

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

CLAUDIA RIBEIRO BORGES SILVA

**Efeito do uso de *Lactobacillus casei* como cultura adjunta na
qualidade tecnológica de queijo Prato com reduzido teor de
gordura**

**São José do Rio Preto/SP
2006**

Claudia Ribeiro Borges Silva

Efeito do uso de *Lactobacillus casei* como cultura adjunta na qualidade tecnológica de queijo Prato com reduzido teor de gordura

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências de Alimentos: área de Ciências e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora:

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna

**São José do Rio Preto/SP
2006**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Carmen Cecília Tadini
Membro da Banca

Prof. Dr. Maurício Boscolo
Membro da Banca

“Aventurar-se causa ansiedade, mas deixar de arriscar-se é perder a si mesmo... E aventurar-se no sentido mais elevado é precisamente tomar consciência de si próprio.”

Kierkegaard

Dedico...

Aos meus pais, Carlito e Rosa Maria, pelo amor e empenho que participam da minha formação; aos meus irmãos Alysson, Artur e Carolina, pelo carinho e amizade; ao meu marido, Gleison pelo amor e incentivo.....

Agradecimentos

A Deus por estar presente em todos os momentos de minha vida, permitindo que eu alcance meus objetivos;

A Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna, pela oportunidade, confiança, amizade e orientação deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo, Prof. Dr. Douglas W. Franco e Eduardo Sanches pelo auxílio nas análises cromatográficas;

Ao Prof. Dr. Marcelo Beletti e Hégio pela colaboração nas análises de microestrutura e Profa. Dra. Elisa H. P. Giglio pela colaboração nas análises de cor e textura;

Ao Dr. Hamilton Cabral, pelo auxílio nas análises de eletroforese;

A todos os professores do curso de Pós-Graduação, pelos preciosos ensinamentos durante o desenvolvimento do curso de Mestrado;

A Empresa Salute pelo fornecimento do leite, a DSM Food Specialties e a Rhodia Food pela doação das culturas utilizadas na fabricação dos queijos;

A Capes e Cnpq por financiarem a realização desta pesquisa;

A todas as amigas Analice, Deni, Denise, Janaína, Jupyracyara, Vidiany, Shirleny, pela amizade e companheirismo, vocês são pessoas muito especiais;

As alunas do laboratório Aline, Bruna e Grazielle pela colaboração nas análises físico-químicas;

A toda minha família e ao meu marido pelo interesse e incentivo para minha formação;

E a Doraci, Eduarda e Josimara, a família que me acolheu com tanto carinho;

A todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O queijo Prato é um queijo gordo, de média umidade, massa semi-cozida, consistência semi-dura, textura homogênea, com poucas ou nenhuma olhadura. Seu sabor é suave, levemente adocicado e sua cor é amarelo-ouro. A associação da gordura com doenças coronárias e obesidade e a progressiva preocupação dos consumidores com a dieta e saúde tem desencadeado uma alta demanda por produtos com baixo teor de gordura, incluindo o queijo. Queijos manufaturados a partir de leites desnatados ou semi-desnatados são caracterizados por apresentarem determinados defeitos não observados nos seus correspondentes feitos com teor integral de gordura. A redução no conteúdo de gordura tem um efeito negativo sobre as características sensoriais do queijo, além das conseqüências econômicas negativas tanto no rendimento dos queijos com baixo conteúdo de gordura como em sua maturação. Neste trabalho estudou-se o efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus casei*) nas características físico-químicas e na evolução da maturação de queijo Prato com reduzido teor de gordura. Foram realizados 4 tratamentos: sendo um pelo método tradicional, utilizando como cultura láctica apenas *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* (tratamento A, controle) e três pelo método modificado, que além dos microrganismos citados acima foram acrescidos de cultura adjunta nas seguintes proporções 20% (tratamento B), 30% (tratamento C) e 40% (tratamento D). O leite utilizado na manufatura dos queijos foi submetido as seguintes análises: acidez, densidade, extrato seco total, crioscopia, gordura e presença de antibióticos. Os queijos foram analisados aos 1, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação quanto a: extrato seco total, acidez, gordura, gordura no extrato seco (GES), cinzas, nitrogênio e proteína totais, NS (nitrogênio

solúvel) pH 4,6, NS TCA, tirosina, triptofano, sal, atividade de água (A_w), índices de extensão e profundidade da maturação (IEM e IPM) e perfil de degradação das proteínas por meio de eletroforese. Além destas, foram realizadas análises de cor, textura e microestrutura aos 30 e 60 dias de maturação e compostos aromatizantes com auxílio de cromatografia gasosa nos queijos com 1 e 60 dias. Houve uma redução de pelo menos 25% no teor de gordura em todos os queijos, o que permitiu classificá-los como queijos “light”. Os índices de extensão e profundidade da maturação foram mais elevados nos queijos em que foi utilizada a cultura adjunta do que no queijo controle. Foi detectada a degradação da α e β - caseínas a partir do primeiro dia de maturação, evidenciando a proteólise promovida pelo coalho e pela plasmina, respectivamente. A proporção entre a cultura tradicional e a cultura adjunta utilizada no tratamento C (70 e 30%, respectivamente), resultou em uma proteólise mais pronunciada durante a maturação, e conseqüentemente, em queijos com melhores características de textura quando comparados ao queijo controle. Portanto, a adição da cultura adjunta influenciou positivamente na maturação dos queijos, sendo uma alternativa viável para melhorar a qualidade dos queijos com teor reduzido de gordura.

ABSTRACT

Prato cheese is a fatty cheese, of medium humidity, semi-cooked mass, semi-hard consistency, homogenous texture, with little or no round eyes. Its taste is mild, lightly sweetened and has yellow color. The association of fat with heart diseases and obesity and the advancing concern of consumers with their diet and health has led to a high demand for low fat products, including cheeses. Cheeses with reduced fat content are characterized by exhibiting some defects not seen in the ones made with whole ingredients. Reduction on fat content has a negative effect on sensory characteristics of the cheese and also negative economical consequences on cheese yield as much as on ripening. In this work, the effect of the use of *Lactobacillus casei*, an adjunct culture on technological quality of Prato cheese made with reduced fat content was studied. Four treatments were carried out: one by the traditional method using only *Lactococcus lactis subsp lactis* and *Lactococcus lactis subsp cremoris* as lactic culture (treatment A, control) and three by the modified method which, besides the microorganisms listed above, had the addition of an adjunct culture in the following proportions 20% (treatment B), 30% (treatment C) and 40% (treatment D). The milk used for the manufacturing of the cheeses was submitted to the following analysis: acidity, density, dry matter, crioscopy, fat and presence of antibiotics. Cheeses were analyzed with 1, 15, 30, 45 and 60 days of ripening regarding: dry matter, acidity, fat, fat in dry matter, ash, nitrogen and total protein, pH 4,6-soluble nitrogen, TCA-soluble nitrogen, tyrosine, tryptophan, salt, water activity, ripening extension index and depth index (REI and RDI), and protein degradation profile through electrophoresis. Besides these, other analysis were carried out such as color, texture and microstructure with 30 and 60 days

of ripening and aromatic substances with the aid of gas chromatography in cheeses with 1 and 60 days of ripening. The results show that there was at least a 25% reduction on fat content on all cheeses, which allowed them to be classified as light. The ripening extension index and ripening depth index were higher on cheeses made with the adjunct culture than on the control cheese. The breakdown of α and β -caseins happened from first day of ripening, evidence the proteolysis due the action of the rennet and plasmin, respectively. The proportion between traditional and adjunct culture from treatment C (70 and 30% respectively), resulted in more strong proteolysis during ripening and consequently in cheeses with better texture characteristics than control cheese. Therefore, the addition of the adjunct culture had a positive influence on cheeses ripening, being a feasible alternative to improve the quality of cheeses with reduced fat content.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

a*	intensidade de vermelho
Aa	aminoácidos
a.C	antes de Cristo
Al	alumínio
ANOVA	análise de variância
Ar	argônio
Aw	atividade de água
b*	intensidade de amarelo
Ca ⁺²	íon Cálcio
cm	centímetro
cm ³	centímetro cúbico
CO ₂	dióxido de carbono
Cu	cobre
D	Dalton
DETA	Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos
Dr	doutor
Dra	doutora
EST	extrato seco total
F	flúor
Fe	ferro
FIL-IDF	Fédération Internationale de Laiterie - International Dairy Federation
g	grama
G	gordura
GES	gordura no extrato seco
h	horas
I	iodo
IEM	índice de extensão da maturação
IPM	índice de profundidade da maturação
KDa	quilodalton
Kg	quilograma
L	litro
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mm ³	milímetro cúbico
mM	milimolar
Mn	manganês
mV	milivolt
N	normal
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ND	não detectado
nm	nanômetro
NNC	nitrogênio não-caséico
NNP	nitrogênio não-protéico
NS	nitrogênio solúvel

NSLAB	non-starter lactic acid bacteria
NT	nitrogênio total
Phe23	fenilalanina em posição 23
Phe24	fenilalanina em posição 24
PM	peso molecular
s	segundos
SPME	microextração em fase sólida
S/U	sal/umidade
TCA	ácido tricloroacético
ton	toneladas
TPA	análise do perfil de textura
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
UFC	unidades formadoras de colônias
UNESP	Universidade Estadual Paulista
Urea-PAGE	Urea-polyacrylamide gel electrophoresis
Val25	valina em posição 25
Zn	zinco
%	porcento
°C	graus Celsius
°D	graus Dornic
°H	Graus Hortivert
α	alfa
α_{s1}	alfa-s1
α_{s1-1}	alfa-s1-1
α_{s2}	alfa-s2
β	beta
γ	gama
κ	kapa
μm	micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Principais vias do catabolismo de aminoácidos.....	26
Figura 2.	Fluxograma de fabricação do queijo Prato obtido através dos processos tradicional e modificado.....	48
Figura 3.	Evolução dos índices de extensão da maturação dos queijos prato com reduzido teor de gordura manufaturados com e sem adição de cultura adjunta durante 60 dias.....	72
Figura 4.	Evolução dos índices de profundidade da maturação dos queijos prato com reduzido teor de gordura manufaturados com e sem adição de cultura adjunta durante 60 dias.....	74
Figura 5.	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) dos queijos elaborados conformes os tratamentos A (a), B (b), C (c) e D (d) nos diferentes períodos de maturação.....	76
Figura 6.	Microscopia eletrônica de transmissão (ampliação: 8.316x) dos queijos elaborados conforme os tratamentos A (controle, a), B (20% de <i>L. casei</i> , b), C (30% de <i>L. casei</i> , c) e D (40% de <i>L. casei</i> , d) aos 30 (1) e 60 (2) dias de maturação.....	84
Figura 7.	Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento A (controle), após 1 dia de maturação.....	91
Figura 8.	Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento A (controle), após 60 dias de maturação.....	91
Figura 9.	Comparação entre os cromatogramas do queijo elaborado conforme o tratamento A (controle), após 1 e 60 dias de maturação.....	92
Figura 10.	Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento B (20% de <i>L. casei</i>), após 1 dia de maturação.....	93
Figura 11.	Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento B (20% de <i>L. casei</i>), após 60 dias de maturação.....	93
Figura 12.	Comparação entre os cromatogramas do queijo elaborado conforme o tratamento B (20% de <i>L. casei</i>), após 1 e 60 dias de maturação.....	94
Figura 13.	Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento C (30% de <i>L. casei</i>), após 1 dia de maturação.....	95
Figura 14.	Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento C (30% de <i>L. casei</i>), após 60 dias de maturação.....	95
Figura 15.	Comparação entre os cromatogramas do queijo elaborado conforme o tratamento C (30% de <i>L. casei</i>), após 1 e 60 dias de maturação.....	96
Figura 16.	Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento D (40% de <i>L. casei</i>), após 1 dia de maturação.....	97
Figura 17.	Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento D (40% de <i>L. casei</i>), após 60 dias de maturação.....	97
Figura 18.	Comparação entre os cromatogramas do queijo elaborado conforme o tratamento D (40% de <i>L. casei</i>), após 1 e 60 dias de maturação.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação da qualidade do leite pasteurizado tipo A utilizado para a preparação dos queijos, conforme os tratamentos A, B, C e D.....	54
Tabela 2	Caracterização físico – química e evolução da maturação do queijo Prato submetido ao tratamento A durante 60 dias.....	58
Tabela 3	Caracterização físico – química e evolução da maturação do queijo Prato submetido ao tratamento B durante 60 dias.....	61
Tabela 4	Caracterização físico – química e evolução da maturação do queijo Prato submetido ao tratamento C durante 60 dias.....	64
Tabela 5	Caracterização físico – química e evolução da maturação do queijo Prato submetido ao tratamento D durante 60 dias.....	68
Tabela 6	Caracterização dos parâmetros de cor dos queijos aos 30 e 60 dias de maturação.....	78
Tabela 7	Caracterização do perfil de textura dos queijos aos 30 e 60 dias de maturação.....	80
Tabela 8	Compostos voláteis identificados nos queijos Prato submetidos aos tratamentos A, B, C e D e sua evolução nos tempos analisados (1 e 60 dias).....	89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO.....	04
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
3.1 Leite.....	04
3.1.1 Variações na composição do leite.....	05
3.1.2 Proteínas.....	06
3.1.3 Gordura.....	08
3.2 Queijo.....	09
3.2.1 Queijo tipo Prato.....	11
3.3 Processamento de queijo tipo Prato.....	11
3.3.1 Matéria- prima.....	11
3.3.2 Adição de cultura lática e coalho.....	12
3.3.2.1 Culturas iniciadoras, de arranque ou culturas “starters”.....	13
3.3.2.2 Sistema proteolítico das bactérias ácido-láticas.....	14
3.3.2.3 Bactérias que não fazem parte da cultura lática.....	16
3.3.3 Corte e tratamento da massa.....	17
3.3.4 Prensagem.....	17
3.3.5 Salga e secagem.....	18
3.3.6 Maturação.....	19
3.3.6.1 Glicólise.....	20
3.3.6.2 Metabolismo do Citrato.....	21
3.3.6.3 Proteólise.....	21
3.3.6.3.1 Efeito da razão sal/umidade na proteólise.....	24
3.3.6.3.2 Catabolismo de aminoácidos.....	25
3.3.6.4 Lipólise.....	26
3.3.6.4.1 Metabolismo de ácidos graxos livres.....	28
3.3.6.5 Formação de sabor em queijos	28
3.3.6.6 Compostos voláteis responsáveis pelo sabor do queijo.....	30
3.3.6.7 Perfil eletroforético.....	31
3.4 Principais defeitos do queijo Prato.....	32
3.4.1 Mau fatiamento.....	32
3.4.2 Marmorização da massa.....	32
3.4.3 Manchas brancas.....	33
3.4.4 Estufamento.....	33
3.4.5 Gosto amargo.....	34
3.5 Queijos com teor reduzido de gordura.....	34
3.6 Alternativas microbiológicas para melhorar o sabor de queijos com teor reduzido de gordura.....	37
3.6.1 Uso de culturas adjuntas.....	37
3.6.2 Uso de culturas adjuntas atenuadas e extratos enzimáticos.....	38
3.7 Textura do queijo.....	39
3.7.1 Efeito da proteólise na textura.....	42
3.7.2 Relação entre pH, umidade e textura.....	42
3.8 Microestrutura.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45

4.1. Matérias – primas utilizadas na fabricação do queijo tipo Prato.....	45
4.2 Métodos.....	45
4.2.1 Avaliação do leite pasteurizado.....	45
4.2.2 Preparo da cultura.....	46
4.2.3 Preparo dos queijos.....	46
4.2.4 Caracterização físico-química dos queijos controle e modificados.....	49
4.2.5 Caracterização dos parâmetros de cor.....	50
4.2.6 Caracterização do perfil de textura.....	50
4.2.7 Caracterização do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (Uréia – Page).....	51
4.2.8 Identificação dos compostos voláteis por cromatografia.....	51
4.2.9 Caracterização da microestrutura em microscópio eletrônico de transmissão – TEM.....	52
4.3 Análise estatística dos resultados experimentais.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1 Caracterização dos leites empregados na fabricação dos queijos.....	54
5.2 Rendimento dos queijos.....	56
5.3 Caracterização físico – química e evolução da maturação do queijo submetido ao tratamento A.....	57
5.4 Caracterização físico – química e evolução da maturação do queijo submetido ao tratamento B.....	60
5.5 Caracterização físico – química e evolução da maturação do queijo submetido ao tratamento C.....	63
5.6 Caracterização físico – química e evolução da maturação do queijo submetido ao tratamento D.....	67
5.7 Evolução dos índices de extensão e profundidade da maturação dos queijos durante 60 dias.....	71
5.8 Caracterização do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (Uréia- Page) do queijos submetidos aos tratamentos A, B, C e D.....	74
5.9 Caracterização dos parâmetros de cor dos queijos aos 30 e 60 dias de maturação.....	77
5.10 Caracterização do perfil de textura dos queijos aos 30 e 60 dias de maturação.....	79
5.11 Microestrutura dos queijos.....	82
5.12 Identificação de compostos aromatizantes presentes nos queijos.....	85
6. CONCLUSÕES.....	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

1 - INTRODUÇÃO

Os queijos podem se distinguir em dois grupos: queijos comuns os quais incluem variedades como a Mussarela, Prato, Requeijão, Minas Frescal e Ricota; e queijos finos e especiais os quais incluem tipos como Tilsit, Gouda, Gruyère, Gorgonzola e Camembert (GOROSTIZA et al., 2004).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijos - ABIQ (2004), nos últimos 10 anos houve um aumento de 117% na produção de queijo Prato, com 45.000 ton em 1993 alcançando 97.600 ton em 2003, sendo assim, a variedade de queijo maturado mais consumida e apreciada no país. O queijo Prato é de grande popularidade no país e é fabricado em todas as regiões brasileiras (ALBUQUERQUE, 1986). Quatro tipos de queijo Prato podem ser diferenciados de acordo com a sua forma: Lanche (retangular), Bola (esférico), Estepe (quadrado) e Cobocó (cilíndrico baixo). Lanche é o mais disseminado entre eles (CICHOSCKI et al., 2002).

O queijo Prato possui um paladar suave, próprio, de cheiro não ácido nem picante e gosto tendendo ao adocicado (MORENO et al., 2002). Apresenta consistência macia, por se tratar de um queijo de massa semi - cozida e lavada. A fatiabilidade deste queijo é outro fator relevante. O seu rendimento de fabricação situa-se por volta de 9,0-9,5 litros de leite/Kg de queijo (COSTA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998). Também é um queijo que possui um perfil de maturação predominantemente proteolítico (BALDINI et al., 1998).

Uma dieta rica em gordura tem sido associada com o aumento do risco de obesidade, arterosclerose, doenças coronárias, elevada pressão sanguínea e injúrias dos tecidos associadas com a oxidação lipídica (FENELON; GUINEE, 2000). A associação da gordura com os riscos acima mencionados e a progressiva preocupação dos

consumidores com a dieta e saúde tem desencadeado uma alta demanda por produtos com baixo teor de gordura, incluindo o queijo, com propriedades sensoriais semelhantes ao produto convencional com teor integral de gordura (MICHAELIDOU et al., 2003). Normalmente, queijos elaborados com leites desnatados e semi-desnatados são caracterizados por apresentarem determinados defeitos não observados nos seus correspondentes feitos com teor integral de gordura, como por exemplo, corpo elástico, fraca intensidade de sabor e propriedades funcionais inadequadas (SILVA, A.T. et al., 2004). Além de afetar as qualidades sensoriais do queijo, a redução na gordura também traz consequências econômicas negativas, como menor rendimento e maturação lenta (RODRIGUEZ, 1998).

A remoção da gordura do leite promove uma alteração na proporção dos vários componentes do queijo e aumenta o seu teor de umidade. Por outro lado, a relação entre a umidade e o teor de sólidos não gordurosos do queijo é geralmente similar à dos integrais e, por conseguinte, o conteúdo de sal na fase úmida do queijo com teor reduzido de gordura é menor. Essas alterações do microambiente do queijo são grandemente responsáveis não somente pelas alterações nas características funcionais e sensoriais desses queijos, como também em suas características microbiológicas e bioquímicas (SILVA, A.T. et al., 2004). A perda das características sensoriais e funcionais é proporcional à quantidade de gordura removida. Assim, mudanças nas características funcionais dos produtos são menos dramáticas com reduções menores nos teor de gordura, entretanto significativas o suficiente para serem detectadas pelos consumidores (MISTRY, 2002).

Há um mercado bastante promissor para produtos obtidos a partir da redução ou substituição de gorduras (“low-fat”, “light”, “lite”, etc.), destinado a pessoas

preocupadas com a saúde, manutenção ou redução do peso e manutenção de aparência atraente (SILVA; VAN DENDER, 2005). Portanto, a melhoria da tecnologia e o desenvolvimento de ingredientes e métodos de produção mais adequados para sua fabricação têm sido possíveis devido ao incentivo proporcionado pela demanda crescente deste tipo de produto (BANKS, 2004).

Dentre as estratégias para melhorar a qualidade sensorial de queijos com baixo teor de gordura destacam - se o uso de culturas adjuntas, o uso de substitutos de gordura e alterações no processo de fabricação. As culturas adjuntas de bactérias lácticas selecionadas ou de outros microrganismos relacionados com a maturação do queijo são adicionadas ao leite de fabricação, juntamente com a cultura láctica tradicional, com o objetivo principal de melhorar a qualidade sensorial do produto (SILVA, A.T. et al., 2004).

Apesar de algumas pesquisas já terem sido realizadas nesta área, continua sendo um desafio produzir um queijo com teor reduzido de gordura que preserve as mesmas características do queijo com gordura total. Pesquisas prévias visando a aceleração da maturação de queijo Prato já foram realizadas no laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados do DETA utilizando enzimas proteolíticas provenientes do fruto verde de gravatá. Além disso, todos os outros trabalhos tratam de outros tipos de queijos com diferentes processos de fabricação, assim, estudos que possibilitem melhorias tecnológicas no queijo Prato com baixo teor de gordura são fundamentais para o desenvolvimento da indústria láctica nacional e para a melhoria da qualidade deste produto.

2 - OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo estudar o efeito do uso de *Lactobacillus casei* como cultura adjunta na qualidade tecnológica do queijo Prato com reduzido teor de gordura. Para atingir este objetivo, foram avaliadas as características físico-químicas e de textura, a quantificação de aminoácidos e de frações protéicas, a presença de compostos aromatizantes e a microestrutura dos produtos durante a maturação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Leite

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie que se proceda (BRASIL, 2002).

O leite é um alimento valioso sob o aspecto nutricional, sendo rica fonte de proteínas, gordura, carboidratos, vitaminas e sais minerais (ANDRIOLI, 2001); é um dos mais importantes alimentos para o homem e para os animais domésticos (SILVA, M.H. et al., 2003).

Um leite de qualidade deve apresentar sabor agradável, ausência de agentes patogênicos e contaminantes, reduzida contagem de células somáticas e baixa carga microbiana (FONSECA; SANTOS, 2000).

Ao ser armazenado em condições ambientais, o leite sofre uma série de alterações devido, basicamente, à ação dos microrganismos contaminantes. Tais alterações e/ou transformações levaram ao descobrimento de vários derivados do leite que passaram a ser utilizados como alimento. Foram assim desenvolvidas as diversas formas de

preservar e conseqüentemente aproveitar o excesso de leite não consumido dentro de algumas horas, após a ordenha (OLIVEIRA, 1986).

Desta forma, a coalhada, o iogurte e o queijo, são os principais produtos que surgiram empiricamente, muito antes que a tecnologia fosse conhecida e que constituíram em variedades alimentícias de excelente valor nutritivo amplamente consumidos até hoje (OLIVEIRA, 1986).

