduzido teor de gordura**. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

_____.et al. Efeito da adição de *Streptococcus thermophilus* como cultura adjunta na maturação e caracterização físico-química e sensorial de queijo Prato. Revista do **Instituto Adolfo Lutz**, Campinas, v. 65, n. 3, p. 199-203, 2006.

SILVA, P. H. F. et al. **Físico-química do leite e derivados**: métodos analíticos. Juiz de Fora: Oficina de Impressão, 1997. 190 p.

STANLEY, D. W.; EMMONS, D. B. Cheddar cheese made with bovine pepsin. II. Texture microstructure composition relationships. **Canadian Institute of Food Technology Journal**, Ottawa, v. 10, n. 2, p. 78-84, 1977.

VIANNA, P. C. B. et al. Microbial and sensory changes throughout the ripening of Prato cheese made from milk with different levels of somatic cells. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 5, p. 1743-1750, 2008.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Revista Boletim do Leite**, São Paulo, v. 55, n. 661, p. 1-8, 1983.

CONCLUSÃO GERAL

A enzima Protemax® 403 com atividade enzimática 1.200.000 U. influenciou positivamente as características físicas, proteolíticas e sensoriais do queijo Prato com teor reduzido de gordura, maturado a 12 °C.