3.1.1 - Variações da composição do leite

O estágio de lactação exerce uma considerável influência no teor das proteínas do leite, principalmente no início e próximo ao final da lactação. Durante a transição do colostro para o leite, a quantidade de proteína total decresce rapidamente no início e depois mais lentamente, até que um mínimo seja alcançado em cinco a dez semanas após o parto. A quantidade tende a crescer vagarosamente até próximo do fim da lactação, quando um aumento intenso ocorre, o qual parece ser dependente do fato de o animal entrar em gestação (FURTADO, 1989). Esta variação na composição química do leite, ao longo do período de lactação, afeta especialmente os seus teores de caseína e gordura (FURTADO, 1991). Durante esse período os coeficientes de correlação entre os teores de gordura e proteína é baixo (0,44) e a caseína total corresponde a, aproximadamente, 79,5% do nitrogênio protéico do leite (WALSTRA; JENNESS, 1984).

O desbalanceamento da relação caseína/gordura no leite durante determinados períodos do ano, como, por exemplo, o aumento de gordura em relação aos teores de caseína, é dado por mudanças lactacionais, uma vez que muitos animais podem apresentar-se em fim de lactação (CHAPMAN, 1981).

No que se refere ao rendimento da fabricação de queijos, a variação sazonal da composição do leite exerce uma influência significativa (FURTADO, 1989). Esta variação também influencia o teor de gordura no extrato seco dos queijos (ALVES, 1995). Em decorrência dessas variações sazonais nos componentes do leite, ocorre uma alteração no rendimento da fabricação dos queijos, muito dependente dos teores de proteína e gordura do leite e que nem sempre podem ser compensados pelo aumento no teor de umidade dos produtos, sob pena de alterar suas características finais (FURTADO, 1989).

3.1.2 - Proteínas

As proteínas do leite possuem excelentes propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais, constituindo-se assim, em ingredientes bastante valorizados. Estas propriedades nutritivas e tecnológicas originam-se da composição em aminoácidos que atende à maioria das exigências fisiológicas do ser humano (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989). As propriedades físico-químicas proporcionam propriedades funcionais como solubilidade, absorção, retenção de água e de gordura, capacidade emulsificante e estabilidade de emulsões, capacidade espumante e estabilidade da espuma, geleificação, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis, formação de micropartículas, melhoria nas propriedades sensoriais e na aceitação dos produtos (WONG; CARMIRAND; PAVLAT, 1996).

Duas categorias principais de proteínas do leite são distinguidas baseadas na solubilidade em pH 4,6 (20°C). Nesse pH a caseína é insolúvel e as proteínas do soro permanecem solúveis. Aproximadamente 80% do nitrogênio total no leite bovino provêm da caseína (FOX et al., 2000).

As caseínas são consideradas um grupo de fosfoproteínas específicas do leite apresentando baixa solubilidade em pH 4,6. São constituídas de micelas de 40 a 300 nm de diâmetro. As micelas são formadas por submicelas, grosseiramente esféricas, contendo agregados de diversas moléculas de caseína, com relação de: α_{s1} : α_{s2} : (β + γ): κ igual a 4:1:4:1,3, mantidas unidas por interações hidrofóbicas e pontes salinas. O fosfato de cálcio amorfo liga as submicelas entre si, com participação de ésteres fosfatos. Desta forma, quase todas as regiões nas moléculas de caseína têm mobilidade restrita. A porção carboxi-terminal da κ -caseína está, predominantemente, presente como filamentos flexíveis, orientados para o exterior da micela. Nem todas as micelas possuem κ -caseína (WALSTRA, 1990).

A caseína α_{s1} é constituída de uma cadeia polipeptídica com 199 resíduos de aminoácidos e peso molecular (PM) de 23,6 KDa. As caseínas α_{s2} apresentam PM na faixa de 23,5 a 24KDa e uma cadeia polipeptídica com 207 resíduos de aminoácidos, contendo mais resíduos com cadeias laterais carregadas do que a caseína α_{s1} e possuindo boa solubilidade em água (SGARBIERI, 2005). As caseínas β representam 30-35% do total de caseínas e na presença de cálcio formam suspensões coloidais ao invés de precipitarem, como as caseínas α_{s1} . A estrutura primária da β -caseína é susceptível à hidrólise pela protease plasmina nas ligações peptídicas dos resíduos de aminoácidos 28-29, 105-106 e 107-108, produzindo fragmentos peptídicos, as γ -caseínas, que permanecem nas micelas. Em virtude de suas características estruturais e da localização de suas moléculas na superfície das micelas, a κ -caseína atua como estabilizadora dessas partículas, não permitindo a precipitação das caseínas sensíveis ao cálcio por ação dos sais de cálcio do leite (SGARBIERI, 2005).

A estrutura micelar da caseína observada por meio de microscopia eletrônica

revela uma superfície micelar sem nenhum revestimento e suas subunidades (submicelas) organizadas como estruturas tubulares dentro da micela. A superfície da caseína não é lisa e contém lacunas entre as subestruturas (DALGLEISH; SPAGNUOLO; GOFF, 2004).

A concentração de cálcio no leite bovino é aproximadamente 30mM. Aproximadamente 30% do total de cálcio é solúvel e aproximadamente 30% do cálcio solúvel (10% do total de cálcio) existe como um cátion divalente (Ca^{+2}). Os íons cálcio são muito importantes na coagulação do leite pela ligação com grupos fosfato das micelas de caseína. O cálcio insolúvel é referido como fosfato de cálcio coloidal, principalmente associado com as micelas de caseína. Esse fosfato possui um importante papel na integridade micelar e na coagulação (FOX et al., 2000).

A fração protéica do soro de leite bovino contém 50% de β -lactoglobulina, 20% de α -lactoalbumina, 10% de albumina e 10% de imunoglobulinas. As proteínas hidrossolúveis do soro são perdidas quando a sinérese ocorre durante a fabricação do queijo, portanto, as caseínas são a fonte dos produtos proteolíticos no queijo coagulado (LAW, 1997).

3.1.3 - Gordura

A gordura é um dos principais componentes do leite, podendo sua importância ser atribuída a quatro aspectos principais: econômico, nutricional, sensorial e físico-químico (JENNESS; PATTON, 1959).

A matéria gorda do leite apresenta-se na forma de pequenos glóbulos, de tamanho entre 0,1 e 15,0 μm (WALSTRA; JENNESS, 1984). Os glóbulos são protegidos por uma membrana lipoprotéica de estrutura bastante complexa, constituída por

triglicerídeos (95-96%) di e mono-glicerídeos (1,28-1,63%), fosfolipídeos (0,8-1,0%), esteróis (0,22-0,40%), ácidos graxos livres (0,1-0,4%), vitaminas A, D, E, K e traços de carotenóides, esqualeno e esfingolipídeos (KURTZ, 1974).

As propriedades físicas do leite e de seus derivados, como cor e viscosidade, são influenciadas principalmente pelo estado disperso da gordura (WALSTRA; JENNESS, 1984).

Sob o ponto de vista nutricional, a gordura do leite, graças à sua constituição, em forma de glicerídeos finamente emulsionados, e à sua riqueza em ácidos graxos de cadeia curta e média, tem lugar privilegiado dentre as substâncias graxas alimentícias (SIQUEIRA, 1984).

Ibrahim et al. (1957) mostraram que o aumento do teor de gordura do leite resulta em gradual decréscimo na umidade, no nitrogênio total e na caseína, assim como na sua relação caseína/gordura.

3.2 - Queijo

Uma forma simples de definir queijo é como o produto fresco ou maturado obtido por separação do soro depois da coagulação do leite. Contudo esta definição não permite deduzir os diversos ingredientes e operações que podem ser utilizados para a obtenção da grande diversidade de queijos que podem ser fabricados a partir de um produto relativamente homogêneo como é o leite (PEREDA et al., 2005).

Assim, em uma definição mais completa, apresentada no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, o queijo é um produto fresco ou maturado que se obtêm pela separação total ou parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do

coalho, enzimas específicas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias–corantes. A legislação complementa esta definição reservando o nome queijo exclusivamente para produtos cuja base lática não contenha gordura e/ou proteínas de outra origem (BRASIL, 1997).

A história do queijo remonta a tempos antiquíssimos, embora muitos especialistas considerem a Idade Média como o marco inicial da sua fabricação. Há relatos de consumo de leite solidificado datando de 7000 anos a.C. e achados arqueológicos revelam a existência de queijos feitos a partir de leite de vaca e de cabra 6.000 anos a.C. (PERRY, 2004).

Embora o processo básico de fabricação de queijos seja comum a quase todos, variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação criam a imensa variedade conhecida - cerca de 1.000 tipos, sendo que só na França fabricam-se 400 deles (PERRY, 2004).

Os queijos podem ser consumidos logo após o processamento, e neste caso podem ser chamados de frescos ou podem ser maturados por períodos que variam de 3 semanas a dois anos, dependendo do conteúdo de umidade e da intensidade do sabor desejada (FOX et al., 1997).

O queijo é um dos mais versáteis alimentos, sendo adequado para todas as faixas etárias e podendo ser consumido em diferentes refeições e ocasiões (WILKINSON et al., 2001). Tradicionalmente, o queijo tem sido considerado pelos consumidores um alimento nutritivo, porque é uma fonte de proteínas de alta qualidade, rico em cálcio, gordura e outros nutrientes (FENELON; GUINEE, 2000).

Dados de 2001 indicam que a produção leiteira no Brasil é de cerca de 20 milhões de litros, sendo 60% deste total destinado à fabricação de queijos, a qual atinge 450 mil toneladas anuais. Estes dados ilustram bem a importância social e econômica do produto (CICHOSCKI et al., 2002).

3.2.1 - Queijo tipo Prato

O queijo Prato é um dos queijos mais populares do Brasil. Foi introduzido na década de 20, na região Sul de Minas Gerais, por imigrantes dinamarqueses. As origens do queijo Prato remontam, portanto, aos queijos Danbo dinamarquês e Gouda holandês. No Brasil sua tecnologia foi adaptada às condições locais, o que explica as diferenças de sabor e textura observadas no Prato em relação aos queijos que lhe deram origem. Enquanto aqueles se apresentam sempre com textura mais aberta, com olhaduras regulares e pequenas, o Prato pode ser encontrado tanto com olhaduras regulares ou irregulares, como também completamente fechado (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

O queijo tipo Prato é fabricado por coagulação enzimática, adicionado de uma pequena quantidade de corante visando dar o tom amarelado característico (OLIVEIRA, 1986). O Queijo Prato é classificado como gordo e de média umidade (BRASIL, 1997).

3.3 - Processamento de queijo tipo Prato

3.3.1 - Matéria-prima

O leite utilizado na fabricação do queijo tipo Prato deve ser de boa qualidade, devendo ser submetido à pasteurização a uma temperatura entre 72 e 75°C por 15 a 20

segundos. É importante a observação desse padrão, pois se a temperatura for superior a 75°C, ocorrerão problemas na estrutura do queijo em decorrência da maior desnaturação das proteínas. Caso a temperatura fique abaixo do indicado, na realidade o leite não foi pasteurizado, sendo grande o risco de estufamento do produto (MELLO, 2001).

Para que o produto final tenha uma qualidade padronizada, a composição do leite utilizado na manufatura dos queijos não deve variar significativamente, sendo recomendada sua padronização a um teor de gordura que possa se manter constante durante todo ano. Na fabricação do queijo Prato tradicional, o teor de gordura no leite deve ser de aproximadamente 3,5% (OLIVEIRA, 1986). Além disso, o leite deve ter acidez entre 15 e 18°D (Dornic).

3.3.2 - Adição de cultura lática e coalho

É indispensável o emprego de cultura ou fermento lático apropriado para a obtenção de um queijo Prato típico (OLIVEIRA, 1986). Dependendo do produto que se deseja, mais fechado ou com olhaduras, emprega-se a cultura lática apropriada para cada finalidade. Para queijos fechados usa-se cultura do tipo O (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*); para queijos abertos, com olhaduras, usa-se cultura LD que além dos microrganismos já citados, contém ainda *Lactococcus cremoris* e *Streptococcus diacetylactis*, denominada microbiota aromática. Resultados mais regulares são obtidos com culturas do tipo O superconcentradas, para uso direto no tanque de fabricação, também conhecidas como “Direct Vat Set”- DVS (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994). A temperatura de crescimento ótima destes é de 26°C e a maioria das cepas não se multiplica acima de 38°C. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* é mais sensível ao calor e ao sal que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (COGAN;

ACCOLAS, 1995).

No queijo Prato a coagulação do leite é enzimática, utilizando-se assim um agente coagulante. Segundo Fox (1988), a principal função desse agente é a quebra do componente estável da caseína (K-caseína), com um mínimo de proteólise geral. De acordo com Retil, Sguedoni e Juliano (1992), existe uma grande variedade de proteinases que tem sido utilizadas como coagulantes do leite, como as enzimas microbianas, as extraídas de plantas (ficina, bromelina, papaína) e as proteinases gástricas de vitelos, cabritos e cordeiros.

Os coagulantes microbianos podem ser obtidos de diversos microrganismos como os fungos *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* e *Endothia parasitica*. A característica principal destas enzimas é sua alta atividade proteolítica quando comparada a outros coagulantes e sua baixa especificidade (FOX, 1988).

A quantidade de coalho deve ser suficiente para obter a coagulação em cerca de 30-40 minutos, a 32° C (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994). Sua dose varia de acordo com o fabricante, podendo ser usado na forma líquida ou em pó, desde que diluídos em água não clorada e adicionado lentamente ao leite sob agitação. Normalmente usa-se 20 g/100 L leite de cloreto de cálcio, ou seja, 40 mL/100 L de uma solução a 50%, encontrada facilmente no mercado. O cloreto de cálcio adicionado melhora a aptidão do leite à coagulação devido à insolubilização de sais de cálcio durante a pasteurização. Com isso, melhora-se as propriedades da coalhada e diminui-se as perdas de constituintes no soro durante o corte da mesma (AGRIDATA, 2004).

3.3.2.1 - Culturas iniciadoras, de arranque ou culturas “starters”

As culturas iniciadoras são utilizadas na produção de todos os produtos

fermentados desde muitos anos, sendo que algumas dessas culturas são termofílicas e outras mesofílicas e os microrganismos são selecionados e combinados dependendo do seu uso.

As bactérias dos cultivos lácticos inicialmente convertem a lactose em ácido láctico, reduzindo o pH do sistema e criando as condições necessárias para que ocorram múltiplas reações durante o processamento do queijo (SCOTT; ROBINSON; WILBEY, 2002).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* produz ácido láctico rapidamente, diminuindo desta forma o tempo de fabricação, mas algumas cepas produzem a bacteriocina nisina, que pode afetar o desenvolvimento de outras espécies Gram positivo presentes, já outras bactérias podem originar sabor amargo no queijo. Ao contrário, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* cresce mais lentamente no leite, mas produz no queijo um bom sabor. Em consequência, muitos cultivos lácticos são constituídos de uma mistura de cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (COGAN; ACCOLAS, 1995). Ardö (1997) tem recomendado que as culturas iniciadoras usadas na fabricação de queijo com baixo teor de gordura devem ser selecionadas com base na sensibilidade à temperatura, propriedades autolíticas e atividade peptidolítica.

3.3.2.2 - Sistema proteolítico das bactérias ácido – lácticas

O principal papel das culturas iniciadoras é a produção de ácido láctico, provocando um decréscimo no pH. Entretanto, as bactérias ácido-láticas são proteolíticas, possuindo um sistema de proteinases/peptidases considerável (FOX; McSWEENEY, 1996). Estas bactérias são fastidiosas nutricionalmente e necessitam de aminoácidos essenciais, os quais as bactérias não são capazes de sintetizar. Apesar do

leite conter todos os nutrientes necessários a sua multiplicação, há limitações no suprimento de aminoácidos essenciais livres, tais como, metionina, isoleucina, ácido glutâmico, histidina e leucina, essenciais para a síntese de proteínas. Em decorrência disso, as bactérias lácticas dependem de seu sistema proteolítico para atender suas necessidades nutricionais e permitir seu crescimento em um meio pobre em aminoácidos livres (MORENO et al., 2002).

O sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* é composto por três componentes: (a) proteinases extracelulares que aceleram as reações de quebra parcial de uma ou mais partes da caseína do leite em oligopeptídeos e aminoácidos; (b) peptidases intracelulares as quais degradam estes oligopeptídeos formados em pequenos peptídeos e aminoácidos livres; (c) sistema de transporte que catalisam as translocações de peptídeos e aminoácidos para dentro da célula, e que tem sido considerado essencial para o desenvolvimento de bactérias lácticas em leite (KUNJI et al., 1996).

Como apenas pequenos peptídeos podem ser transportados nas membranas celulares, enzimas extracelulares no exterior ou perto da superfície da parede celular têm acesso restrito às proteínas do leite de alto peso molecular ou peptídeos, enquanto enzimas intracelulares são acessíveis aos peptídeos durante o crescimento das bactérias ácido - lácticas no leite (THOMAS; MILLS, 1981). A localização das proteinases das bactérias ácido - lácticas é predominantemente extracelular. Essas proteinases podem estar ligadas tanto na parede da célula, como na membrana celular, e geralmente exibem ótima atividade no pH em torno de 6,0. A etapa inicial na hidrólise da caseína é realizada por proteinases da parede celular que hidrolisam a caseína em peptídeos e aminoácidos (LAW; KOLSTAD, 1983).

As peptidases das bactérias são, na maioria dos casos, intracelulares (VISSER,

1993). Assim, a lise dessas bactérias é importante na maturação do queijo e no desenvolvimento de sabor.

3.3.2.3 - Bactérias que não fazem parte da cultura lática

Embora culturas iniciadoras sejam adicionadas no processamento de queijo Prato, bactérias láticas autóctones (selvagens, indígenas) podem estar presentes, advindas do leite cru ou do próprio ambiente do laticínio (MORENO et al., 2002). Culturas autóctones são denominadas de “non-starter lactic acid bacteria” (NSLAB), ou seja, bactérias láticas não componentes da cultura lática adicionada e têm sido encontradas como parte da microbiota de algumas variedades de queijos, indicando que influenciam no desenvolvimento do sabor desses produtos (McSWEENEY et al., 1995).

Durante a maturação de queijo Cheddar e muitos outros tipos de queijo, a população inicial de lactococos declina e as bactérias não componentes da cultura tornam-se a microbiota dominante na maturação do queijo (PETERSON; MARSHALL, 1990). Assim, as NSLAB, inicialmente presentes em baixas concentrações (< 50 unidades formadoras de colônias - UFC/g), crescem rapidamente até atingir 10^7 UFC/g após quatro semanas, e mantêm-se relativamente constantes após esse período (FOLKERTSMA; FOX; McSWEENEY, 1996).

Os lactobacilos dominam a microbiota NSLAB, sendo sua população fortemente influenciada por práticas higiênicas adequadas na fabricação, mas os pediococos também são encontrados (FOX et al., 1997). A atividade proteolítica das NSLAB complementa a das culturas láticas, produzindo peptídeos geralmente com pesos moleculares similares e aminoácidos livres (LANE; FOX, 1996).

3.3.3 - Corte e tratamento da massa

Assim que a massa atinge o ponto final de coagulação deve-se proceder o seu corte. A coalhada deve ser cortada em grãos miúdos (grãos de milho) e agitada lentamente por cerca de 15 minutos. A acidez do soro no corte deve corresponder a cerca de 2/3 da acidez do leite no momento da coagulação. Deve-se deixar a massa repousar por alguns minutos para que seja eliminado entre 30 e 40% de soro (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994). À medida que os grãos da massa vão se tornando mais firmes devido à dessora, a agitação pode ser mais rápida (OLIVEIRA, 1986).

Após cerca de 20 minutos, a contar do corte, inicia-se o aquecimento gradativamente, ou seja, aumentando cerca de 1°C a cada 3 minutos, até atingir a temperatura desejada. Nos queijos de massa semi-cozida essa temperatura não deve ultrapassar 40°C a fim de evitar a inativação da enzima, sendo que essa temperatura deve ser mantida até atingir o ponto de massa (OLIVEIRA, 1986). O ponto é variável, dependendo do teor de umidade desejável no queijo, mas nas condições normais de fabricação ocorre cerca de 60-80 minutos após o corte (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994). Na prática o ponto pode ser verificado juntando-se uma porção de grãos de massa na mão e ao comprimí-los deve-se formar um pequeno bolo de massa que se desagrega com certa facilidade.

3.3.4 - Prensagem

Nessa etapa obtém-se a forma final do queijo. Na primeira prensagem o queijo Prato é submetido à pressão de 206850 a 275800 Pascal por 15 a 20 minutos. Em seguida faz-se as viragens e tiram-se as rebarbas. Posteriormente, procede-se a segunda

prensagem durante 12h. O queijo é retirado dessa prensagem quando o pH estiver entre 5,4 e 5,6, indicando que está no ponto para ir para a salga (MELLO, 2001).

3.3.5 - Salga e secagem

Durante a salga, ocorre uma redução do volume do queijo como consequência da saída de água da massa que ocorre de forma simultânea à absorção de sal (LUNA; CHAVEZ, 1992). Durante este processo, a diferença na pressão osmótica entre a salmoura e a solução aquosa do interior do queijo, faz com que as moléculas de cloreto de sódio da salmoura migrem para o queijo (GUINEE; FOX, 1987). A casca, uma estrutura externa diferenciada do queijo, funciona como uma membrana semi-permeável que possibilita a migração do sal para o interior do queijo por meio da difusão, concomitantemente a saída da fase aquosa do queijo com seus elementos solúveis, principalmente ácido láctico, lactose e nitrogênio solúvel (FURTADO, 1991).

A concentração da salmoura deve ficar entre 18-23% de NaCl, para temperaturas entre 10-14°C, de modo a facilitar a absorção do sal, eliminar bactérias patogênicas porventura presentes e evitar contaminação (PERRY, 2004). O tempo de salga na salmoura variará em função do formato e peso do queijo. Geralmente uma forma de 3Kg poderá ser salgada por até 48 horas, mas, na prática, o Prato deste peso é salgado por no máximo 24 horas, pois a maior parte do sal é absorvido nas primeiras horas de salga (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

É importante que os resíduos sobrenadantes sejam removidos diariamente, pois são ricos em nutrientes, como proteínas e lactose, focos que favorecem o desenvolvimento de bactérias indesejáveis, bolores e leveduras, que podem alterar a coloração do produto, bem como alguns tipos de mofos que produzem toxinas

(MELLO, 2001). Após a salga os queijos serão secados por 24 horas em câmara fria, embalados a vácuo em película plástica termo-encolhível e levados à câmara de maturação (AGRIDATA, 2004).

3.3.6 - Maturação

A maturação do queijo é definida como sendo a combinação de uma série de reações microbiológicas, bioquímicas e químicas (FOX, 1993). Ao término da fabricação, a maioria dos diferentes tipos de queijo é desprovida de sabor característico. Muitos queijos exigem uma maturação em condições ambientais de temperatura e umidade controladas, para que a coalhada, originalmente com uma textura elástica (similar à borracha), sofra modificações bioquímicas transformando-se numa massa com textura e sabor característicos (SABIONI, 2000). A maturação do queijo Prato é muito importante, pois é nessa etapa de processamento em que o produto adquire as características sensoriais que lhe são peculiares (SILVA; VAN DENDER; BALDINI, 1999).

Durante o processo de maturação do queijo ocorrem diversas transformações bioquímicas que envolvem carboidratos, proteínas e lipídeos, correspondendo à glicólise, proteólise e lipólise, respectivamente (WOLFSCHOON-POMBO, 1983; FOX, 1993). A atuação de processos enzimáticos nas proteínas, gordura, lactose e citrato durante a maturação do queijo levam a formação de compostos voláteis responsáveis pelo sabor do queijo. O odor típico é resultado do equilíbrio em uma mistura complexa de compostos voláteis. Durante a maturação este equilíbrio e, conseqüentemente, os odores mudam ao mesmo tempo (PINHO; FERREIRA; FERREIRA, 2004). Durante o processo de maturação o queijo perde água por evaporação em intensidade variável. As

alterações das proteínas e das gorduras são conseqüências da ação de bactérias e fungos das quais resultam ácidos voláteis e proteínas mais simples.

Fatores do ambiente são importantíssimos para a evolução da maturação e cada tipo de queijo exige condições próprias de maturação, tais como temperatura, umidade ou ventilação.

3.3.6.1 - Glicólise

A glicólise no queijo é a conversão da lactose em ácido láctico pelas culturas iniciadoras durante a preparação da coalhada ou nos estágios anteriores à maturação do queijo. O lactato no queijo pode ser oxidado a acetato durante a maturação. A oxidação do lactato depende da população das bactérias ácido - lácticas que não fazem parte da cultura láctica (non starter lactic acid bactéria – NSLAB) e da disponibilidade de oxigênio. A conversão da lactose em lactato determina o pH do queijo e é de grande importância na regulação das reações químicas que ocorrem no queijo durante a maturação (LIN et al., 2001).

Cerca de 98% da lactose ou do lactato são removidos juntamente com o soro e o restante fica retido na massa no final da fabricação. Normalmente, a lactose residual é rapidamente metabolizada em ácido láctico, através das bactérias da cultura láctica. Esse metabolismo completo e rápido da lactose residual e de seus monossacarídeos é essencial para a produção de queijos de boa qualidade (FOX et al., 1997).

Entretanto, em comparação com outras reações bioquímicas durante a maturação do queijo, a conversão da lactose a lactato tem pouco efeito direto no sabor do queijo maturado (LIN et al., 2001).

3.3.6.2 - Metabolismo do citrato

O leite contém aproximadamente 1750 mg de citrato por litro, a maior parte está na fase solúvel e portanto é perdida na drenagem do soro (FOX et al., 1997). O citrato é importante precursor de compostos aromatizantes em certas variedades de queijo em que são usadas culturas iniciadoras mesofílicas (PARENTE; COGAN, 2004).

O citrato é metabolizado por *Streptococcus diacetylactis* ou *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis*, mas não é metabolizado por outras culturas iniciadoras como lactobacilos termofílicos, *Streptococcus thermophilus* e a maioria das espécies de lactococos. Os produtos do metabolismo do citrato incluem CO₂, o qual é responsável pelas pequenas olhaduras freqüentemente encontradas em alguns tipos de queijos (McSWEENEY, 2004) e também compostos aromatizantes como acetato, diacetil, acetoína e 2,3 butanodiol. O diacetil é produzido apenas em pequenas quantidades, mas a acetoína é produzida em concentrações muito maiores (McSWEENEY; SOUSA, 2000).

3.3.6.3 - Proteólise

A ação dos microrganismos por meio de suas próprias enzimas e das proteinases originárias do leite, a exemplo da plasmina, leva à degradação das proteínas do leite, denominada proteólise (WOLFSCHOON-POMBO, 1983). A proteólise é o mais complexo e importante dos eventos primários que ocorrem durante a maturação da maioria dos queijos (McSWEENEY; SOUSA, 2000). A proteólise contribui para a maturação de quatro formas: a) contribuição direta para o sabor através de aminoácidos e peptídeos (alguns podem conferir sabores indesejáveis – “off-flavors”, principalmente amargor) ou indireta através do catabolismo dos aminoácidos e aminas, ácidos, tióis,

etc; b) maior liberação de compostos sápidos durante a mastigação; c) alteração do pH devido à formação de amônia; d) alterações na textura, provenientes da quebra da rede de proteínas, aumentando o pH e maior ligação da água com grupos carboxil e amino formados (FOX et al., 1997).

De acordo com Fox (1989), cinco agentes diferentes estão envolvidos na degradação da proteína do queijo: coalho, substitutos do coalho, enzimas proteolíticas endógenas do leite, culturas iniciadoras e suas enzimas, enzimas iniciadoras secundárias e bactérias autóctones.

A proteólise pode ser dividida em três fases: antes da fabricação, durante a coagulação enzimática e durante o processo de maturação (FOX, 1989). Antes da fabricação (primeira fase), a proteólise é proveniente da ação de proteinases naturais do leite (plasmina) e também de origem microbiana, como as produzidas por bactérias psicotróficas (FOX, 1989). Segundo Visser (1993), durante a coagulação enzimática (segunda fase) a proteólise se dá por ação das enzimas proteolíticas com alta atividade em pH ácido, como a proteólise específica da quimosina sobre a κ -caseína, hidrolisando a ligação entre os aminoácidos Phe105 - Met106. Essa hidrólise faz com que a fração amino - terminal, denominada para κ -caseína, insolúvel na presença de íons cálcio, passe a fazer parte da estrutura do coágulo e a fração carboxi - terminal, denominada caseína - macropeptídeo, solúvel na presença de íons cálcio, seja perdida no soro (FOX, 1991). A renina hidrolisa também as ligações entre os aminoácidos Phe23 – Phe24 – Val25 da κ - caseína durante os primeiros estágios da maturação do queijo. A renina libera peptídeos de grande peso molecular, mas não produz aminoácidos livres (SABIONI, 2000). A terceira fase se dá durante a maturação envolvendo as enzimas coagulantes, enzimas naturais do leite, enzimas de bactérias lácticas adicionadas (cultura

lática), enzimas de fermentos não lácticos (mofos, leveduras e bactérias propriônicas) e enzimas de bactérias não desejadas, mas que ocorrem nos queijos por resistirem à pasteurização ou como contaminantes durante a fabricação (FOX, 1991).

Segundo Minussi (1994), a taxa e a natureza da proteólise durante a maturação do queijo, tanto quanto à quantidade e à natureza dos produtos de degradação, variam de acordo com a enzima envolvida, o tipo e a composição do queijo e as condições ambientais de estocagem.

O grau de maturação é definido como sendo a degradação protéica em um queijo produzido e estocado sob condições definidas. A determinação de índices de maturação permite prever a qualidade do produto final (VENEMA; HERSTEL; ELENBAAS, 1987). A extensão da maturação caracteriza-se pela quantificação de substâncias nitrogenadas solúveis (NS) acumuladas durante o processo e expressas como percentual do nitrogênio total (NT). Sua determinação analítica baseia-se na precipitação isoeletrica da caseína em uma amostra diluída do queijo. Em pH 4,6, esse índice reflete a atuação das enzimas do coalho na degradação da caseína. O coalho produz, sobretudo, peptídeos de peso molecular médio e baixo, que vêm compor o nitrogênio solúvel em pH 4,6 (MINUSSI, 1994) e de acordo com Lemieux e Simard (1991), os peptídeos de gosto amargo são normalmente encontrados nessa fração. As substâncias nitrogenadas de peso molecular baixo, acumuladas durante a maturação, constituem a profundidade da maturação. Tal profundidade é quantificada por meio do teor de nitrogênio não protéico (NNP), solúvel em solução de ácido tricloroacético a 12% e são, conseqüentemente, quantificados nos respectivos filtrados, ou pela determinação direta dos aminoácidos liberados, expressos como percentual de nitrogênio solúvel total (MINUSSI, 1994).

É importante determinar esse índice, pois ele é diretamente proporcional à ação das endo e exo peptidases bacterianas (descarboxilases e desaminases) que venham a liberar aminoácidos e outros compostos nitrogenados que contribuem para o sabor típico de cada queijo. Entende-se ainda, que seja um importante instrumento para a avaliação da atividade peptidolítica do fermento láctico (MINUSSI, 1994).

O método mais comumente usado para a quantificação de nitrogênio no queijo é o Kjeldahl (IDF, 1964), o qual tem sido usado extensivamente para quantificar o nitrogênio total no queijo (BANKS, 1988). O método é baseado na determinação de nitrogênio e envolve uma digestão ácida durante a qual o nitrogênio orgânico é convertido em nitrogênio na forma de sulfato de amônia não volátil. Após a digestão, o meio é basificado e a amônia destilada, recolhida em ácido e quantificada por uma titulação ácido-base. Como a proteína do leite contém aproximadamente 15,67% de nitrogênio, um fator de 6,38 é usado para converter nitrogênio total para proteína total em leite e produtos lácteos (WALLACE; FOX, 1998).

3.3.6.3.1 - Efeito da razão sal/umidade na proteólise

A taxa de proteólise durante a maturação do queijo é extremamente afetada pela razão sal/umidade no queijo (THOMAS; PEARCE, 1981). Isto pode ser demonstrado em queijo Cheddar maturado por 28 dias a 10°C em que 50% da β -caseína, mas apenas 5% da α_{s1} -caseína ainda estão intactas no queijo com razão sal/umidade é 4%. Quando essa razão é de 6%, 30% da α_{s1} caseína e 80% da β -caseína permanecem intactas (VISSER, 1981).

O coagulante possui um papel essencial na quebra da α_{s1} - caseína, mas no caso da quimosina, outras frações da caseína são muito mais resistentes à proteólise. Dois

fatores estão envolvidos: a especificidade da enzima e a acessibilidade do peptídeo pela enzima. A quimosina quebra predominantemente metionina e fenilalanina (VISSER, 1981), mas degrada α_{s1} -caseína no queijo mais extensivamente que a β -caseína. Isto é uma consequência do microambiente do queijo, especialmente do nível de sal, na conformação da proteína. A concentração de sal induz a agregação da β -caseína, e conseqüentemente, impede o acesso da quimosina (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987).

3.3.6.3.2 - Catabolismo de aminoácidos

A principal contribuição da proteólise para o desenvolvimento do sabor e aroma do queijo é através da liberação de aminoácidos, os quais são precursores para reações catabólicas (McSWEENEY, 2004).

O catabolismo de aminoácidos origina compostos como amônia, aminas, aldeídos, fenóis, indóis e álcoois, todos os quais contribuem para o sabor do queijo. A quebra de aminoácidos possivelmente desempenha algum papel em todas as variedades de queijos, mas é particularmente significativa em queijos maturados por fungos (McSWEENEY; SOUSA, 2000).

O primeiro estágio no catabolismo de aminoácidos envolve descarboxilação, desaminação, transaminação, desulfuração ou até a hidrólise da cadeia de aminoácidos como mostra a Figura 1.

O segundo estágio compreende a conversão dos compostos resultantes, assim como os próprios aminoácidos a aldeídos, primariamente pela ação de desaminases nas aminas. O estágio final da quebra de aminoácidos é a redução dos aldeídos a álcoois, ou sua oxidação a ácidos. Aminoácidos sulfurados podem sofrer intensivas conversões,

originando assim, um grande número de compostos, incluindo o metanotiol e outros derivados sulfurados (McSWEENEY; SOUSA, 2000).

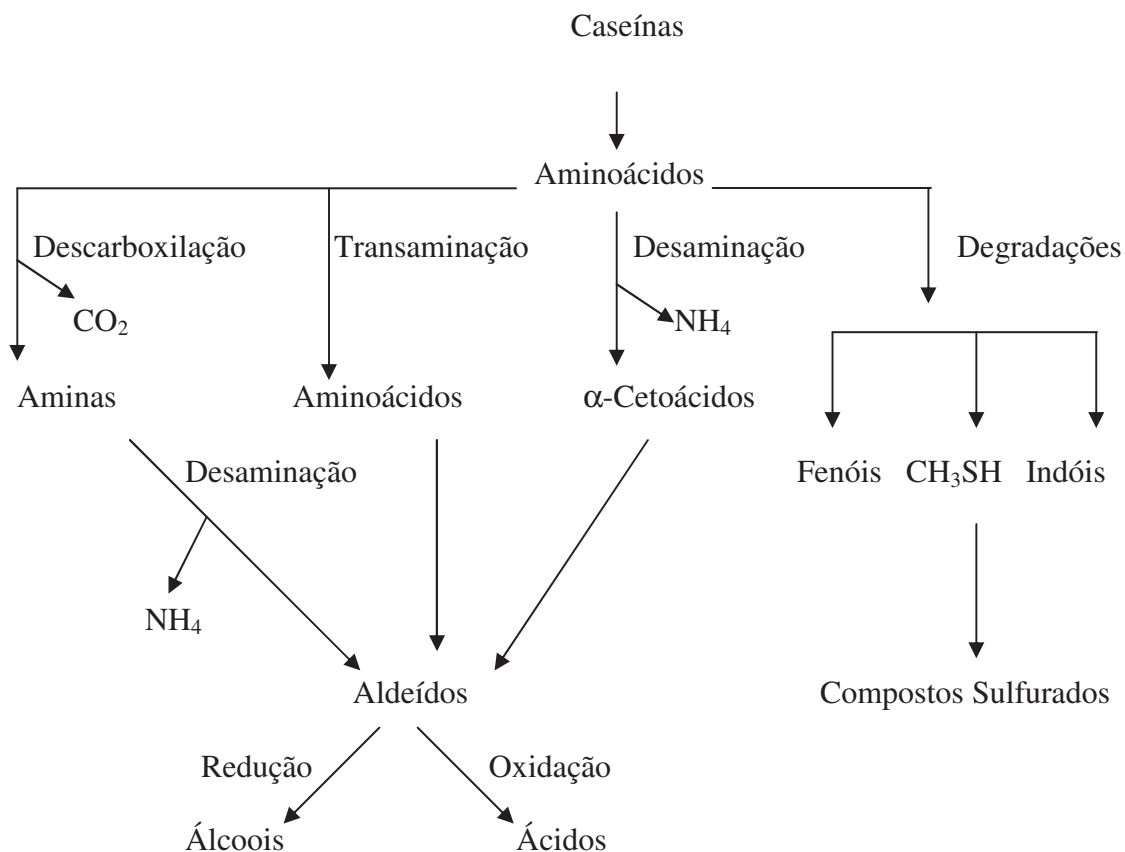


Figura 1. Principais vias do catabolismo de aminoácidos.

3.3.6.4 - Lipólise

De acordo com Alais (1975), a lipólise é, em geral, muito limitada em queijos de massa firme. Durante o processo de maturação as enzimas lipolíticas presentes nos queijos são responsáveis pela degradação da fração lipídica, liberando ácidos graxos livres por meio de diversas reações bioquímicas e formando componentes importantes do sabor de queijos maturados (COSTA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998; FURTADO;

CHANDAN, 1983; SCOTT, 1986).

As enzimas lipolíticas são produzidas pelas culturas láticas, adicionadas durante o processo de fabricação do queijo, ou diretamente adicionadas, na forma purificada de preparações comerciais (SABIONI, 2000). A lipase natural do leite não é ativa em valores de pH inferiores a 6,5 e é facilmente destruída pelo calor, mesmo se tratando de pasteurização (ALAIS, 1975).

A lipólise ocorre em pequeno grau na maioria das variedades de queijo, sendo acentuada apenas em variedades de queijos maturados por fungos e em queijos italianos duros feitos com coalho contendo lipases e esterases (FOX; STEPANIAK, 1993). A fração de gordura do queijo contribui para a acumulação de ácidos graxos livres e em adição ao seu impacto direto no sabor do queijo, os ácidos graxos livres também atuam como moléculas precursoras, os quais levam a produção de outros compostos responsáveis pelo sabor, como metilcetonas, ésteres e álcoois (McSWEENEY; SOUSA, 2000).

Levando-se em consideração que a formação do sabor em queijos como o Prato está relacionada sobretudo com a proteólise, e que a contribuição da lipólise, nesse caso, é muito pequena, é importante compreender melhor os motivos pelos quais a redução do teor de gordura origina produtos com fraca intensidade de sabor e aroma. Os resultados obtidos até agora permitem supor que, de alguma forma, o teor de gordura do queijo afeta a retenção, a localização e a evolução das bactérias láticas, que apresentam um papel importante no desenvolvimento de sabor e aroma dos queijos (SILVA, A.T. et al., 2004).

A maior taxa de retenção de bactérias láticas em queijos com alto teor de gordura é explicada pela existência de uma inter-relação entre os glóbulos de gordura e as

células bacterianas, que são retidas em maiores proporções pela sinérese do coágulo durante a fabricação desses tipos de queijos do que naqueles com teores reduzidos de gordura. A análise por microscopia eletrônica de secções de queijos frescos com e sem redução do teor de gordura mostrou que cerca de 85% de células de bactérias lácticas estavam localizadas nas áreas periféricas dos glóbulos de gordura (LALOY et al., 1996).

3.3.6.4.1 - Metabolismo de ácidos graxos livres

Os ácidos graxos livres contribuem indiretamente para o sabor do queijo como precursores na produção de compostos voláteis através de uma série de reações conhecidas como metabolismo dos ácidos graxos (McSWEENEY, 2004).

Ésteres são encontrados comumente em muitas variedades de queijos e produzidos pela reação de esterificação de um ácido graxo livre com um álcool. O mais comum é o etanol, o qual origina ésteres etílicos que são os que existem em maiores quantidades no queijo. O etanol é um composto derivado da fermentação da lactose ou do catabolismo de aminoácidos (McSWEENEY, 2004).

3.3.6.5 - Formação de sabor em queijos

A formação de sabor é definida como sendo um processo extremamente complexo e resultante de um equilíbrio sutil e frágil entre todos os compostos originários do metabolismo da lactose, lipídeos e proteínas (YVON; RIJNEN, 2001). Estudos prévios têm demonstrado que a fração hidrossolúvel de queijos maturados contém componentes que possuem importante contribuição no sabor (ENGELS; VISSER, 1994).

A gordura tem um importante papel na obtenção de textura e sabor dos queijos. É

comumente observado que queijos produzidos com leite desnatado não desenvolvem o sabor completo. O desenvolvimento do sabor característico do queijo proveniente da hidrólise da gordura pode ser obtido diretamente pela presença de ácidos graxos de acordo com o tipo, concentração e proporção definida, ou indiretamente, após transformações bioquímicas que resultam na formação de outros compostos aromatizantes como cetonas, metil-cetonas e lactonas (SABIONI, 2000).

A proteólise também possui um papel importante nesse processo, seja diretamente, pela formação de aminoácidos e peptídeos pequenos ou indiretamente, via catabolismo de aminoácidos (FOX, 1989). Os aminoácidos podem ser catabolizados por desaminação ou descarboxilação. A desaminação causa a formação de íons amônio e ácidos carboxílicos, os quais podem ser catabolizados seguindo diferentes rotas metabólicas. A descarboxilação gera CO_2 e aminas que, podem ser degradadas por alguns dos microrganismos que estão presentes (PRIETO et al., 2004).

Vários desses compostos originados do catabolismo dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano), de cadeia lateral (leucina, isoleucina, valina) e sulfurados (metionina) têm sido identificados em alguns tipos de queijos (CHRISTENSEN et al., 1999) e são os maiores precursores de compostos aromatizantes (YVON; RIJNEN, 2001). Enzimas de microrganismos presentes no queijo que estão envolvidas na degradação de aminoácidos incluem desaminases, descarboxilases, transaminases e enzimas que convertem os aminoácidos de cadeia lateral (LAW, 1997). Tem se verificado que muitas pesquisas relacionadas com a aceleração da proteólise foram realizadas nesta última década, entretanto, estudos mais recentes mostraram que a intensificação das reações da proteólise primária não leva a intensificação de sabor. A ação de enzimas conversoras de aminoácidos em compostos

voláteis é que constitui o principal fator limitante, sendo esta característica extremamente dependente da linhagem (RIJNEN; BONNEAU; YVON 1999; YVON; RIJNEN, 2001). No entanto, um balanço adequado entre a taxa de degradação das caseínas e a de conversão de aminoácidos é essencial para o processo de formação de sabor nos queijos (WALLACE; FOX, 1997; YVON; RIJNEN, 2001).

Alterações no balanço da gordura, proteína e umidade na produção de queijo com baixo teor de gordura podem resultar em deficiências não somente nos compostos aromatizantes derivados da gordura do leite, mas também em compostos gerados da interação da degradação de produtos da lipólise e proteólise. A percepção do aroma e compostos aromatizantes também é dependente da taxa de liberação de sabor durante a mastigação, fato que será influenciado pelo conteúdo de gordura no queijo (DELAHUNTY et al., 1994).

3.3.6.6 - Compostos voláteis responsáveis pelo sabor do queijo

Pesquisas com cromatógrafos gasosos mostraram a presença de centenas de compostos que poderiam influir no sabor do queijo. A maioria deles está presente em baixa concentração, muito abaixo dos seus limites de percepção, mas que ainda assim podem afetar a qualidade do queijo. Acredita-se que os produtos da proteólise sejam os principais contribuintes do sabor do queijo. Os principais contribuintes do aroma estão menos claros, mas sabe-se que compostos sulfurados e carbonílicos são importantes (ENGELS et al., 1997).

No queijo, compostos voláteis estão freqüentemente presentes em baixas concentrações, e métodos analíticos e instrumentais têm sido desenvolvidos para extrair substâncias voláteis de amostras de queijo e concentrá-las antes da análise

cromatográfica gasosa (HACHENBERG; SCHMIDT, 1983; KLEIN; GAUCH; BOSSET, 1990; BOSSET et al., 1995; MARIARCA; BOSSET, 1997).

Para a identificação dos compostos, a técnica “headspace” é comumente usada porque métodos de destilação ou outros procedimentos de extração frequentemente tendem a formar interferentes que decompõem os componentes (WOOD; ASTON; DOUGLAS, 1994).

Os principais compostos já identificados de vários tipos de queijo são peptídeos, aminoácidos, aminas, tióis e tioésteres, ácidos graxos, metilcetonas e ésteres, derivados de lípides, ácidos orgânicos, especialmente o ácido láctico, mas também ácido acético e propiônico, ésteres e álcoois (MORENO et al., 2002). Os atributos de sabor dos compostos formados variam de agradável para ésteres a pútrido para compostos sulfurados (ENGELS et al., 1997).

A aceleração ou diversificação do desenvolvimento do sabor é de grande interesse econômico, pois o sabor final do queijo em parte determina a escolha do consumidor (WALLACE; FOX, 1997).

3.3.6.7 - Perfil eletroforético

A detecção e medida dos produtos de hidrólise das proteínas dos queijos são usadas como índices de maturação, uma vez que a proteólise está ligada ao desenvolvimento de textura e sabor característicos na maioria dos queijos. Os principais métodos para separação de proteínas intactas, dos peptídeos e dos aminoácidos provenientes da hidrólise se baseiam na precipitação fracionada (com ácidos ou solventes), eletroforese e cromatografia (SILVA; VAN DENDER; BALDINI, 1999).

Enquanto os métodos de fracionamento das proteínas medem apenas a proteólise

geral dos queijos, as técnicas de eletroforese, que se baseiam na separação de proteínas com base no peso molecular, permitem o acompanhamento da hidrólise da caseína em componentes menores, contribuindo dessa forma, para o melhor entendimento dos processos proteolíticos envolvidos na maturação (SILVA; VAN DENDER; BALDINI, 1999).

3.4 - Principais defeitos do queijo Prato

3.4.1 - Mau fatiamento

Segundo Furtado (1989), fatiar bem é uma das características mais importantes do queijo Prato, que é largamente consumido de maneira indireta (lanches, sanduíches, etc). Quando o queijo não fatia bem, as principais causas podem estar relacionadas a: queijos com teor excessivo de gordura; queijos com teores altos de umidade e gordura; queijos novos, durante a maturação desses queijos pode ocorrer um amolecimento progressivo da massa e daí surgem problemas de fatiamento; queijos fabricados com leite mais ácido apresentam menor teor de cálcio e estrutura mais frágil.

3.4.2 - Marmorização da massa

O defeito é resultante do corte irregular da coalhada, seguido também de agitação inadequada, que provocam o aparecimento de grãos ligeiramente maiores do que o normal. Quando o processo de semi-cozimento da massa é rápido demais, só há contração na parte periférica do grão que se torna mais dura e dificulta a saída de soro de seu interior. Assim, falta coesão dos grãos na prensagem e a massa não se torna perfeitamente homogênea, mesmo após o queijo ser maturado por algum tempo (FURTADO, 1989).

3.4.3 - Manchas brancas

A excessiva absorção de sal em certas partes do queijo pode causar o defeito, impedindo a proteólise homogênea da massa. Este fenômeno está relacionado com algumas características do processo de elaboração como a salga de pequenas unidades de queijos semiduros (cerca de 1Kg), originárias do fatiamento de blocos grandes (8 a 14 Kg). Como resultado, algumas unidades ficam sem casca fechada em algumas das faces e absorvem mais sal. O defeito torna-se mais aparente durante a maturação do queijo, já que esta região mais salgada será menos proteolisada e se apresentará mais esbranquiçada (FURTADO, 1989).

3.4.4 - Estufamento

O defeito mais sério na fabricação do queijo Prato é o estufamento (OLIVEIRA, 1986). Este problema acontece ao final da fabricação (prensagem ou salga) ou no decorrer da maturação. No primeiro caso, é conhecido como estufamento precoce podendo ser causado por três diferentes tipos de microrganismos: leveduras, alguns bacilos esporulados (raro) e bactérias do grupo coliforme. Esta última, a causa mais comum. Na maioria das vezes, tem sua origem na recontaminação do leite pasteurizado e, portanto, relaciona-se com a higiene dos equipamentos utilizados ou com a boa qualidade dos ingredientes adicionados, particularmente a cultura lática (FURTADO, 1991).

O estufamento tardio é o mais comum neste tipo de queijo devido à massa ser mais fechada e geralmente menos ácida, dando assim, melhores condições para o desenvolvimento de clostrídios, as bactérias causadoras deste tipo de estufamento (OLIVEIRA, 1986).

3.4.5 - Gosto amargo

A formação do gosto amargo é um dos problemas mais complexos que podem surgir durante a maturação ou estocagem de queijos. Tal complexidade se deve a uma variedade de fatores que podem causar ou influenciar na intensidade deste defeito.

Sabe-se que o gosto amargo se deve não somente à formação, mas sobretudo ao acúmulo de peptídeos específicos (geralmente insolúveis ou apolares), de massa molecular baixa (menos de 3.000 Daltons), durante o processo de decomposição protéica que caracteriza a maturação do queijo. A maioria destes peptídeos amargos são hidrofóbicos e apresentam aminoácidos apolares nas cadeias laterais. Muitos apresentam de 3 a 6 aminoácidos, com massa molecular entre 600 e 1.400 Daltons, aproximadamente. A presença desses peptídeos é normal durante a maturação e o gosto amargo só aparece quando eles se acumulam no queijo (FURTADO, 1989).

Percebeu-se o aparecimento de três tipos de sabor amargo em queijos, classificados de acordo com a época de origem e o grau de duração no produto: Tipo 1: aparece entre 1 ou 2 meses após a fabricação e tende a desaparecer entre dois e quatro meses de maturação subsequente; Tipo 2: aparece como o tipo 1, mas permanece indefinidamente no queijo; Tipo 3: aparece entre 3 a 5 meses após a fabricação e persiste indefinidamente (FURTADO, 1991).

3.5 - Queijos com teor reduzido de gordura

Como a gordura contribui para as características físicas do queijo e é um precursor de compostos flavorizantes lipossolúveis, possui a capacidade de modificar a percepção e volatilidade de compostos aromatizantes, bem como da textura e do sabor. Queijos com baixo teor de gordura são menos aceitos pelos consumidores do que aqueles com teor integral devido aos defeitos no sabor e na textura. Defeitos na textura incluem

aumento na firmeza, dureza e granulosidade (OLSON; JOHNSON, 1990). Isto ocorre porque há mais matriz estrutural por unidade de área em queijos com teor de gordura reduzido, o que permite o processo de sinérese continuar após a manufatura do queijo devido à relativa deficiência dos glóbulos de gordura (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987).

A falta de sabor em queijos com teor reduzido de gordura pode ser devido à falta de precursores advindos da gordura, à falta da gordura como um solvente de compostos aromatizantes, às diferenças na estrutura física do queijo com teor reduzido de gordura, que inibem certas reações enzimáticas essenciais para a formação de compostos aromatizantes e à baixa taxa de proteólise nesses queijos (URBACH, 1997). Entretanto, alguns autores afirmam que esses defeitos não são conseqüências diretas do conteúdo reduzido de gordura, mas de outros parâmetros os quais são indiretamente alterados pela redução de gordura, como o pH e o conteúdo de sal (BANKS; HUNTER; MUIR, 1993).

O alto conteúdo de umidade em queijos com baixo teor de gordura modifica a atividade da cultura lática devido aos efeitos da alta umidade em relação aos sólidos não gordurosos e o baixo conteúdo de sal na umidade, ambos os quais têm efeito crítico no processo de maturação (LELIÉVRE; GILLES, 1982). Por essa razão, a proteólise em queijo com reduzido teor de gordura é geralmente modificada comparada àqueles que possuem teor integral (USTUNOL; KAWACHI; STEFFE, 1995).

Geralmente, queijos com alto conteúdo de umidade apresentam sabores indesejáveis prontamente detectados, porque uma menor proporção de compostos aromatizantes é formada através da degradação da gordura (KATSIARI; VOUTSINAS, 1993). Peptídeos amargos são formados pela ação de várias proteinases na caseína. O amargor ocorre no queijo quando esses peptídeos se acumulam em grande concentração

como resultado de uma produção exagerada ou degradação inadequada por peptidases microbianas. Entretanto, peptídeos amargos podem originar-se da α_{s1} ou β -caseína, através da ação da quimosina e/ou células de lactococos que envolvem proteinases na região hidrofóbica do C-terminal da β -caseína, que está principalmente associada com a produção de peptídeos amargos (McSWEENEY, 1997). O desenvolvimento de amargor pode ser minimizado pelo aumento de sal na umidade (BANKS; HUNTER; MUIR, 1993; MISTRY; KASPERSON, 1998). Apesar de ser aceito que o amargor no queijo resulta de um acúmulo na concentração de peptídeos hidrofóbicos, outros compostos como alguns aminoácidos, amidas, longas cadeias cetônicas e alguns monoglicerídeos podem contribuir (McSWEENEY, 1997).

Segundo Lee e Warthensen (1996), quando uma fração do gosto amargo é incorporada no queijo Cheddar com teor integral e reduzido de gordura, a intensidade de amargor é mais significativa em queijo com teor reduzido de gordura.

Ácidos graxos no queijo são originados basicamente da lipólise da gordura do leite. Muitos estudos têm identificado deficiências nos ácidos butanóico e hexanóico em queijos com teor reduzido de gordura (BANKS; BRECHANY; CHRISTIE, 1989; DIMOS; URBACH; MILLER, 1996). Deficiências nos compostos aromatizantes derivados da gordura do leite incluindo ácidos carboxílicos, metil-cetonas e γ e δ lactonas, têm sido associados com o fraco desenvolvimento de sabor em queijo Cheddar com 50% a menos de gordura (WIJESUNDRA; WATKINS, 2000).

3.6 - Alternativas microbiológicas para melhorar o sabor de queijos com teor reduzido de gordura

3.6.1 - Uso de culturas adjuntas

Segundo Fernandez e Steele (1993), a cultura adjunta é usada em adição a uma cultura lática inicial padrão e pode melhorar o sabor de queijos com teor reduzido de gordura através do aumento da proteólise, especificamente da atividade de aminopeptidases, a qual reduz o amargor e aumenta a concentração de peptídeos desejáveis e precursores voláteis de sabor e aroma.

Em contraste com as bactérias autóctones, as culturas adjuntas são especificamente selecionadas e intencionalmente adicionadas para suplementar a microbiota do leite destinado à fabricação do queijo (SILVA, A.T. et al., 2004). Os lactobacilos são mais comumente usados como culturas adjuntas por apresentarem atividade enzimática maior que a de lactococos. Além de acelerar a proteólise, apresentam elevado potencial para degradar peptídeos hidrofóbicos e reduzir o sabor amargo em queijo (HABIBI- NAJAFI; LEE, 1996). As espécies mais promissoras são *Lactobacillus casei* (mesófilo), *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (termófilos) (LEE; JOHNSON; MARTH, 1992).

Lactobacillus casei é um microrganismo Gram-positivo, catalase negativo, em forma de bastonete, é facultativo quanto ao requerimento de oxigênio. É um habitante comum do intestino delgado, sendo resistente à bile e a temperatura ótima de seu crescimento é 37°C. É um microrganismo homofermentativo e que não produz amônia a partir da arginina, fermenta a glicose, galactose, manose e maltose, entretanto não fermenta nem a rafinose nem a ramnose e a maioria das cepas fermenta a lactose

(COGAN; ACCOLAS, 1995). *Lactobacillus casei* subsp. *casei* possui forte atividade proteolítica e peptidolítica (KHALID; MARTH, 1990). Lee, Johnson e Marth (1992) relataram um grande número e ótima atividade de peptidases e esterases em espécies de *Lactobacillus casei* quando comparadas com outras culturas. A predominância da atividade peptidolítica no sistema proteolítico de *Lactobacillus casei* (ARORA; LEE, 1990) sugere que essas espécies têm um papel chave na maturação do queijo, funcionando como agente flavorizante e redutor de sabor amargo (BROOME; HICKEY, 1991; ELABBOUDI et al., 1992). Martinez – Cuesta et al. (2001) verificaram que *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL 731 pode ser usado como cultura adjunta na manufatura de queijos semi-duros, pois seu sistema enzimático é capaz de influenciar o desenvolvimento de sabor e aroma em queijo com baixo teor de gordura.

A seleção cuidadosa de linhagens adequadas é fundamental para a obtenção dos efeitos almejados (SILVA, A.T. et al., 2004).

3.6.2 - Uso de culturas adjuntas atenuadas e extratos enzimáticos

Uma das alternativas mais eficientes para aumentar os níveis enzimáticos no queijo, sem promover alteração na composição da cultura lática nem no processo tecnológico, consiste na adição de células integrais de culturas adjuntas que sejam incapazes de se desenvolver e de produzir níveis significativos de ácido láctico, mas cujas enzimas permanecem ativas durante a maturação do queijo. Essas culturas se encontram normalmente em uma forma debilitada ou enfraquecida e se denominam culturas atenuadas (SILVA, A.T. et al., 2004).

A atenuação pode ser alcançada por vários métodos os quais incluem: aquecimento, congelamento, secagem ou liofilização e tratamentos com lisozima ou

solventes, linhagens mutantes lactose – negativas (KLEIN; LORTAL, 1999). Várias espécies de lactobacilos e lactococos têm sido atenuadas por meio de diferentes métodos, e adicionadas ao leite de fabricação juntamente com o fermento láctico. Em muitos casos foram observados aumento de proteólise e lipólise, uma redução do tempo de maturação e a intensificação do sabor e aroma com redução do amargor (SILVA, A. T. et al., 2004).

Independente desses resultados promissores, as culturas atenuadas não são usadas em grande escala a nível industrial, principalmente devido à natureza empírica dos métodos da atenuação propostos ou aos elevados custos da adição de células. Além de uma melhor compreensão dos mecanismos da atenuação, pesquisas adicionais ainda são necessárias para elucidar os vários aspectos desse método, como por exemplo, a dependência da linhagem à atenuação, a concentração mínima de células necessária, o nível adequado de células atenuadas e vivas, dentre outros. Aparentemente as células atenuadas não têm efeito sobre as linhagens acidificantes componentes da cultura láctica, mas seu impacto no restante do ecossistema do queijo, particularmente nas NSLAB, não foi avaliado (SILVA, A. T. et al., 2004).

3.7 - Textura do queijo

Os principais fatores que afetam a consistência na maioria das variedades de queijos provavelmente são: umidade, extensão da proteólise, pH, teores de cloreto de sódio e de gordura, qualquer heterogeneidade destas variáveis na massa do queijo e, naturalmente, a temperatura (BALDINI et al., 1998).

A textura ou corpo de um queijo é uma das características mais importantes na determinação de sua identidade e qualidade (BALDINI et al., 1998). Em muitos casos a

textura é tão importante quanto um parâmetro de sabor e aroma (FOX et al., 1996). A textura do queijo é importante por ser uma propriedade pela qual o consumidor primeiro identifica e julga uma variedade específica. A aparência, presença ou ausência de olhaduras no queijo são características notadas antes do sabor (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987).

O queijo Prato é um queijo semi-duro, de massa semi-cozida e possui propriedades físicas bem definidas que dependem também da idade do queijo (SILVA; VAN DENDER; CAMPOS, 1999). O comportamento reológico de queijos semi-duros é descrito em termos da reologia de um material composto. Os glóbulos de gordura presentes agem como partículas acumuladas na matriz aquosa dos agregados protuberantes da caseína (VISSER, 1991).

As propriedades reológicas variam entre as centenas de variedades de queijo, mas o efeito da temperatura na gordura do leite afeta a firmeza do queijo. A reologia do queijo é afetada também pela extensão de insaturação nos ácidos graxos que constituem a gordura. Aumentos na extensão de insaturação tornam o queijo visivelmente mole (PRENTICE, 1987). Outro fator importante na determinação da textura de um queijo é a razão entre gordura e proteína no leite, uma vez que a estrutura protéica é enfraquecida com o aumento do teor de gordura e água. Por outro lado, a diminuição destes constituintes resulta num queijo mais duro. Assim, produtos com alto teor de gordura possuem menor firmeza e corpo mais elástico do que aqueles que sofreram alguma redução deste nutriente, sendo a firmeza proporcional ao conteúdo de caseína (JACK; PATERSON, 1992).

Durante a mastigação, ocorre uma troca contínua nas propriedades físicas do alimento devido à desintegração deste pela força da mastigação, umidade e diluição

com saliva (SZCZESNIAK, 1991). A descrição e a classificação das sensações perceptíveis das características de textura são realizadas por meio da análise do perfil de textura (TPA), a qual pode ser realizada com o auxílio de medidas sensoriais e instrumentais.

Testes de força de compressão e quantificação através dos parâmetros mecânicos a partir do registro das curvas da força de deformação são a base da avaliação da textura por métodos instrumentais (SZCZESNIAK, 2002). Segundo Fox et al. (2000), estes procedimentos simulam a compressão do queijo entre os molares durante a mastigação.

A análise do perfil de textura conta com os seguintes parâmetros:

- Dureza TPA: é a força necessária para atingir uma determinada deformação;
- Coesividade TPA: é a quantidade de força simulada das ligações internas para deslocar o produto do dispositivo de compressão;
- Elasticidade TPA: é a capacidade do material voltar a sua condição original depois de retirada a força de deformação;
- Adesividade TPA: é a quantidade de força para simular o trabalho necessário para sobrepor as forças de atração entre a superfície do alimento e a superfície de outros materiais em contato com este;
- Fraturabilidade TPA: é a força necessária para fraturar o material;
- Mastigabilidade TPA: é a energia requerida para mastigar um alimento sólido até o ponto de ser engolido;
- Gomosidade TPA: é a energia requerida para desintegrar um alimento semi-sólido até o ponto de ser engolido.

3.7.1 - Efeito da proteólise na textura

Pesquisas em muitos países têm mostrado que a textura do queijo é extremamente dependente do pH e da razão caseína intacta/umidade (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987). De Jong (1976) observou boa correlação entre a firmeza de um queijo e a quantidade de α_{s1} -caseína presente. Isto ocorre porque a quebra da caseína gera produtos hidrossolúveis e que não podem contribuir para a matriz protéica (WALSTRA; VAN VLIET, 1982). Outra característica da proteólise também deve ser considerada: quando cada peptídeo é clivado, dois novos grupos iônicos são gerados e cada um desses irá competir pela água disponível no sistema. Portanto, a água previamente disponível para a solvatação da cadeia protéica irá se ligar aos novos grupos iônicos (STANLEY; EMMONS, 1977).

Durante a maturação, entre o 7º e 14º dia a textura elástica do queijo jovem é rapidamente convertida em um produto mais macio e homogêneo. Como a caseína é a única fase sólida contínua, provavelmente o que ocorre é a quebra da rede de caseína que constitui a microestrutura do queijo. Esta rede de caseína é extremamente enfraquecida quando uma simples ligação em aproximadamente 20% de α_{s1} -caseína é hidrolisada pelo coagulante para liberar o peptídeo alcalino (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987).

3.7.2 - Relação entre pH, umidade e textura

As variações de textura são influenciadas pelo pH. Entre o pH 5,5 e 5,1, muito fosfato coloidal e considerável caseína dissociam-se em submicelas (ROEFS et al., 1985). Estas mudanças no tamanho e características das submicelas aumentam significativamente a sua capacidade de absorver água. O inchaço das submicelas de

caseína no leite coagulado é aumentado na presença de sal, mas é inibido se a salmoura contém íons de cálcio. Assim, variações de textura podem ser obtidas entre pH 5,3 e 5,1, desde que ocorra variação nos agregados de caseína presentes (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987).

Queijos duros e semi-duros não amolecem durante a maturação por causa da baixa umidade do queijo, mas algumas mudanças na estrutura podem ocorrer. As propriedades reológicas do queijo com concentração de íon sódio e pH similares, e um grau semelhante de degradação de α_{s1} -caseína, são portanto, regulados pelo seu conteúdo de umidade. A razão sal/umidade no queijo salgado e seco é particularmente importante porque isso controla o pH final do queijo e a lactose residual, bem como a quimosina residual (LAWRENCE; CREAMER; GILLES, 1987).

3.8 - Microestrutura

A microestrutura do queijo está intimamente relacionada com o desenvolvimento de sua textura e sabor (AWAD; ABDEL-HAMID; EL-SHABRAWY, 2002). A para-caseína constitui a matriz do queijo e representa 99% da proteína da maioria dos queijos. Estudos com microscopia eletrônica têm demonstrado que as proteínas formam uma malha que retém a gordura (SABIONI, 2000). No entanto, Dean, Berridge e Mabbitt (1959) foram os primeiros pesquisadores a verificar que as bactérias lácticas apresentaram uma tendência de se agregar aos glóbulos de gordura em queijo Cheddar. Laloy et al. (1996) verificaram que dependendo da linhagem, queijo com teor integral de gordura e queijo com 50% de redução de gordura apresentaram, respectivamente, contagens de bactérias lácticas 75% a 100% e 50% a 80% superiores ao queijo isento de gordura.

A matriz estrutural do queijo é uma ligação de uma rede de caseína-fosfato de cálcio na qual os glóbulos de gordura estão fisicamente aderidos (LAWRENCE; GILLES; CREAMER, 1983). A matriz é elástica quando a caseína é largamente intacta, mas esta elasticidade é perdida à medida que a proteólise ocorre durante a maturação do queijo. A adesão dos glóbulos de gordura serve para limitar a deformação na matriz do queijo e sua distribuição, determinando a uniformidade e o grau de ligação através da matriz caseínica (JAMESON, 1990).

A efetividade dos glóbulos de gordura na limitação da deformação do queijo depende principalmente da rigidez dos glóbulos, a qual é determinada pela razão de sólidos/ gordura. Esta razão é altamente dependente da variação de temperatura, a qual torna o queijo um material viscoelástico (JAMESON, 1990).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Matérias – primas utilizadas na fabricação do queijo tipo Prato

- Leite pasteurizado tipo A integral e desnatado
- Cultura lática mesofílica LL 50A da DSM Food Specialties[®] composta por *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris*
- Cultura lática mesofílica LBC81 da Rhodia Food[®] composta por *Lactobacillus casei*
- Solução de cloreto de cálcio 50%.
- Cloreto de sódio comercial
- Corante de vegetal comercial extraído do urucum
- Ácido sórbico
- Coalho líquido comercial CHYMAX, fabricado pela Chr. Hansen's[®].

4.2 - Métodos

4.2.1 - Avaliação do leite pasteurizado

Para a caracterização do leite pasteurizado utilizado para a fabricação dos queijos tradicional e modificados foram feitas análises físico-químicas cujos métodos são relatados a seguir. A determinação da densidade foi feita por meio do termolactodensímetro de Quevenne, que possui escala entre 1,015 a 1,040 g/cm³ (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). A densidade foi corrigida para 15°C através da tabela de correção em função da temperatura. O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Os sólidos totais foram determinados de forma indireta utilizando os valores encontrados para os teores de

gordura e densidade através do disco de Ackermann (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). A acidez foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N e solução de fenolftaleína como indicador, sendo expressa em graus Dornic (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). O ponto crioscópico foi determinado pelo congelamento da amostra em crioscópio eletrônico digital (SILVA, P.H.F et al., 1997). A verificação da presença de antibióticos foi feita pelo Teste SnapTM Beta Lactam (TRONCO, 2003). Todas as análises foram feitas em triplicata.

4.2.2 - Preparo da cultura

As culturas comerciais liofilizadas foram inoculadas separadamente em 1 L de leite desnatado reconstituído a 14% previamente esterilizado e resfriado. Posteriormente esse volume foi distribuído em frascos menores. Foi adicionado glicerol como crioprotetor e então as culturas foram congeladas a -18°C e descongeladas somente no dia da fabricação do queijo.

4.2.3 - Preparo dos queijos

O queijo Prato foi elaborado a partir de 25L de leite pasteurizado tipo A. O leite foi padronizado da seguinte forma: realizou-se a análise de gordura dos leites light e integral separadamente. A partir do teor de gordura de cada um dos leites, foi calculada, com auxílio do Diagrama de Pearson, a quantidade que deveria ser adicionada de cada leite numa proporção de aproximadamente 15L de leite desnatado e 10L de leite integral. Foi utilizado um tanque de fabricação com capacidade para 56L de leite, dotado de agitador mecânico e controle de temperatura. O leite foi aquecido a 32°C , adicionado de 0,08% de cultura mesofílica, 0,005% de coalho, 0,05% de cloreto de

cálcio, 0,01% de corante de urucum e 0,012% de ácido sórbico. A coagulação ocorreu entre 40 e 45 min. Foi feito o corte por aproximadamente 10-15 min. seguido da retirada de 1/3 do soro e aquecimento até 38°C. Ao final do tratamento térmico da massa foi retirado o restante do soro e realizada a enformagem da massa, prensagem por 30 min., inversão e prensagem até o dia seguinte. Antes da salga e após a secagem os queijos foram pesados para cálculo do rendimento. Os queijos foram salgados em salmoura 18%, durante 5 horas. Após serem retirados da salga e secos por 24h, os queijos foram embalados a vácuo e estocados em câmara para maturação. Foram realizados 4 tratamentos, conforme apresentado na Figura 2, sendo um pelo método tradicional e três pelo método modificado, com a adição da cultura adjunta, como segue:

- *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* (Tratamento A, controle),
- 80% de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* e 20% de *Lactobacillus casei* (Tratamento B),
- 70% de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* e 30% de *Lactobacillus casei* (Tratamento C),
- 60% de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* e 40% de *Lactobacillus casei* (Tratamento D).

Para cada tratamento foram obtidos 5 queijos, sendo cada um analisado em um período diferente da maturação (1, 15, 30, 45 e 60 dias).

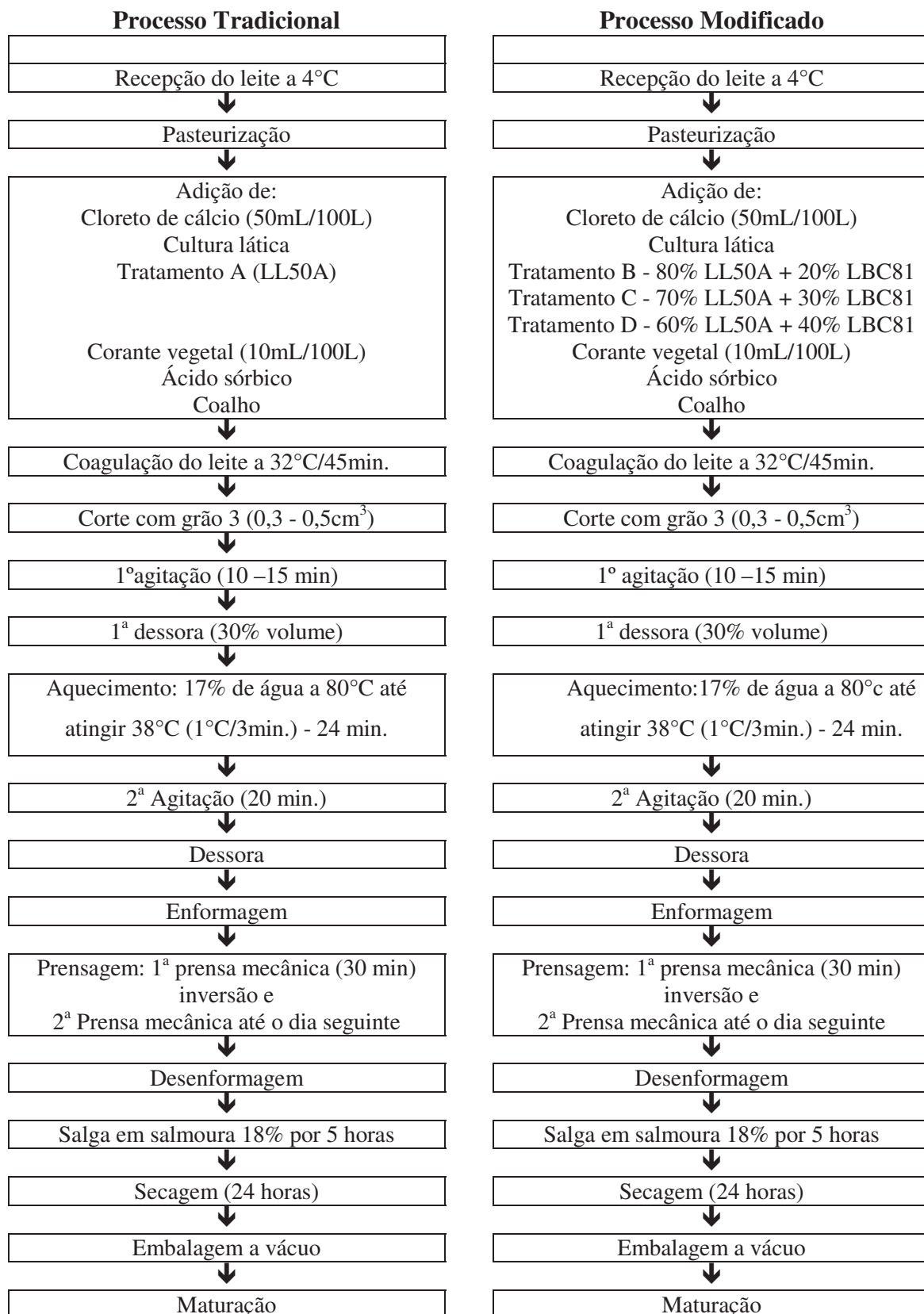


Figura 2 - Fluxograma de fabricação do queijo Prato obtido através dos processos tradicional e modificado.

4.2.4 - Caracterização físico-química dos queijos controle e modificados

As análises físicas e químicas dos queijos foram realizadas em triplicata após 1, 15, 30, 45 e 60 dias de fabricação, de acordo com os métodos descritos a seguir: O teor de sal foi determinado pelo método de doseamento nas cinzas de acordo com Silva, P.H.F. et al. (1997). A porcentagem de gordura (G) foi determinada pelo método de Gerber–Van Gulik (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). O teor do extrato seco total (EST) foi determinado 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 no extrato seco (GES) foi calculado pela fórmula: $\%GES = G/EST \times 100$. O teor de nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método de micro - Kjeldahl. O teor de proteína total foi calculado multiplicando-se o valor do nitrogênio total por 6,38 (AOAC, 1997). O teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 ou nitrogênio não caseíco (NNC) dos queijos foi determinado pela dosagem do nitrogênio total no filtrado obtido após precipitação isoelétrica das caseínas (SILVA, P.H.F. et al., 1997). O teor de nitrogênio não protéico (NNP) ou solúvel em TCA 12% foi determinado pela dosagem de nitrogênio total no filtrado obtido após precipitação da totalidade das proteínas em presença do ácido tricloroacético a 12% (SILVA, P.H.F. et al., 1997). O índice de extensão da maturação (IEM) foi obtido pela relação entre os teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e nitrogênio total (WOLFSCHOON-POMBO, 1983). A extensão da maturação se caracteriza pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis acumuladas durante o processo e é expressa como porcentagem do nitrogênio total: $\%IEM = NNC/NT \times 100$. O índice de profundidade de maturação (IPM) foi obtido pela relação entre os teores de nitrogênio solúvel em TCA 12% e nitrogênio total (WOLFSCHOON-POMBO, 1983). A profundidade da maturação

abrange as substâncias nitrogenadas de baixo peso molecular acumuladas durante o processo. $\%IPM = NNP/NT \times 100$. O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla à 550°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). A atividade de água dos queijos (a_w) foi determinada pelo método descrito por Van Dender et al. (1995). Os teores de tirosina e triptofano foram determinados na fração obtida por precipitação isoelétrica das caseínas (nitrogênio solúvel em pH 4,6), seguindo-se o método espectrofotométrico descrito por Vakaleris e Price (1959). A leitura espectrofotométrica foi efetuada nos comprimentos de onda 270 e 290 nm, e as concentrações de tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) foram determinadas usando-se as equações:

- 1) Tyr (mM/L) = $(0,95 \times A_{270} - 1,31 \times A_{290}) \times 2$ e Tyr (mg/100g queijo) = mM/L x 453;
- 2) Trp (mM/L) = $(0,307 \times A_{290} - 0,020 \times A_{270}) \times 2$ e Trp (mg/100g queijo) = mM/L x 510,5.

4.2.5 - Caracterização dos parâmetros de cor

As mudanças nos parâmetros de cor (L, a^* e b^* da escala CIELab) foram obtidas para luz padrão D65 e observação a 10°, em triplicata, utilizando-se o aparelho portátil da HunterLab, aos 30 e 60 dias de maturação (HARTE et al., 2003).

4.2.6 - Caracterização do perfil de textura

A textura dos queijos (tradicional e modificados) foi avaliada após 30 dias de maturação utilizando-se o texturômetro TA-XT2 Stable Micro Systems. As amostras de queijo foram cortadas em formato cilíndrico, com 2,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de altura. O procedimento adotado foi o de dupla compressão, utilizando-se um cilindro de acrílico (probe) de 4,5 cm de diâmetro, com velocidade de deslocamento de 2,0 mm/s e distância percorrida de 6,0 mm. (GONZÁLEZ et al., 1998). O software do equipamento fornece os seguintes parâmetros do perfil de textura: dureza, elasticidade,

fraturabilidade, adesividade, gomosidade, coesividade, mastigabilidade e resiliência.

4.2.7 - Caracterização do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (Uréia – Page)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada nas amostras de queijo tipo Prato controle e modificados após 1, 15, 30, 45 e 60 dias para obtenção do perfil das frações de caseína usando o método descrito por Shalabi e Fox (1987). Todas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido a -196°C, até o momento da análise.

4.2.8 - Identificação dos compostos voláteis por cromatografia

Todas as análises cromatográficas foram efetuadas em um cromatógrafo Shimadzu GC 17-A, equipado com detector de massas Shimadzu QP-5050A operando com impacto eletrônico de 70 eV, com o monitoramento em modo scan na faixa de 40 a 350 m/z. A coluna cromatográfica capilar utilizada de fase polar (polietilenoglicol reticulada) foi uma HP-FFAP (50 m x 0,20 mm x 0,33 µm espessura do filme). Empregou-se a seguinte programação de temperatura para o forno: 60°C/1min., taxa de aquecimento: 20°C/min., temperatura final: 220°C/21min., temperatura do injetor e detector: 250°C. O tempo total de cada corrida foi 30 min. O gás de arraste empregado foi He com fluxo de 1,5 mL/min., com injeção splitless.

O acompanhamento dos compostos voláteis foi feito após 1 e 60 dias de maturação. Uma alíquota de 1,0g da amostra foi transferida para um frasco de vidro de 10 mL com tampa de borracha, o qual foi mantido em bloco de aquecimento eletrônico a uma temperatura de 40°C por 1 h, para atingir o equilíbrio. Posteriormente, foi inserida no frasco a fibra de micro-extração em fase sólida (SPME) constituída de

Carboxen/polidimetilsiloxano (Supelco) durante 15 min. Os compostos voláteis foram retidos na fibra, a qual foi injetada no cromatógrafo gasoso.

4.2.9 - Caracterização da microestrutura em microscópio eletrônico de transmissão – TEM

Aos 30 e 60 dias as amostras de queijo foram coletadas e congeladas a -18°C até o momento da análise. Após a coleta das amostras, os fragmentos de aproximadamente 1 mm^3 foram fixados em glutaraldeído 3 % em tampão fosfato 0,1 Molar e pH de 7,2. Em seguida, o material foi lavado duas vezes por 10 minutos em tampão fosfato na concentração de 0,1 Molar e pH de 7,2 e pós-fixado por 1 hora em tetróxido de ósmio a 1% e meia hora em tetróxido de ósmio a 1% adicionado de ferrocianeto de potássio a 1,25% (BOZZOLA; RUSSEL, 1999).

Os fragmentos foram lavados em água, desidratados em série alcoólica crescente (50%, 70%, 85%, 90%, 95%, 100%) cinco minutos em cada concentração. Posteriormente passaram por três banhos com óxido de propileno a 100%, para retirada de todo o álcool impregnado nas amostras (BOZZOLA; RUSSEL, 1999).

Finalmente, os cubos foram incluídos em resina Epon para posteriormente serem cortados em ultramicrotomo para obtenção de cortes ultrafinos (60 nm). Os cortes foram contrastados com acetato de uranila 4% e citrato de chumbo. As secções foram examinadas sob microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-109 (BOZZOLA; RUSSEL, 1999).

Além das análises citadas acima, também foram realizadas análises para avaliação sensorial, capacidade de derretimento e microbiológicas para a contagem das culturas lácticas adicionadas, e os resultados estão contidos em projetos de iniciação científica de alunas de graduação.

4.3 - Análise estatística dos resultados experimentais

A análise de variância (ANOVA) dos resultados experimentais foi realizada a partir de um delineamento em blocos casualizados (DBC) num esquema fatorial 4x5, sendo quatro o número de tratamentos e cinco os tempos de avaliações, a partir do teste de Tukey, considerando-se um nível de significância $p < 0,05$, utilizando o programa computacional STAT 2.0. (UNESP-FCAV).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Caracterização dos leites empregados na fabricação dos queijos

A Tabela 1 mostra a composição média dos leites utilizados para a fabricação dos queijos, após a padronização e mistura dos leites desnatado e integral.

Tabela 1 – Avaliação da qualidade do leite pasteurizado tipo A utilizado para a preparação dos queijos, conforme os tratamentos A, B, C e D.

Análises	Valores médios			
	Tratamento A	Tratamento B	Tratamento C	Tratamento D
Densidade (g/mL)	1,032±0,000	1,032±0,000	1,032±0,000	1,031±0,000
Gordura (%)	1,5±0,1	1,5±0,1	1,2±0,0	1,6±0,0
Sólidos Totais (%)	10,05±0,00	10,06±0,00	9,75±0,00	9,93±0,00
Acidez (°Dornic)	16,34±0,21	15,85±0,11	16,74±0,22	16,27±0,12
Crioscopia (°H)	-0,526±0,000	- 0,525±0,000	-0,521±0,000	-0,526±0,000
Presença de antibiótico	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

A densidade média dos leites A, B e C foi 1,032g/mL e a do leite D 1,031g/mL. Segundo Brito et al. (2006), a densidade do leite é em média 1,032g/mL, podendo variar entre 1,023 e 1,040g/mL.

Após a mistura do leite desnatado e integral, os leites A, B, C e D padronizados apresentaram porcentagens de gordura de 1,5, 1,5, 1,2 e 1,6%, respectivamente. Katsuda et al. (1999) utilizaram um leite com 1,7% de gordura para fabricação de queijo Prato

com baixo teor de gordura. De acordo com Brasil (2002), leites que possuem porcentagens de gordura entre 0,6 e 2,9% podem ser classificados em semi-desnatados.

O menor teor de sólidos totais foi observado no leite C (9,75%) e o maior no leite B (10,06%). O leite é uma combinação de diversos elementos sólidos em água. Os elementos sólidos representam aproximadamente 12 a 13% do leite e a água, aproximadamente 87%. Os principais elementos sólidos do leite são lipídios (gordura), carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas. Esses elementos, suas distribuições e interações são determinantes para a estrutura, propriedades funcionais e aptidão do leite para processamento (BRITO et al., 2006).

Os teores de acidez das amostras de leite pasteurizado variaram de 15,85 a 16,74°D, semelhante ao observado por Cichoscki et al. (2002), que utilizaram leite com acidez de 17,90°D na elaboração de queijo Prato. A determinação da acidez do leite é uma das medidas mais usadas no controle da matéria-prima pela indústria leiteira. O teste é usado para classificar o leite e também como um guia para controle da manufatura de produtos como o queijo (BRITO et al., 2006).

O ponto de congelamento das amostras de leites esteve compreendido entre -0,521 e -0,526°H, superiores a -0,530°H, valor estabelecido como limite pela legislação brasileira (BRASIL, 2002). Embora o ponto crioscópico seja um parâmetro relativamente constante, existem fatores que, ao agirem, isoladamente ou associados, podem interferir no ponto de congelamento do leite produzido. Segundo Tronco (2003), fatores como raça do animal, estágio de lactação, período de ordenha, alimentação, deficiência de minerais, ingestão elevada de água antes e após ordenha bem como região de produção e clima podem alterar o ponto crioscópico do leite.

O teste utilizado não detectou resíduo de antibiótico no leite utilizado para fabricação dos queijos. Tal teste é enzimático e detecta os Beta-lactâmicos por receptor específico, no qual os antibióticos são capturados por uma proteína em um suporte plástico (BRITO, 1998).

A presença dessas substâncias é um fator de risco para o consumidor, podendo causar alergia, resistência bacteriana e até mesmo choques anafiláticos em indivíduos susceptíveis (BORGES et al., 2000). Além disso, considera-se indesejável a presença de resíduos de antimicrobianos na elaboração de queijos e leites fermentados em função de sua interferência no crescimento dos cultivos iniciadores (VARNAN; SUTHERLAND, 1994).

5.2 - Rendimento dos queijos

Para cada tratamento foram obtidos cinco queijos, cujas massas totalizaram 1802,01g de queijo, 1862,63g de queijo, 1722,08 g de queijo e 2106,13 g de queijo para os processos A, B, C e D, respectivamente, representando rendimentos de 13,87 L de leite por kg de queijo para o tratamento A, 13,42 L de leite por kg de queijo para o tratamento B, 14,52 L de leite por kg de queijo para o tratamento C e 11,87 L de leite por kg de queijo para o tratamento D. De acordo com Costa Júnior e Pinheiro (1998), o rendimento normal para queijo Prato tradicional é de 9 a 9,5 litros de leite/kg de queijo. Assim, observa-se, em todos os tratamentos, pela redução no teor de gordura, rendimento abaixo do queijo tradicional.

5.3 - Caracterização físico-química e evolução da maturação do queijo submetido ao tratamento A

A Tabela 2 apresenta a caracterização físico-química e evolução da maturação do queijo Prato preparado conforme o tratamento A (controle), sem adição de *Lactobacillus casei*.

As médias dos teores de sólidos totais variaram de 54,31 a 57,29%. Houve diferença significativa entre o queijo com 1 dia de maturação e os demais. A falta de homogeneidade na drenagem do soro, prensagem e salga podem contribuir para esta variação. Há uma dificuldade de se obter uma prensagem uniforme, resultando em variações no teor de sólidos totais. O queijo colocado na parte inferior da prensa geralmente é mais desidratado, pois sofre maior pressão devido à coluna de queijos. Mesmo fazendo a inversão para a segunda prensagem, a maior parte do soro é drenada nos momentos iniciais da prensagem (OLIVEIRA, 1986).

A acidez dos queijos aumentou até o 45º dia de maturação diminuindo ligeiramente no último dia de análise. A diminuição de acidez no final da maturação pode ser atribuída a efeitos combinados como a utilização de ácido láctico, formação de produtos de decomposição não-ácidos e liberação de produtos alcalinos provenientes da degradação protéica (O' KEEFFEE; FOX; DALY, 1975).

O teor médio de gordura dos queijos variou entre 18,5 e 19,5%, o qual refletiu em porcentagens de GES entre 31,8 e 34,2%. Segundo Brasil (1996) queijos com GES entre 25,0 e 44,9% podem ser classificados em semi-gordos.

O conteúdo de cinzas do queijo teve variação significativa de 4,56 a 4,10% no primeiro e último dia de maturação, respectivamente, semelhantes aos observados por

Tabela 2 - Caracterização físico-química e evolução da maturação do queijo Prato submetido ao tratamento A durante 60 dias.

Análises	1 dia	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Sólidos Totais %	54,31 ^b ±0,15	56,56 ^a ±0,07	57,07 ^a ±0,66	57,29 ^a ±0,07	56,74 ^a ±0,05
Acidez %	0,60 ^c ±0,00	1,00 ^c ±0,00	1,20 ^b ±0,00	1,40 ^a ±0,00	0,90 ^d ±0,00
Gordura %	18,5±0,0	18,0±0,0	19,5±0,0	19,0±0,0	19,0±0,0
GES %	34,1 ^a ±0,1	31,8 ^c ±0,0	34,2 ^a ±0,4	33,2 ^b ±0,0	33,5 ^b ±0,0
Cinzas %	4,56 ^c ±0,05	4,38 ^b ±0,07	4,25 ^c ±0,01	4,19 ^d ±0,03	4,10 ^d ±0,02
Nitrogênio %	4,48 ^c ±0,00	4,65 ^b ±0,02	4,69 ^b ±0,02	4,77 ^a ±0,03	4,67 ^b ±0,03
Proteína total %	28,00 ^c ±0,01	29,05 ^b ±0,14	29,33 ^b ±0,13	29,80 ^a ±0,17	29,17 ^b ±0,16
NS pH 4,6 %	0,16 ^d ±0,00	0,35 ^c ±0,00	0,43 ^b ±0,01	0,57 ^a ±0,01	0,56 ^a ±0,01
NS TCA %	0,11 ^d ±0,01	0,24 ^c ±0,00	0,32 ^b ±0,00	0,44 ^a ±0,00	0,42 ^a ±0,00
Tirosina mg/100g de queijo	226,60 ^d ±1,76	276,13 ^b ±1,37	260,81 ^c ±0,86	273,17 ^b ±0,61	349,50 ^a ±0,19
Triptofano mg/100g de queijo	35,33 ^d ±0,85	27,21 ^e ±0,36	64,56 ^b ±0,02	50,20 ^c ±0,17	72,53 ^a ±0,17
Sal %	0,73 ^a ±0,00	0,73 ^a ±0,02	0,66 ^b ±0,01	0,54 ^d ±0,01	0,59 ^c ±0,03
Aw	0,960 ^a ±0,000	0,960 ^a ±0,000	0,970 ^a ±0,000	0,970 ^a ±0,000	0,970 ^a ±0,000
IEM %	3,56 ^d ±0,10	7,59 ^c ±0,05	9,17 ^b ±0,27	12,00 ^a ±0,22	11,94 ^a ±0,22
IPM %	2,42 ^c ±0,14	5,11 ^d ±0,05	6,85 ^c ±0,10	9,15 ^a ±0,11	9,09 ^b ±0,11

^{abcde} Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade. NS pH 4,6 – nitrogênio solúvel em pH 4,6; NS TCA – nitrogênio solúvel em TCA 12%; Aw – atividade de água; IEM – índice de extensão da maturação; IPM – índice de profundidade da maturação.

Leite, Pitarello e Penna (2002) que obtiveram valores de 3,25 a 4,94% para queijos de nove diferentes marcas comerciais.

O conteúdo de proteína variou de 28,00 a 29,80%. Silva, et al. (2005) obtiveram valores de proteína ligeiramente inferiores aos encontrados neste trabalho, variando de 28,11 a 28,75%.

Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (nitrogênio não-caséico) e NS em TCA (nitrogênio não-protéico) apresentaram aumento significativo com o decorrer da maturação, até o 45º dia, após esse período, esses valores permaneceram constantes. Silva et al. (2005) observaram o aumento significativo desses dois parâmetros em queijo Prato durante 60 dias de maturação.

O comportamento dos aminoácidos tirosina e triptofano ao longo da maturação foi semelhante. Nos dois parâmetros, houve oscilação significativa, com decréscimos e elevações dos teores, mas como efeito total, observou-se um aumento desses aminoácidos ao final da maturação. Essas oscilações podem ser explicadas pelas reações de desaminação, transaminação e descarboxilação, nas quais os aminoácidos livres são hidrolisados, originando aminas, aldeídos, álcoois, ácidos graxos que são compostos responsáveis pelo desenvolvimento de sabor no queijo (NABUCO; MORETTI; PENNA, 2004).

O conteúdo de sal variou significativamente durante a maturação, sendo 0,54 o menor valor encontrado e 0,73% o maior. Esses valores diferem da faixa de variação encontrada por Cichoscki et al. (2002) que obtiveram porcentagens de 0,86 a 1,10% para queijo Prato durante 60 dias de maturação. Diferenças na homogeneidade de distribuição do sal durante a salmoura e variações na drenagem do soro durante a prensagem podem contribuir para ocorrência dessa variação.

A atividade de água variou significativamente entre 0,960 e 0,970. Este parâmetro é influenciado inversamente pelo teor de sal e pela profundidade da maturação e proporcionalmente pelo teor de umidade (COSTA et al., 2004).

Os índices de extensão (IEM) e profundidade da maturação (IPM) aumentaram gradativamente até aos 45 dias. Aos 60 dias o IEM não apresentou diferença significativa (11,94%), e o IPM apresentou um pequeno decréscimo, (9,09%). Baldini et al. (1998) observaram mudanças de 6,84 a 13,89% para IEM e 2,7 a 7,26% para IPM em queijo Prato no decorrer de 40 dias de maturação.

5.4 - Caracterização físico-química e evolução da maturação do queijo submetido ao tratamento B

A Tabela 3 apresenta a caracterização físico-química e evolução da maturação do queijo Prato preparado conforme o tratamento B, com adição de 20% de *Lactobacillus casei*.

A porcentagem de acidez apresentou elevação contínua durante a maturação, variando de 0,95 a 1,65%. Este aumento é de grande importância para a regulação das reações que ocorrem durante a maturação, e é resultado da conversão da lactose em ácido láctico pelas bactérias presentes na cultura láctica. A elevação da acidez pode também estar relacionada com o número elevado de bactérias NSLAB presentes no queijo (MORENO et al., 2002).

A porcentagem de gordura dos queijos variou significativamente entre 15,8 a 17,0%. Estes resultados contrastam com a média encontrada por Katsuda et al. (1999), de 18,6%. Tal fato pode estar relacionado ao teor de gordura do leite de fabricação do queijo que foi 1,5% no primeiro caso e 1,7% no segundo.

Tabela 3 - Caracterização físico-química e evolução da maturação do queijo Prato submetido ao tratamento B durante 60 dias.

Análises	1dia	15dias	30dias	45dias	60dias
Sólidos totais %	51,11 ^{ab} ±0,17	51,27 ^a ±0,32	50,67 ^b ±0,16	50,98 ^{ab} ±0,13	51,25 ^a ±0,15
Acidez %	0,95 ^d ±0,01	1,02 ^c ±0,01	1,07 ^c ± 0,05	1,53 ^b ±0,03	1,65 ^a ±0,06
Gordura %	17,0 ^a ± 0,0	16,5 ^{ab} ±0,5	16,2 ^{ab} ±0,3	15,8 ^b ± 0,3	16,2 ^{ab} ±0,3
GES %	33,3 ^a ±0,1	32,2 ^{ab} ±1,2	31,9 ^{ab} ±0,7	31,1 ^b ± 0,6	31,6 ^{ab} ±0,6
Cinzas %	4,30 ^b ± 0,04	4,01 ^c ± 0,01	4,29 ^b ±0,01	4,49 ^a ±0,05	4,24 ^b ±0,03
Nitrogênio %	4,24 ^b ±0,07	4,72 ^a ±0,02	4,26 ^b ±0,07	4,70 ^a ±0,06	4,77 ^a ±0,03
Proteína total %	26,48 ^b ±0,44	29,49 ^a ±0,10	26,62 ^b ±0,47	29,39 ^a ±0,40	29,82 ^a ±0,20
NS pH 4,6 %	0,16 ^e ±0,00	0,37 ^d ±0,02	0,45 ^c ±0,00	0,61 ^b ± 0,02	0,76 ^a ±0,05
NS TCA %	0,10 ^e ±0,00	0,25 ^d ±0,01	0,31 ^c ±0,00	0,42 ^b ± 0,00	0,57 ^a ±0,01
Tirosina mg/100g de queijo	213,02 ^e ±0,77	237,66 ^d ±0,76	251,31 ^c ±0,43	267,10 ^b ± 0,80	294,79 ^e ±1,06
Triptofano mg/100g de queijo	43,25 ^e ±0,34	51,23 ^d ±0,34	55,28 ^c ±0,16	74,97 ^a ±0,30	64,90 ^b ±0,30
Sal %	0,86 ^a ±0,01	0,76 ^c ±0,03	0,77 ^{bc} ±0,01	0,88 ^a ±0,01	0,81 ^b ±0,00
Aw	0,957 ^c ±0,000	0,963 ^a ±0,000	0,961 ^b ± 0,000	0,952 ^c ±0,000	0,952 ^d ± 0,000
IEM %	3,77 ^e ±0,03	7,82 ^d ±0,52	10,58 ^c ±0,11	12,90 ^b ±0,30	15,88 ^a ±1,18
IPM %	2,32 ^c ±0,08	5,31 ^d ±0,24	7,33 ^c ±0,17	8,94 ^b ±0,19	11,89 ^a ±0,32

^{abcde} Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade. NS pH 4,6 – nitrogênio solúvel em pH 4,6; NS TCA – nitrogênio solúvel em TCA 12%; Aw – atividade de água; IEM – índice de extensão da maturação; IPM – índice de profundidade da maturação.

O conteúdo de cinzas oscilou de 4,01 a 4,49% nos queijos com 15 e 45 dias de maturação, respectivamente, entretanto Vechia et al. (2005) obtiveram resultados entre 2,76 e 3,63% em queijo Prato adicionado de *Bifidobacterium lactis*, valores bem inferiores aos obtidos experimentalmente.

Os teores de NS pH 4,6 e NS TCA aumentaram gradativamente com o decorrer da maturação, de 0,16 a 0,76% e de 0,10 a 0,57%, respectivamente. A quebra das proteínas durante a maturação é responsável pelo aumento dos teores de nitrogênio solúvel (NS), nitrogênio não-protéico e NH_3 , e portanto, dos índices de extensão e profundidade da maturação, os quais são calculados a partir das proporções de NS e NNP em relação ao nitrogênio total (NT).

O aminoácido tirosina também teve seus valores elevados com o decorrer do tempo de maturação, uma vez que os teores de tirosina normalmente apresentam a mesma tendência daqueles dos índices de extensão e profundidade da maturação em queijos (PEROTTI et al., 2004).

No que diz respeito ao triptofano, seus teores aumentaram até o 45 dias, diminuindo aos 60 dias. De acordo com Vakaleris e Price (1959), o triptofano pode ser decomposto por processos enzimáticos.

O queijo apresentou quantidades de sal variando de 0,76 a 0,86%, similares ao encontrado por Minussi, Furtado e Mosquim (1995), que obtiveram 0,75% de sal no queijo Prato. Diversos fatores influenciam na absorção de sal do queijo, tais como: concentração de NaCl, teor de cálcio, temperatura e pH da salmoura, tempo de salga, tamanho, pH, teor de umidade e de gordura do queijo (FURTADO, 1991).

A atividade de água oscilou de 0,952 a 0,963. Estas porcentagens estão de acordo com a variação encontrada por Cichosck et al. (2002), que observaram valores entre 0,946 a 0,983.

No tratamento B foi utilizada uma cultura composta por 80% de *Lactococcus lactis ssp lactis* e *Lactococcus lactis ssp cremoris* e 20% *Lactobacillus casei*. Observou-se aceleração da maturação pela degradação dos compostos nitrogenados com a adição do *Lactobacillus casei*, indicando maior atuação da cultura e a produção de maior teor de ácido láctico.

5.5 - Caracterização físico-química e evolução da maturação do queijo submetido ao tratamento C

A caracterização físico-química e evolução da maturação do queijo Prato elaborado conforme o tratamento C, com adição de 30% de cultura de *Lactobacillus casei* está apresentada na Tabela 4.

O teor de sólidos totais variou de 54,91 a 56,63%. Resultados entre 56,83 e 58,08% foram observados por Moretti, Nabuco e Penna (2004) para queijo Prato integral preparado em laboratório. A variação de extrato seco total para este queijo foi muito pequena, mesmo que estatisticamente os queijos com 1 e 60 dias de maturação apresentem diferenças significativas em relação aos queijos com 15, 30 e 45 dias para este parâmetro, pode-se dizer que a variação de umidade durante a maturação foi inexpressível. O teor de extrato seco apresentou seu maior valor com quarenta e cinco dias da data de fabricação. Esta variação no teor de extrato seco total pode estar relacionada a pequenas variações no lote de queijo produzido, por diferença durante a prensagem.

Tabela 4 - Caracterização físico-química e evolução da maturação do queijo Prato submetido ao tratamento C durante 60 dias.

Análises	1dia	15dias	30dias	45dias	60dias
Sólidos totais %	55,44 ^b ±0,20	56,27 ^a ±0,03	56,23 ^a ±0,17	56,63 ^a ±0,19	54,91 ^c ±0,28
Acidez %	0,52 ^d ±0,02	0,89 ^c ±0,02	1,00 ^c ±0,01	1,63 ^b ±0,01	1,95 ^a ± 0,09
Gordura %	16,5 ^a ±0,5	16,5 ^a ±0,5	15,5 ^b ±0,0	15,5 ^b ±0,0	15,2 ^b ± 0,3
GES %	29,8 ^a ±1,0	26,0 ^c ±0,8	27,6 ^{bc} ±0,1	28,2 ^{ab} ±0,1	27,6 ^{bc} ±0,5
Cinzas %	4,74 ^b ±0,01	5,09 ^a ±0,03	4,37 ^d ±0,04	4,25 ^c ±0,05	4,52 ^c ±0,04
Nitrogênio %	5,11 ^{ab} ±0,04	4,86 ^b ±0,22	5,15 ^{ab} ±0,04	5,06 ^{ab} ±0,03	5,17 ^a ± 0,07
Proteína total %	31,94 ^a ±0,27	30,41 ^a ±1,38	32,16 ^a ±0,27	31,61 ^a ±0,20	32,32 ^a ±0,46
NS pH 4,6 %	0,17 ^c ± 0,00	0,36 ^d ±0,00	0,60 ^c ±0,00	0,72 ^b ±0,00	1,00 ^a ±0,02
NS TCA %	0,10 ^c ±0,00	0,27 ^d ±0,00	0,44 ^c ±0,00	0,55 ^b ±0,00	0,79 ^a ±0,00
Tirosina mg/100g de queijo	267,03 ^c ±0,88	283,29 ^d ±0,62	359,63 ^b ±1,87	388,67 ^a ±1,49	346,71 ^c ±1,05
Triptofano mg/100g de queijo	74,78 ^c ±0,17	52,14 ^d ±0,31	39,78 ^e ±0,37	76,32 ^b ±0,29	83,35 ^a ±0,47
Sal %	0,83 ^b ±0,01	0,87 ^a ±0,01	0,52 ^c ±0,02	0,57 ^d ±0,01	0,75 ^c ±0,01
Aw	0,967 ^b ±0,000	0,954 ^c ±0,000	0,968 ^a ±0,000	0,958 ^c ±0,000	0,957 ^d ±0,000
IEM %	3,25 ^c ±0,12	7,48 ^d ±0,34	11,68 ^c ±0,07	14,27 ^b ±0,13	19,30 ^a ± 0,40
IPM %	2,01 ^c ±0,10	5,61 ^d ±0,34	8,62 ^c ±0,07	10,91 ^b ±0,08	15,22 ^a ± 0,27

^{abcde} Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade. NS pH 4,6 – nitrogênio solúvel em pH 4,6; NS TCA – nitrogênio solúvel em TCA 12%; Aw – atividade de água; IEM – índice de extensão da maturação; IPM – índice de profundidade da maturação.

Como os queijos foram prensados de maneira coletiva (um queijo sobre o(s) outro(s) e sobre eles um peso de metal), o queijo que fica na parte inferior da prensa recebe maior prensagem. Para tentar minimizar essa diferença os queijos são invertidos de posição depois de meia hora de permanência na prensa, porém apenas essa atitude não é suficiente para tornar a prensagem uniforme para todos os queijos.

A acidez oscilou de maneira significativa entre 0,52 a 1,95%, sendo o menor valor encontrado no início do período de maturação e o maior após dois meses. A fermentação das bactérias lácticas adicionadas no processo tecnológico promove aumento de acidez, o qual é importante para favorecer a drenagem do soro, regular o teor final de minerais e preparar a coalhada para maturação (COSTA; LOBATO, 2004).

De acordo com Oliveira (1986), possíveis alterações no tempo de prensagem, a qual é usualmente efetuada em temperatura ambiente, afetam a acidificação ou acidez dos queijos, modificando significativamente as características da massa e conseqüentemente alterando a qualidade final dos mesmos. Desta forma, para se obter queijos de qualidade constante, as condições ambientais e o tempo da prensagem devem ser mais constantes possíveis.

O queijo apresentou o teor de cinzas variando de 4,25 a 5,09%. Katsuda et al. (1999) obtiveram médias de 4,67% e 4,65% para queijo Prato com teor integral e reduzido de gordura, respectivamente.

O teor de nitrogênio solúvel em pH 4,6 variou de 0,17 a 1,00% e o teor de nitrogênio solúvel em TCA de 0,10 a 0,79%, com aumento significativo durante o período analisado. As modificações nas frações nitrogenadas, como nitrogênio não-protéico e nitrogênio solúvel, apresentam elevação gradual como resultado da atividade proteolítica sobre as proteínas do queijo (PACIULLI et al., 1999).

Aos 60 dias de maturação os teores dos aminoácidos tirosina e triptofano foram maiores quando comparados aos queijos no início da maturação. A liberação dos aminoácidos tirosina e triptofano é uma consequência da ação das enzimas do coalho e da cultura (FOX, 1991). A presença do anel benzênico na estrutura desses aminoácidos e sua capacidade de determinação espectrofotométrica tornam sua quantificação um método simples e eficiente na determinação do índice de proteólise em queijos (PEROTTI et al., 2004).

O teor de sal variou de forma significativa entre os queijos, de 0,52 a 0,87%, inferiores aos observados por Moreno et al. (2002), que encontraram valores entre 0,94 e 1,88%. A proteólise e lipólise são fenômenos regulados por enzimas ativadas quando o teor de sal está normal (0,5 a 2,5% m/m em geral) e inibidos em teores excessivamente elevados (FURTADO, 1991).

A atividade de água dos queijos variou de 0,954 a 0,968 de forma significativa. Estes valores encontram-se de acordo com o requerimento mínimo de A_w apresentado pelas bactérias lácticas, que é de 0,930 a 0,960 dependendo da espécie (BERESFORD et al., 1991).

Neste queijo a proteólise aumentou com o decorrer da maturação, o que pode ser observado pelos valores sempre crescentes dos índices de maturação. No primeiro dia o queijo apresentou 3,25% de IEM e 2,01% de IPM, enquanto no final do período de maturação esses valores aumentaram para 19,30 e 15,22%, respectivamente. Esses valores foram superiores aos observados nos queijos do processamento B, para o mesmo período.

No tratamento C foi utilizada uma cultura láctica composta por 70% de *Lactococcus lactis ssp lactis* e *Lactococcus lactis ssp cremoris* e 30% de *Lactobacillus*

casei, demonstrando que o uso de maior concentração de *Lactobacillus casei* favoreceu a proteólise pela maior degradação da caseína e formação de peptídeos de baixo e médio peso molecular.

5.6 - Caracterização físico-química e evolução da maturação do queijo submetido ao tratamento D

A Tabela 5 mostra os resultados das análises realizadas para a caracterização físico-química e evolução da maturação do queijo Prato elaborado conforme o tratamento D, com adição de 40% de cultura de *Lactobacillus casei*.

Houve variação significativa na porcentagem de sólidos totais, que oscilou de 53,45 a 55,47%, inferiores aos observados por Barros et al. (2006), que utilizaram *Lactobacillus helveticus* como cultura adjunta na manufatura de queijos Prato “light”, e obtiveram valores entre 44,74 e 47,53%. Esta variação pode estar relacionada com a matéria-prima e o processo tecnológico utilizados.

A porcentagem de gordura dos queijos ficou entre 19,0 e 19,3%, apesar disso, essa diferença não foi significativa. Considerando que o queijo Prato integral possui em média 27,0% de gordura, a redução desse nutriente foi de aproximadamente 30%, o que permite classificar tais queijos como “light” (BRASIL,1998).

O teor de cinzas dos queijos com 1 dia de maturação apresentou-se ligeiramente superior aos observados nos demais períodos, provavelmente pela variação no teor de umidade entre os processos. A cinza de um alimento é o resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, que é transformada em CO₂, H₂O e NO₂.

Tabela 5 - Caracterização físico-química e evolução da maturação do queijo Prato submetido ao tratamento D durante 60 dias.

Análises	1 dia	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Sólidos totais %	53,46 ^b ±0,07	55,47 ^a ±0,05	55,19 ^a ±0,25	55,03 ^a ±0,38	53,45 ^b ±0,08
Acidez %	1,07 ^c ±0,00	0,96 ^d ±0,01	1,58 ^b ±0,05	1,60 ^b ±0,05	1,89 ^a ±0,05
Gordura %	19,0 ^a ±0,0	19,3 ^a ±0,3	19,0 ^a ±0,0	19,0 ^a ±0,0	19,0 ^a ±0,0
GES %	33,7 ^c ±0,0	34,8 ^{ab} ±0,5	34,4 ^b ±0,1	34,5 ^b ±0,2	35,5 ^a ±0,1
Cinzas %	4,52 ^a ±0,04	4,25 ^b ±0,04	4,32 ^b ±0,04	4,32 ^b ±0,02	4,37 ^b ±0,09
Nitrogênio %	4,34 ^b ±0,02	4,62 ^a ±0,07	4,35 ^b ±0,04	4,38 ^b ±0,01	4,31 ^b ±0,06
Proteína total %	27,14 ^b ±0,15	28,86 ^a ±0,42	27,21 ^b ±0,26	27,41 ^b ±0,09	26,91 ^b ±0,39
NS pH 4.6 %	0,17 ^c ±0,00	0,33 ^d ±0,00	0,45 ^c ±0,01	0,59 ^b ±0,00	0,69 ^a ±0,00
NS TCA %	0,10 ^c ±0,00	0,24 ^d ±0,00	0,32 ^c ±0,00	0,42 ^b ±0,00	0,51 ^a ±0,00
Tirosina mg/100g de queijo	251,84 ^b ±2,36	238,32 ^c ±2,19	288,68 ^a ±0,50	285,21 ^a ±0,19	251,12 ^b ±0,68
Triptofano mg/100g de queijo	46,19 ^c ±0,97	32,57 ^d ±1,07	30,24 ^c ±0,01	56,95 ^b ±0,17	71,26 ^a ±0,18
Sal %	0,78 ^a ±0,02	0,83 ^b ±0,02	0,76 ^c ±0,01	0,78 ^b ±0,02	0,74 ^c ±0,01
Aw	0,961 ^b ±0,000	0,971 ^a ±0,000	0,960 ^b ±0,000	0,957 ^b ±0,000	0,962 ^b ±0,000
IEM %	4,04 ^c ±0,06	7,19 ^d ±0,13	10,45 ^c ±0,16	13,40 ^b ±0,13	16,00 ^a ±0,27
IPM %	2,29 ^c ±0,04	5,25 ^d ±0,017	7,33 ^c ±0,12	9,66 ^b ±0,07	11,77 ^a ±0,14

^{abcde} Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade. NS pH 4,6 – nitrogênio solúvel em pH 4,6; NS TCA – nitrogênio solúvel em TCA 12%; Aw – atividade de água; IEM – índice de extensão da maturação; IPM – índice de profundidade da maturação.

A cinza é constituída principalmente de grandes quantidades de K, Na, Ca e Mg, pequenas quantidades de Al, Fe, Cu, Mn, Zn e traços de Ar, I, F e outros elementos (CECCHI, 1999).

Em relação à proteína total presente no queijo, esta apresentou variação de 26,91 a 28,86%. Katsuda et al. (1999), analisando este parâmetro, observou resultados similares com uma média de 27,85%.

O teor de NS pH 4,6 variou de 0,17 a 0,69%, com aumento significativo durante toda maturação. Este aumento é um bom indicador da atividade proteolítica devido à ação do agente coagulante, onde são determinados os peptídeos de peso molecular alto e médio provenientes das α e β -caseínas, podendo também estar incluídos peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos (CHRISTENSEN et al., 1991; FARKYE et al., 1990). Assim como o NS pH 4,6, o teor NS em TCA aumentou significativamente de 0,10 a 0,51% com o aumento do tempo de maturação.

O teor de sal dos queijos variou de 0,74 a 0,83%. Essas diferenças podem estar relacionadas ao fato de não ter sido utilizado o mesmo queijo para a realização das análises nos 5 períodos de maturação avaliados. Estes resultados são similares aos encontrados por Vechia et al. (2005), que obtiveram valores de 0,73 a 0,90%. Segundo Van Dender et al. (1995), o teor de sal tem um importante papel na dessora, favorecendo a drenagem da fase aquosa livre na massa e na hidratação das proteínas, intervindo na formação da crosta, além disso, interfere na formação do sabor característico do queijo devido ao seu sabor próprio e seu poder de mascarar o sabor de certas substâncias que aparecem ao longo da maturação. O sal também é muito eficiente na redução da A_w , o que lhe confere um alto poder inibitório sobre os microrganismos (VAN DENDER et al., 1995).

A atividade de água de 0,957 a 0,971, apesar desta diferença ser muito pequena, esta foi significativa. De acordo com Van Dender et al. (1995), os queijos semi-duros possuem atividade de água entre 0,941 e 0,970.

O teor do aminoácido tirosina atingiu valor máximo aos 30 dias de maturação (288,68mg/100g de queijo), reduzindo sua quantidade nos períodos subsequentes.

Os índices extensão e profundidade da maturação variaram de 4,04 a 16,00% e 2,29 a 11,77%, respectivamente. Moreno et al. (2002) observaram variação de 4,53 a 15,83% e de 1,84 a 17,47% para IEM e IPM, respectivamente, para quatro amostras de queijo Prato integral analisadas durante cinco semanas de maturação. Isto demonstra que o uso de cultura adjunta em queijos com teor reduzido de gordura pode resultar em queijos com maturação semelhante àquela observada em queijos integrais. A hidrólise dos oligopeptídeos resultantes da proteólise primária pelas proteinases e peptidases das bactérias do fermento láctico mesofílico ao longo da maturação resulta no aumento do índice de profundidade da proteólise (FOX; SINGH; McSWEENEY, 1995).

No tratamento D foi utilizada uma cultura composta por 60% de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* e 40% de *Lactobacillus casei*. Comparando-se os resultados com os obtidos para os demais queijos, observa-se que a redução de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* e aumento do *Lactobacillus casei* prejudicou o processo de maturação, resultando em queijos menos maturados quando comparados aos obtidos no tratamento C. Provavelmente a proporção entre os microrganismos no tratamento D resultou num desequilíbrio entre as culturas reduzindo a velocidade das reações bioquímicas.

De acordo com Hynes, Ogier e Buchet (2001), a cultura láctica utilizada na produção de queijo é supostamente influenciada pelo crescimento e pela microbiota

final de NSLAB durante a maturação. Segundo estes autores, foi demonstrado que *Lactobacillus* podem crescer com a lise da célula de *Lactococcus*, o que sugere que o rompimento da célula da cultura lática em queijos pode provir do metabolismo de carboidratos pelas NSLAB. No entanto, outros estudos sugerem não existir esta relação entre as culturas. Lane et al. (1997), por exemplo, compararam o efeito de culturas láticas iniciadoras no crescimento de culturas indígenas (NSLAB) em queijo Cheddar. Eles observaram rápidos crescimentos de NSLAB em queijos feitos com *Lactococcus lactis ssp lactis* como cultura iniciadora.

5.7 - Evolução dos índices de extensão e profundidade da maturação dos queijos durante 60 dias

Como pode ser constatado na Figura 3, à medida que os queijos foram se tornando mais maturados, houve aumento do índice de extensão da maturação.

Os queijos elaborados conforme os tratamentos B, C e D, manufaturados com a adição de cultura adjunta, apresentaram maiores porcentagens de IEM do que o queijo A (controle), demonstrando que a adição da cultura adjunta influenciou positivamente na maturação dos queijos. A proteólise primária, que resulta na formação de compostos nitrogenados solúveis a pH 4,6 é atribuída principalmente à ação do coagulante residual, mas o sistema proteolítico das culturas láticas também contribui, no decorrer do tempo, para a hidrólise da caseína e o conseqüente aumento da extensão da maturação (RODRÍGUEZ, 1998).

Comparando os queijos dos tratamentos B, C e D, os quais contêm porcentagens diferentes de *Lactobacillus casei*, pode-se verificar que o queijo C foi o que apresentou os maiores índices de extensão da maturação. Tal índice é comparável àqueles

observados por Leite, Pitarello e Penna (2002) em queijos Prato integrais de diferentes marcas.

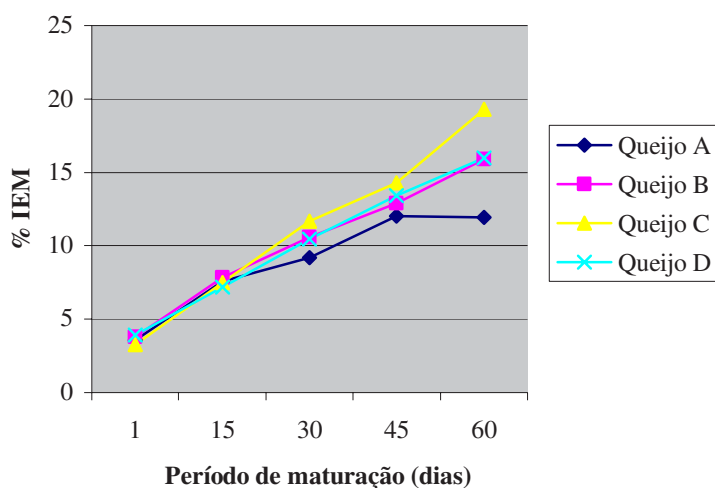


Figura 3 – Evolução dos índices de extensão da maturação dos queijos Prato com reduzido teor de gordura, manufaturados com e sem adição de cultura adjunta durante 60 dias.

Um aumento adicional de *Lactobacillus casei* (40%) e 60% de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* resultou num decréscimo da proteólise provavelmente pela menor proporção dos lactococos, influenciando negativamente na fermentação, pois a interação da cultura adjunta com a cultura tradicional utilizada foi prejudicada. Segundo Pereda et al. (2005), a evolução de lactococos e lactobacilos é diferente, os primeiros possuem um metabolismo mais rápido, e já começam a se multiplicar ativamente no leite, já os lactobacilos multiplicam-se mais lentamente no início e predominam ao final da maturação. A diversidade da microbiota NSLAB do leite e do queijo também pode ter contribuído ocorrência deste resultado.

Na Figura 4 estão contidos os resultados do índice de profundidade da maturação. Nos diferentes tratamentos, houve pequena variação dos resultados até o 15º dia de maturação, a partir dos 30 dias, essa diferença tornou-se mais acentuada.

Em todos os queijos, esse índice aumentou gradativamente com a maturação. No final do tempo de maturação (60 dias), os queijos fabricados com a cultura adjunta apresentaram índice de profundidade da maturação significativamente maior ($p < 0,05$) que o dos queijos controle, indicando ação da endo e exopeptidases bacterianas. Em queijos com teor reduzido de gordura podem ocorrer problemas, tais como: insuficiente quebra da caseína, diminuição da atividade das proteases das culturas mesofílicas, autólise insuficiente das culturas iniciadoras, resultando em pequena quantidade de aminoácidos (ARDÖ, 1997).

Nos queijos fabricados com a cultura adjunta, a atividade do sistema proteolítico de *Lactobacillus casei* provavelmente contribuiu para uma proteólise secundária mais pronunciada do que a do queijo controle, conforme relatado por El Soda, Madkor e Tong (2000). Este resultado contrasta com o encontrado por Michaelidou et al. (2003), no qual, o uso de *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* (LBC-80) não teve nenhum efeito na proteólise de queijo Kefalograviera com baixo teor de gordura. Entretanto, Barros et al. (2006), utilizando *Lactobacillus helveticus* como cultura adjunta em queijo Prato, verificaram que esta teve influência sobre a profundidade da maturação, a qual foi maior no final da maturação no queijo com a cultura adjunta.

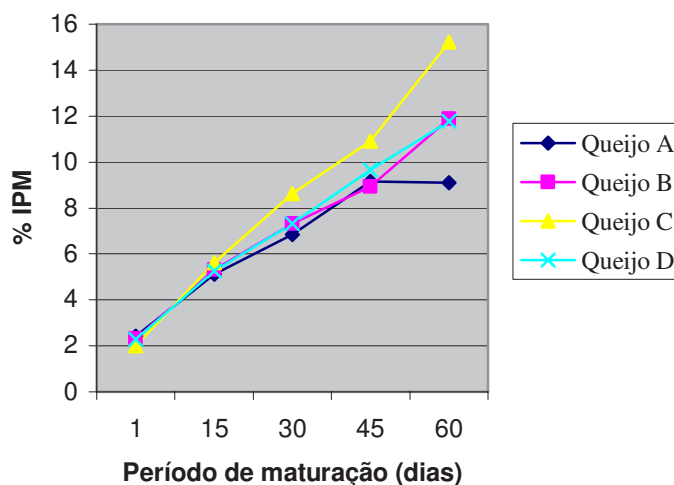


Figura 4 – Evolução dos índices de profundidade da maturação dos queijos Prato com reduzido teor de gordura, manufacturados com e sem adição de cultura adjunta durante 60 dias.

Assim, a utilização da cultura adjunta se mostrou uma alternativa viável na aceleração da proteólise em queijo Prato com reduzido teor de gordura, visto que, aos 45 dias de maturação os índices de extensão e profundidade da maturação dos queijos C e D já havia ultrapassado o valor dos mesmos índices observados no queijo A (controle) aos 60 dias.

5.8 - Caracterização do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) dos queijos submetidos aos tratamentos A, B, C e D.

O perfil eletroforético dos queijos durante os estágios de maturação é apresentado na Figura 5, indicando as principais frações de caseína identificadas, de acordo com Silva, Van Dender e Campos (1999).

O aparecimento da α_{s1-I} caseína a partir da degradação da α_{s1} -caseína pode ser observado em todos os queijos já no primeiro dia de maturação. Segundo Cichoski et al. (2002), o acúmulo de α_{s1-I} caseína nos primeiros momentos da maturação de queijo Prato ocorre de forma notável e pode estar relacionado a valores de pH e razão sal/umidade encontrados durante a maturação do queijo Prato (pH 5,40 e S/U 2-3%). A degradação foi mais intensa à medida que o tempo de maturação aumentou. Este fato pode ser constatado por meio da diminuição da banda de α_{s1} -caseína ao longo da maturação.

De acordo com Exterkate, Alting e Slangen (1995), que realizaram estudos no queijo e *in vitro*, a quimosina quebra preferencialmente a ligação entre os resíduos Phe23-Phe24 da α_{s1} caseína, liberando o fragmento conhecido como α_{s1-I} caseína. Esse polipeptídeo tem caráter mais ácido que a caseína e mobilidade eletroforética ligeiramente maior.

A estrutura primária da β -caseína é susceptível à hidrólise pela protease plasmina nas ligações peptídicas dos resíduos de aminoácidos 28-29, 105-106 e 107-108, originando as γ -caseínas como fragmentos peptídicos (SGARBIERI, 2005). Foi observado o aparecimento de bandas γ_1 e γ_3 a partir do primeiro dia de maturação dos queijos, evidenciando a ação da plasmina, atuando na degradação da β -caseína.

A proteólise primária em queijos envolve a hidrólise da α_{s1} -caseína pela quimosina e da β -caseína pela plasmina. O sistema proteolítico das bactérias que compõe ou não a cultura lática possui uma contribuição muito pequena na proteólise primária (detectada pelo PAGE), mas são responsáveis pela formação de pequenos peptídeos e aminoácidos livres (FOX; McSWEENEY, 1997).

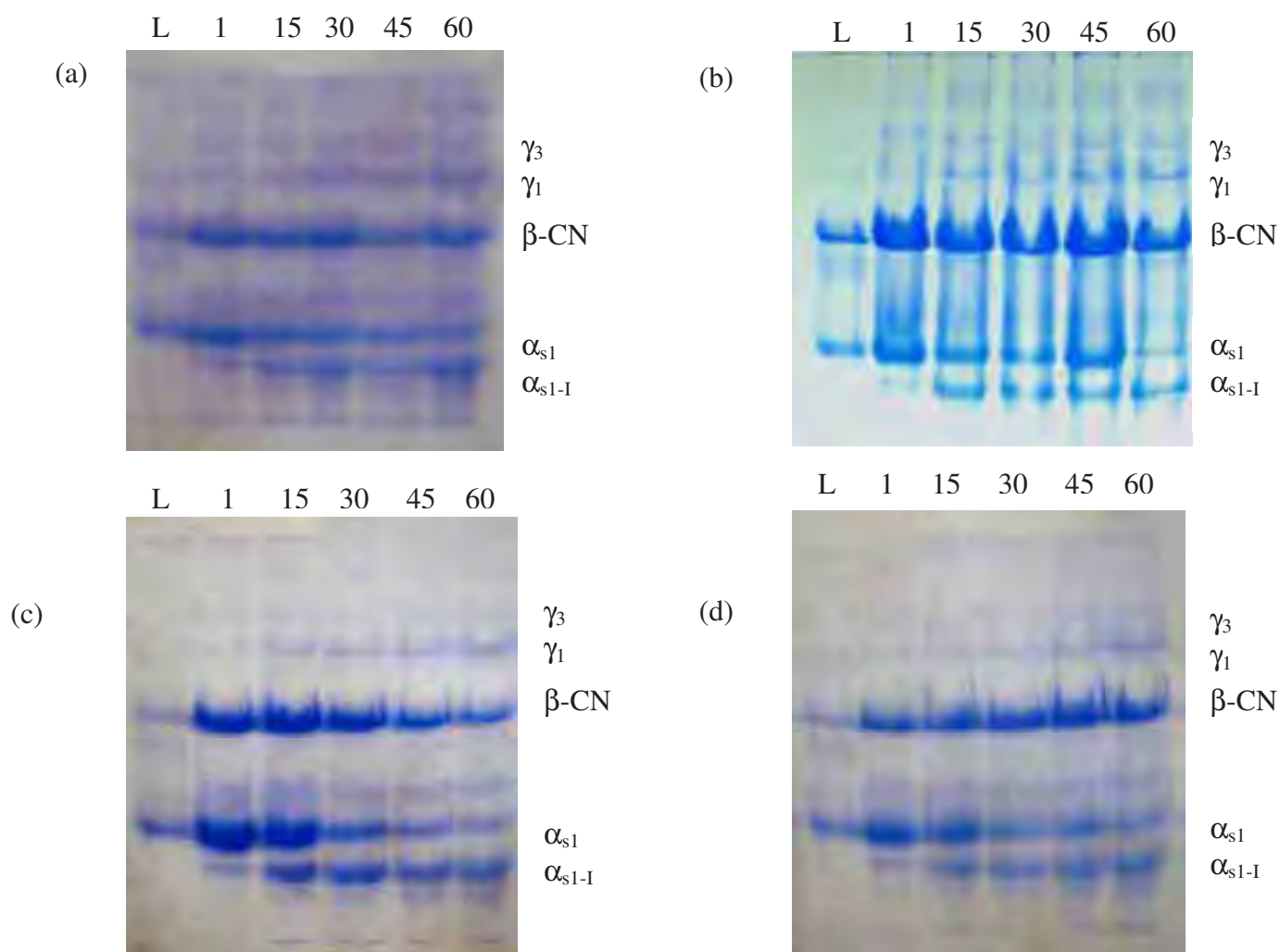


Figura 5 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (Uréia-PAGE) dos queijos elaborados conformes os tratamentos A (a), B (b), C (c) e D (d) nos diferentes períodos de maturação. L-leite.

De acordo com o perfil eletroforético dos queijos A, B, C e D, foi observado que durante a maturação a α_{s1} caseína foi hidrolisada mais extensivamente que a β -caseína, visto que, a diminuição da banda da fração β e aumento da banda contendo a γ caseína foi pequeno quando comparado ao que pode ser observado na fração α_{s1} caseína. Tal

comportamento está de acordo com os resultados encontrados por Gorostiza et al. (2004) em queijo Prato.

Na maioria das variedades de queijo a β -caseína é muito mais resistente que a α_{s1} caseína (FOX; McSWEENEY, 1997). Thomas e Pearce (1981) verificaram que em queijos Cheddar e Gouda com seis meses de maturação, a α_{s1} caseína já está completamente hidrolisada enquanto aproximadamente 50% da β -caseína ainda está intacta. Michaelidou et al. (2003) observaram em queijo Kefalograviera que ao final de 180 dias de maturação 40% da α_{s1} caseína estava intacta comparado com 60% de β -caseína.

Com relação aos queijos preparados com ou sem adição da cultura adjunta, não foram observadas grandes diferenças qualitativas entre os queijos. Estes resultados concordam com os encontrados por Lynch et al. (1999) em queijo Cheddar e por Michelidou et al. (2003) em queijo Kefalograviera adicionados de culturas adjuntas.

Além disso, queijos com reduzido teor de gordura possuem um maior conteúdo de proteína em relação ao extrato seco do que queijos com teor integral de gordura, devido à remoção desta. Uma alta concentração de proteína pode alterar a atividade proteolítica enzimática e a subsequente quebra da proteína na eletroforese nesses tipos de queijos (DRAKE et al., 1997).

5.9 - Caracterização dos parâmetros de cor dos queijos aos 30 e 60 dias de maturação

Como pode ser observado na Tabela 6, no queijo elaborado conforme o tratamento A todos os parâmetros de cor analisados diminuíram aos 60 dias de maturação. No queijo do tratamento B, o parâmetro L variou de 78,97 a 81,66, o valor a^* variou de

11,72 a 10,94 e o valor b^* variou de 33,26 a 31,00 aos 30 e 60 dias respectivamente, porém esta variação não foi significativa. No queijo do tratamento C os parâmetros L e b^* permaneceram constantes aos 30 e 60 dias, enquanto a^* diminuiu. No queijo do tratamento D houve diminuição no valor de L e aumento no valor de a^* aos 30 e 60 dias de maturação, enquanto o parâmetro b^* permaneceu constante.

Tabela 6 - Caracterização dos parâmetros de cor dos queijos aos 30 e 60 dias de maturação.

Queijo	30 dias			60 dias		
	L	a^*	b^*	L	a^*	b^*
A	82,52 ^a	11,30 ^a	38,52 ^a	80,56 ^b	10,74 ^b	32,49 ^b
B	78,97 ^a	11,72 ^a	33,26 ^a	81,66 ^a	10,94 ^a	31,00 ^a
C	71,91 ^a	13,71 ^a	40,35 ^a	72,96 ^a	12,45 ^b	40,65 ^a
D	82,19 ^a	8,48 ^b	31,74 ^a	80,62 ^b	9,62 ^a	31,50 ^a

^{ab}Letras iguais para o mesmo queijo não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade.

Segundo Al-Hooti et al. (2002), no sistema L, a^* , b^* , o parâmetro L, é a medida de luminosidade e varia de 0 (preto) a 100 (branco), o valor a^* varia de -100 (verde) a +100 (vermelho) e o valor b^* varia de -100 (azul) a +100 (amarelo).

Pesquisas prévias na cor do queijo em função do tempo de maturação realizadas por Rohm e Jaros (1996) relataram decréscimo do valor de L e aumento dos valores de a^* e b^* durante a maturação de queijo Emmental. Ginzinger et al. (1999) observaram que a intensidade de amarelamento do queijo, uma medida unidimensional correlacionada com b^* , aumentou com a maturação. Buffa et al. (2001) analisaram a mudança de cor do queijo durante a maturação e verificaram que o valor de a^* permaneceu constante, o valor L decresceu e o valor b^* aumentou.

Diferenças nos parâmetros L, a^* , b^* também foram observadas entre os quatro tratamentos. No processamento do queijo Prato, é adicionada uma pequena quantidade

de corante de urucum visando dar a cor característica do produto. Assim, a distribuição homogênea desse corante durante a adição dos ingredientes ao leite também pode estar relacionada com as diferenças encontradas nos valores de b^* .

A luz, temperatura e o tipo de embalagem são fatores que interferem na cor de um produto, podendo resultar em descoloração e desenvolvimento de sabores indesejáveis em queijos devido à oxidação lipídica. Segundo Bosset, Sieber e Gallmann (1995), a riboflavina e os carotenóides contribuem para a cor amarela do queijo, e a degradação desses componentes durante a exposição à luz pode resultar em descoloração do produto.

5.9 - Caracterização do perfil de textura dos queijos aos 30 e 60 dias de maturação

Dentre os atributos determinados no perfil de textura instrumental (TPA), a elasticidade, a dureza, a coesividade e a resiliência foram os que apresentaram menor variação entre as repetições. Os demais atributos foram desconsiderados, uma vez que os resultados se mostraram inconsistentes e com uma variabilidade muito grande.

Em relação aos diferentes tipos de tratamentos, pode se observar que o queijo submetido ao tratamento C, o mais proteolizado, foi o que apresentou maior elasticidade, coesividade e resiliência nos dois períodos analisados. Lawrence et al. (1987) observaram que a proteólise se correlacionava de forma inversa com a firmeza e elasticidade, indicando um amolecimento do queijo quando a matriz protéica era clivada.

Como pode ser observado na Tabela 7, o queijo submetido ao tratamento A tornou-se menos elástico aos 60 dias de maturação. Os queijos B, C e D mantiveram a elasticidade constante nos dois períodos de maturação em que este parâmetro foi

analisado. Baldini et al. (1998) obtiveram uma média de 0,81 para este atributo em queijo Prato com 28 dias de maturação.

Foi observada a diminuição da dureza em todos os queijos ao final da maturação, indicando a influência da proteólise neste parâmetro. A região do queijo (externa e interna) de onde foram retiradas as amostras para análise pode ter contribuído para a grande diferença nos valores deste parâmetro entre os queijos analisados (SILVA, VANDENDER; CAMPOS, 1999). Baldini et al. (1998) obtiveram médias de 2921,2 a 4568,7g para queijo Prato integral. Estes valores foram menores do que os encontrados no presente trabalho, provavelmente, devido à redução no teor de gordura.

Tabela 7 - Caracterização do perfil de textura dos queijos aos 30 e 60 dias de maturação.

Queijo	Elasticidade	Dureza (N)	Coesividade	Resiliência
A (30 dias)	0,98 ^a	148,69 ^a	0,66 ^a	0,24 ^a
A (60 dias)	0,91 ^b	125,49 ^b	0,40 ^b	0,13 ^b
B (30 dias)	0,94 ^a	306,26 ^a	0,68 ^b	0,31 ^a
B (60 dias)	0,93 ^a	196,44 ^b	0,75 ^a	0,28 ^a
C (30 dias)	1,10 ^a	295,52 ^a	0,82 ^b	0,39 ^a
C (60 dias)	1,12 ^a	185,84 ^b	0,87 ^a	0,40 ^a
D (30 dias)	0,86 ^a	106,55 ^a	0,54 ^a	0,13 ^b
D (60 dias)	0,87 ^a	86,48 ^b	0,58 ^a	0,17 ^a

Letras iguais^{ab} para o mesmo queijo aos 30 e 60 dias não diferem entre si a 5% de probabilidade. N-Newton

Com relação à coesividade, esta foi maior no último dia de maturação do que aos 30 dias para os queijos dos tratamentos B, C e D. Nos queijos do tratamento A, este

valor diminuiu no 60º dia. Katsuda et al. (1999) encontraram 0,57 e 0,56 de coesividade para o Prato com teor reduzido de gordura aos 30 e 45 dias de maturação, utilizando as seguintes condições de análise: bastão cilíndrico de aço (0,6 cm de diâmetro) cuja penetração foi 75% da altura da amostra (1,11 cm) com duas compressões. Baldini et al. (1998), que trabalharam com o mesmo queijo, mas com teor integral de gordura também observaram 0,57 para coesividade aos 28 dias e 0,55 aos 40 dias, utilizando o mesmo equipamento do presente trabalho em amostras cilíndricas com diâmetro e altura de 20mm.

No que diz respeito a resiliência, pode ser constatado que os queijos dos tratamentos A e B o valor foi menor aos 30 do que aos 60 dias, enquanto no queijo do tratamento C este parâmetro permaneceu constante. No queijo do tratamento D houve um ligeiro aumento no final da maturação.

Uma das maiores dificuldades na medida das propriedades reológicas de um queijo está na obtenção de amostras representativas. Muitas das variedades como Cheddar, Cherise e alguns tipos de queijos azuis são heterogêneas e facilmente fraturáveis, enquanto queijos como os suíços apresentam olhaduras que causam problemas com relação à homogeneidade (FARKYE; FOX, 1990). Todos os fatores citados acima contribuem para ocorrência de variações observadas na determinação de textura.

O desenvolvimento das características de textura durante a maturação é o resultado de extensivas mudanças químicas, bioquímicas e enzimáticas que determinam sua composição. A taxa e extensão do desenvolvimento da textura e, portanto, a qualidade do queijo pode ser determinada através da mensuração de suas propriedades

reológicas, como, dureza, coesividade, elasticidade, gomosidade, mastigabilidade, etc. (KANAWJIA et al., 1995).

Estas propriedades afetam a consistência percebida na boca, o uso do produto (por exemplo, o fatiamento), a garantia da manutenção do seu formato, dentre outras e podem variar de acordo com o tipo de queijo e o estágio de maturação, conseqüentemente, a consistência é um importante símbolo de qualidade (VISSER, 1991).

5.11 - Microestrutura dos queijos

A Figura 6 mostra a microestrutura contendo a matriz protéica, os glóbulos de gordura e a cultura lática adicionada dos queijos Prato com 30 e 60 dias de maturação manufaturados conforme os tratamentos A, B, C e D.

A matriz protéica apresenta-se densa e compacta. Queijos com reduzido teor de gordura manufaturados sem a adição de substitutos de gordura contêm menor quantidade de gordura e portanto, menos glóbulos para interromper a matriz protéica dos queijos. Como resultado, estes queijos freqüentemente exibem uma textura mais firme e elástica que queijos com teores integrais de gordura (CRITES; DRAKE; SWANSON, 1997).

Foram encontrados glóbulos de gordura de diferentes tamanhos e formas nos queijos analisados. Segundo Kalab (1983) a presença de alto conteúdo de gordura ou glóbulos de gordura muito largos na amostra pode ocorrer por causa da dificuldade durante o corte como também pela falta de homogeneidade no bloco. A grande maioria dos glóbulos possui forma globular e apresentam-se isolados uns dos outros. Os

glóbulos de gordura tornam-se comprimidos durante o corte, o qual pode resultar em uma imagem achatada dos glóbulos (AWAD et al., 2002).

Também pode ser observada a presença de bactérias nos queijos, de diferentes formas, cocos e bacilos. A maior parte das bactérias se encontra agrupada, mas também verificou-se a presença de bactérias isoladas. Em todos os queijos as bactérias estão próximas aos glóbulos de gordura. As bactérias são capazes de se fixar no coágulo ou no queijo como ocorre no substrato sólido (água) desenvolvendo-se em colônias se as condições de difusão de lactose e ácido láctico assim permitirem. Dean, Berridge e Mabbitt (1959), Unemoto, Sato e Kito (1978), Tunick et al. (1993) e outros verificaram a tendência das bactérias lácticas se agregarem aos glóbulos de gordura. A interação existente entre a bactéria e o glóbulo de gordura tende a ficar mais intensa com o decorrer da maturação (LALOY et al., 1996).

Não foi observada nenhuma diferença significativa na microestrutura entre os queijos analisados.

O queijo A com 30 dias de maturação apresenta artefatos representados por manchas escuras na imagem. Isto pode ser causado tanto pelo método de corte como pela coloração.

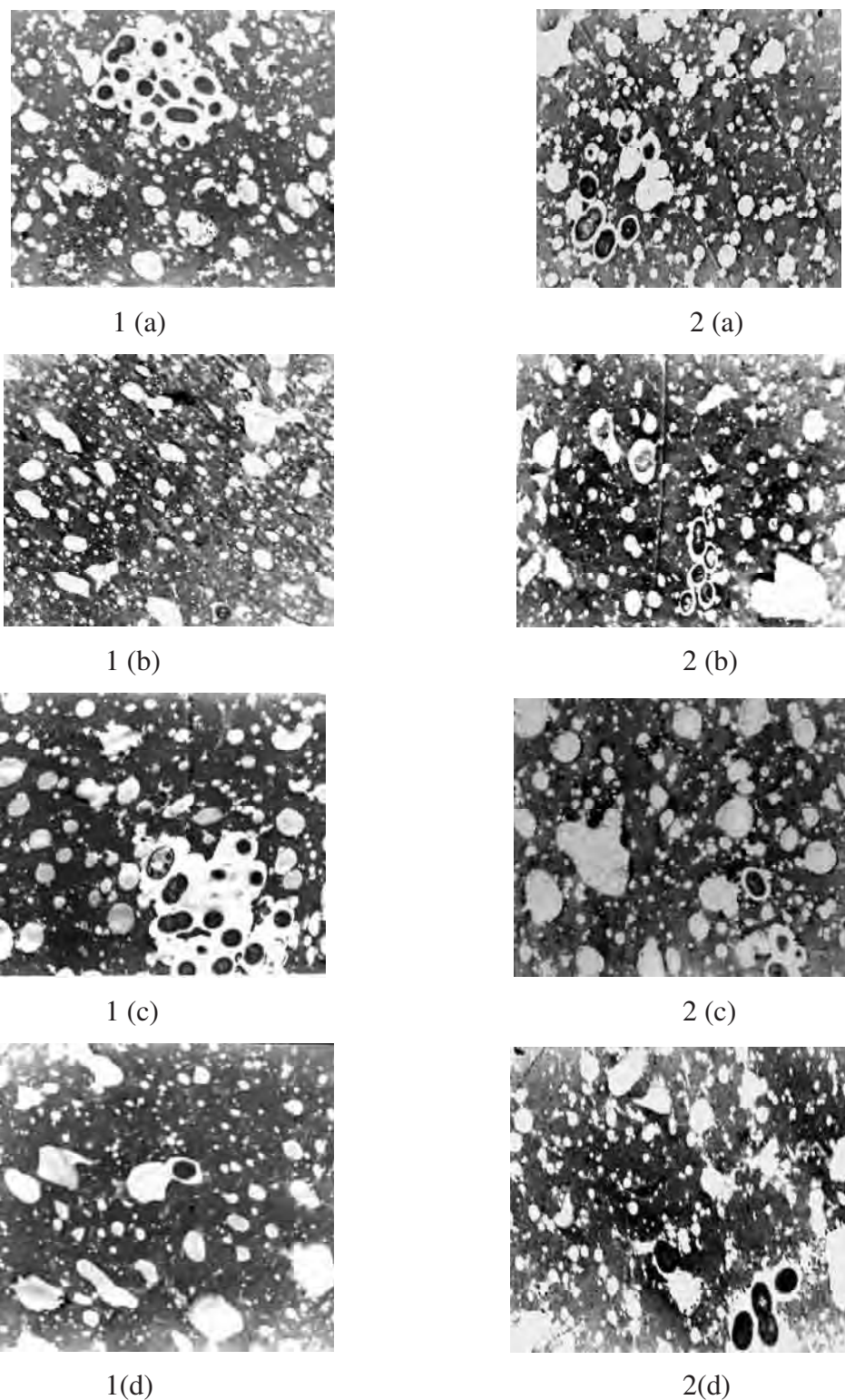


Figura 6 - Microscopia eletrônica de transmissão (ampliação: 8.316x) dos queijos elaborados conforme os tratamentos A (controle, a), B (20% de *L. casei*, b), C (30% de *L. casei*, c) e D (40% de *L. casei*, d) aos 30 (1) e 60 (2) dias de maturação.

5.12 - Identificação de compostos aromatizantes presentes nos queijos

No presente trabalho foram identificados compostos voláteis pertencentes aos seguintes grupos químicos: álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos graxos, ésteres, hidrocarbonetos aromáticos, compostos sulfurados e terpenos.

Como pode ser observado na Tabela 8 e nos cromatogramas apresentados nas Figuras de 7 a 18, alguns compostos voláteis presentes no queijo aumentaram durante a maturação enquanto outros decresceram ou desapareceram, não havendo uma regularidade no comportamento dos compostos nos diferentes queijos.

Não foi possível fazer a identificação precisa do composto que eluiu aos 5min e 12s, visto que o software apontou para dois compostos, 2,3 butanodiona e o 3-metil butanal. O que é conclusivo é que se trata de um composto carbonílico. O composto que saiu aos 7min e 12s é um isômero do xileno, como esses compostos são muito parecidos o espectro de massa não consegue eficácia na identificação.

Foram encontrados os seguintes álcoois nos queijos: etanol, 3-metil 1butanol, pentanol e 1-hexanol. Segundo Arora, Cormier e Lee (1995), álcoois primários como 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol e 1-hexanol são produzidos pela redução de seus correspondentes aldeídos e metil-cetonas. O etanol pode ser produzido a partir da fermentação da lactose pelas bactérias ácido-láticas (FOX; SINGH; McSWEENEY, 1995). Esses álcoois podem conferir aroma de fruta e noz em determinadas variedades de queijos e em outras como Gouda e Cheddar podem ser responsáveis por defeitos no sabor quando presentes em altas concentrações.

A presença de álcool metílico é o resultado do metabolismo de aminoácidos de cadeia lateral (MOLIMARD; SPINNLER, 1996). O álcool isoamílico 3-metilbutanol é formado pela redução de seu correspondente aldeído, o qual é derivado da leucina,

sendo um composto importante na contribuição do sabor de vários queijos. O aroma agradável de frescor em queijos moles tem sido atribuído a este composto (ENGELS, 1997).

Álcoois secundários são formados pela redução enzimática de metilcetonas, as quais são produzidas a partir de ácidos graxos (MOLIMARD; SPINNLER, 1996).

No grupo dos aldeídos somente o hexanal foi identificado. Aldeídos de cadeia linear como butanal, pentanal, hexanal, heptanal e nonanal podem ser formados via β -oxidação de ácidos graxos insaturados (NOGUEIRA, LUBACHEVSKY; RANKIN, 2005). O hexanal é caracterizado por seu aroma herbáceo e grama verde (SABLE; COTTENCEAU, 1999).

Os queijos continham acetona e 3-hidroxi 2-butanona. As cetonas são constituintes comuns na maioria dos produtos lácteos. As metil-cetonas são primariamente reconhecidas por sua contribuição no sabor de queijos maturados por fungos, como queijos azuis (WELSH; MURRAY; WILLIAMS, 1989). Estes compostos são formados no queijo (ação lipolítica da microbiota) por descarboxilação oxidativa de ácidos graxos (COLLIN et al., 1993). Devido à redução no queijo, a redução enzimática das metilcetonas a álcoois secundários também irá ocorrer (BARBIERI et al., 1994).

O diacetil (2,2-butanodione) confere um aroma amantegado, de noz (WELSH; MURRAY; WILLIAMS, 1989). O diacetil é formado em produtos lácteos a partir do citrato. A redução do diacetil forma acetoína (3-hidroxi-2-butanona), um composto com aroma arborizado e suave (MOIO et al., 1993).

Ácido acético, ácido butanóico e ácido hexanóico foram os ácidos graxos encontrados nos queijos. Esses compostos podem ser originados a partir da hidrólise da gordura, metabolismo da lactose, desaminação de aminoácidos e da oxidação lipídica

(NOGUEIRA, LUBACHEVSKY; RANKIN, 2005). O ácido acético é produzido principalmente pela degradação (descarboxilação ou desaminação oxidativa) de aminoácidos (alanina e serina) por bactérias (MOLIMARD; SPINNLER, 1996).

Acetato de etila, acetato de butila, butanoato de etila, hexanoato de etila, foram os ésteres identificados nos queijos. Os ésteres são formados pela esterificação de cadeias curtas de ácidos graxos livres com etanol (FOX; SINGH; McSWEENEY, 1995). Os ésteres podem ser produzidos no queijo por leveduras, bactérias heterofermentativas não componentes da cultura lática, bactérias psicrotróficas e lactococos iniciadores (LAW, 1982).

Muitos ésteres e principalmente o de etila são reconhecidos por seu importante papel na formação de aroma de frutas doces (MORENO et al., 2003). Devido a sua alta volatilidade a temperaturas ambientes, os ésteres possuem importante contribuição no sabor de muitos queijos mesmo em baixas concentrações (NOGUEIRA, LUBACHEVSKY; RANKIN, 2005).

Dimetil sulfeto é um composto sulfurado que estava presente nos queijos. A decomposição de aminoácidos sulfurados durante a maturação do queijo produz compostos sulfurados voláteis como sulfeto de hidrogênio e o metanotiol. Posteriormente estes compostos podem ser convertidos por meio de reações oxidativas a dissulfeto dimetil (DMDS) e trissulfeto dimetil (DMTS), compostos que conferem aroma de queijo maturado (PARLIAMENT; KOLAR; RIZZO, 1982). A formação do metanotiol, precursor do DMDS e do DMTS, através da metionina pode ocorrer via enzimática (ALTING et al., 1995) ou não enzimática (GRIFFITH; HAMMOND, 1989). O primeiro pode ser degradado a dimetil sulfeto. Engels et al. (1997), investigando compostos voláteis em oito tipos de queijos diferentes encontrou o DMDS e o DMTS

em todos. De acordo com Izco et al. (2000) Compostos sulfurados são indispensáveis no aroma de queijos como Cheddar, Emmental, Gruyère e Camembert.

O monoterpene limoneno, identificado nos queijos, possui um odor característico de fruta cítrica (WELSH; MURRAY; WILLIAMS, 1989). Belitz e Grosch (1986) verificaram que a presença de terpenos no queijo provém das plantas e não da microbiota presente.

Os queijos apresentaram concentrações de tolueno, benzeno, xileno e estireno. Derivados aromáticos (benzeno e tolueno) podem ser formados a partir de aminoácidos como fenilalanina e tirosina por meio da degradação de Strecker (MCSWEENEY; SOUSA, 2000). Segundo Dimos; Urbach e Miller (1996), o tolueno é um componente normal do leite de origem desconhecida. Para Johnson, Nursten; Self (1969), o benzeno e o tolueno podem ser originados da degradação do caroteno do leite ou podem ser advindos do uso de solventes ou outras substâncias durante a análise (MOLIMARD; SPINNLER, 1996).

Hidrocarbonetos aromáticos como o benzeno, p-xileno e o tolueno já foram identificados em queijo Roncal (ORTIGOSA; TORRE; IZCO, 2001). O estireno é um elemento traço presente em vários tipos de queijo como Camembert que pode ser produzido a partir da fenilalanina (MOLIMARD; SPINNLER, 1996).

Pode ser verificado a presença de um menor número de compostos voláteis neste trabalho quando comparado aos resultados observados por Moreno et al. (2003) também em queijo Prato. Tal fato pode estar relacionado ao teor de gordura do produto, já que estes autores trabalharam com queijos manufaturados com teor integral de gordura. Entretanto, praticamente todos os compostos encontrados no presente trabalho foram também observados nos queijos analisados por Moreno et al. (2003). Outros fatores que

podem contribuir para a ocorrência destas diferenças são as variáveis nos fermentos lácticos, NSLAB e métodos de análise cromatográfica.

Tabela 8 – Compostos voláteis identificados nos queijos Prato submetidos aos tratamentos A, B, C e D e sua evolução nos tempos analisados (1 e 60 dias).

Composto	TR	Queijo A	Queijo B	Queijo C	Queijo D
Dimetil sulfeto	3,7	+	0	0	0
Acetona	4,0	0	0	+	0
Acetato de etila	4,4	+	-	0	-
Etanol	4,7	+	-	-	-
Butanoato de etila	5,7	0	+	-	+
Tolueno	6,0	-	+	-	-
Acetato de butila	6,2	0	-	-	-
Hexanal	6,4	-	-	-	-
Etilbenzeno	7,1	+	0	-	-
Isômero Xileno	7,2	+	0	-	-
3-metil 1-butanol	7,8	-	-	+	-
Limoneno	8,0	0	0	0	-
Hexanoato de etila	8,2	ND	0	0	-
Pentanol	8,3	-	-	0	-
Estireno	8,8	0	0	0	-
3-hidroxi 2 butanona	9,2	-	+	+	-
1-Hexanol	9,7	-	-	0	-
Ácido acético	11,2	+	-	-	+
Ácido butanóico	13,2	+	+	0	+
Ácido hexanóico	15,7	+	+	+	+

TR- tempo de retenção (min); ND- não detectado; -: diminuição do composto ao longo da maturação; +: aumento do composto durante a maturação; 0: a concentração do composto se manteve constante durante a maturação.

O uso da cultura adjunta não teve efeito significativo no aumento da concentração da maior parte dos compostos voláteis no período analisado. Kondyli et al. (2003) observaram a presença de compostos voláteis em queijo Kefalograviera com baixo teor de gordura manufaturado com culturas adjuntas comerciais. Os autores verificaram que no queijo acrescido de *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus*, muitos compostos tinham menor concentração do que no queijo controle (sem cultura adjunta), tanto aos 90 como

aos 180 dias de maturação. Tungjaroenchai, Drake e White (2001) verificaram a influência de culturas adjuntas na maturação de queijo Edam com reduzido teor de gordura e observaram que *Lactobacillus helveticus* exibiu alta taxa de proteólise no queijo durante a maturação, mas não proveu benefícios ao sabor do queijo.

A quebra dos aminoácidos é a principal reação que leva ao desenvolvimento de sabor em queijos, assim, é necessária liberação das aminopeptidases intracelulares dos microrganismos para que ocorra essa quebra. Scolari e Vescovo (2005) verificaram a lise de *Lactobacillus casei* 5Mn 373 em queijo durante a maturação de queijo Grana. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o processo autolítico das células desse microrganismo atinge seu máximo no 4º mês de maturação, entretanto estudos in vitro indicam que a taxa e extensão da autólise celular é dependente da cepa utilizada.

Por meio da cromatografia gasosa pode-se confirmar que o aroma do queijo não é determinado por um composto ou por uma classe de compostos, mas sim pela presença de numerosos componentes voláteis originados da transformação de aminoácidos e ácidos graxos.

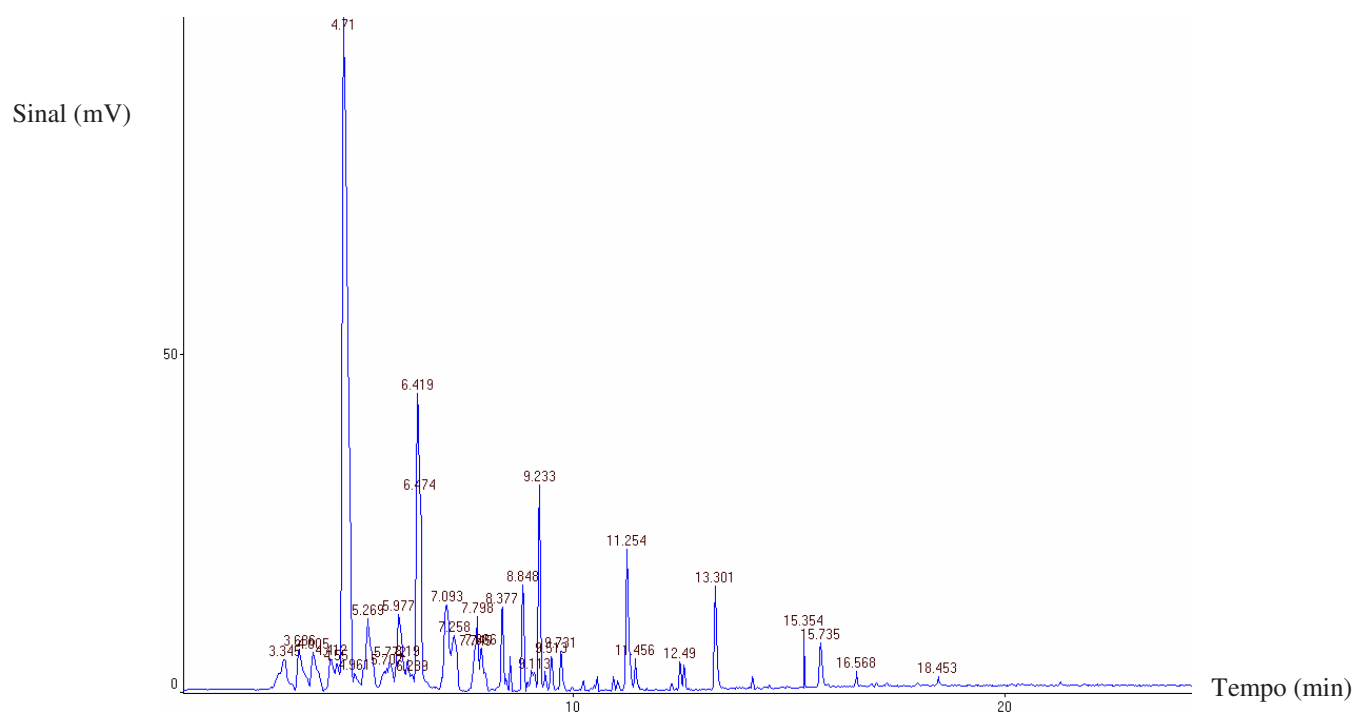


Figura 7 - Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento A (controle), após 1 dia de maturação.

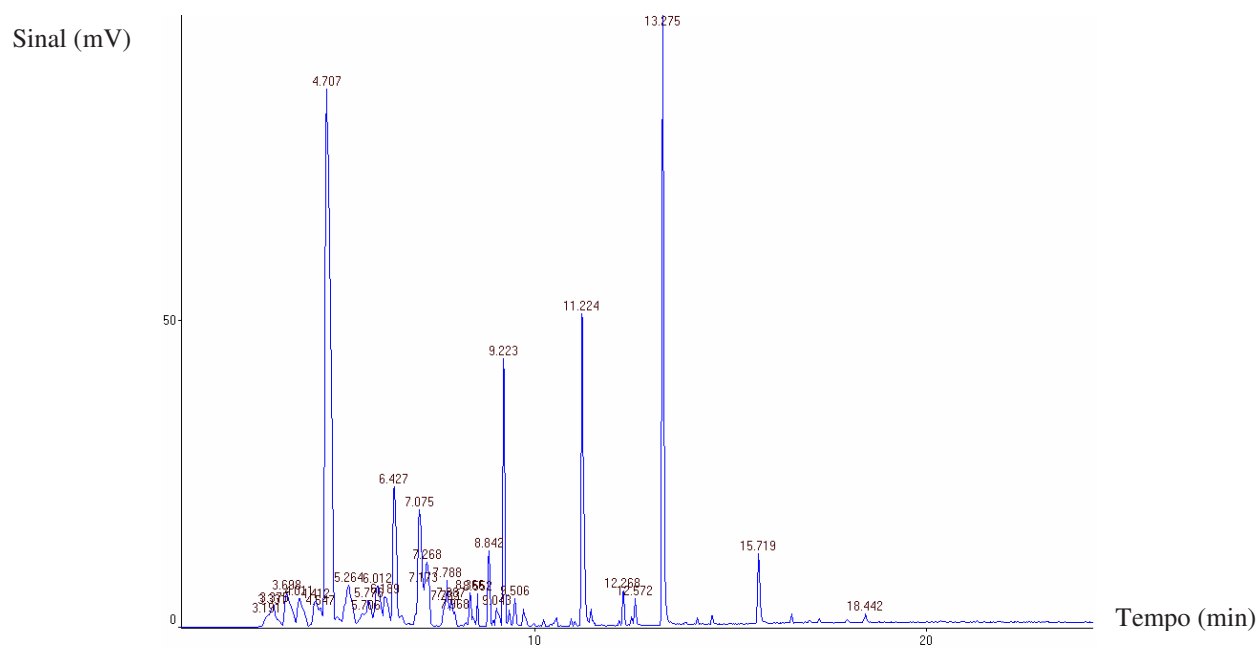


Figura 8 - Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento A (controle), após 60 dias de maturação.

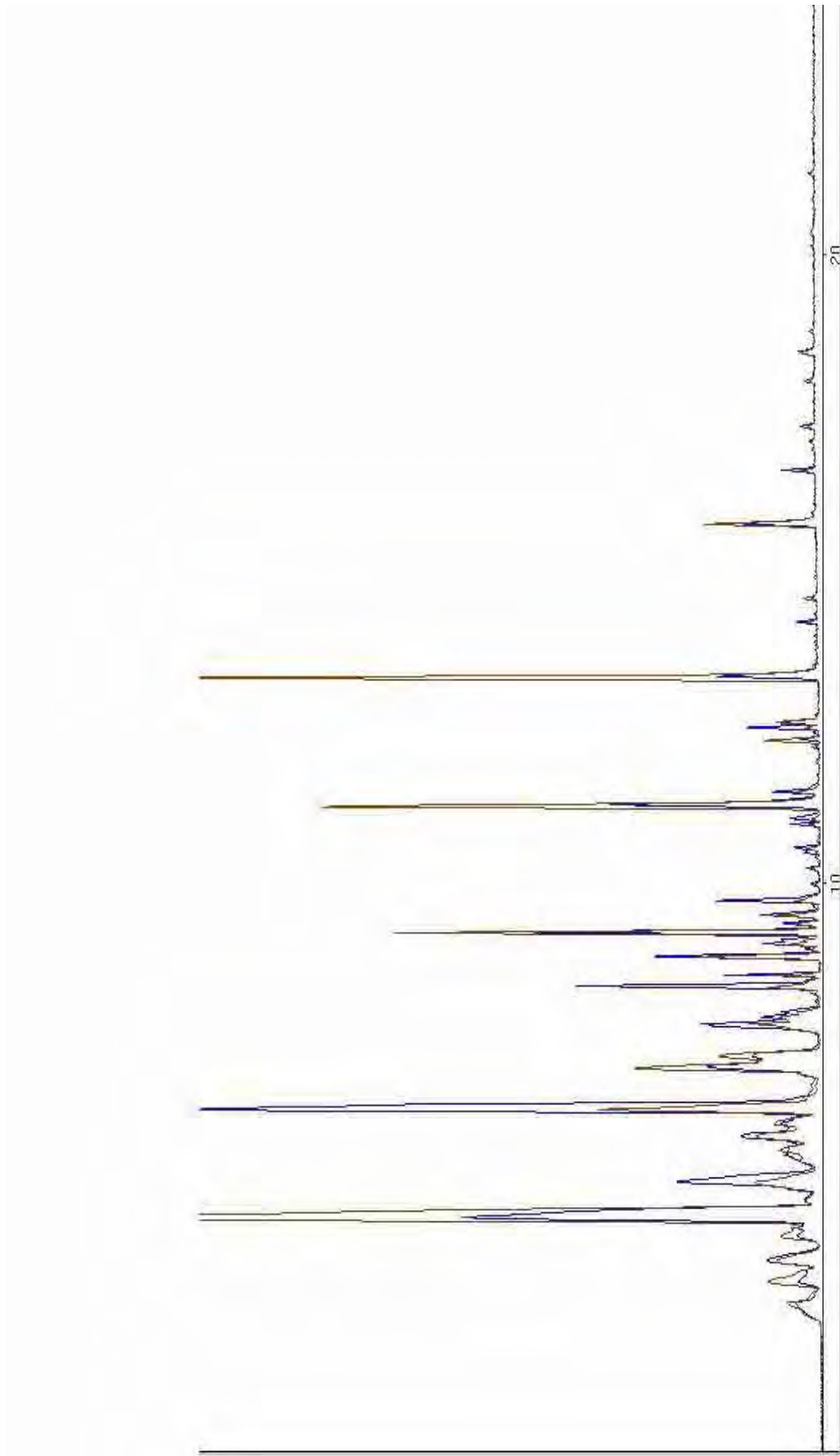


Figura 9 - Comparação entre os cromatogramas do queijo elaborado conforme o tratamento A (controle), após 1 dia (azul) e 60 dias (marrom) de maturação.

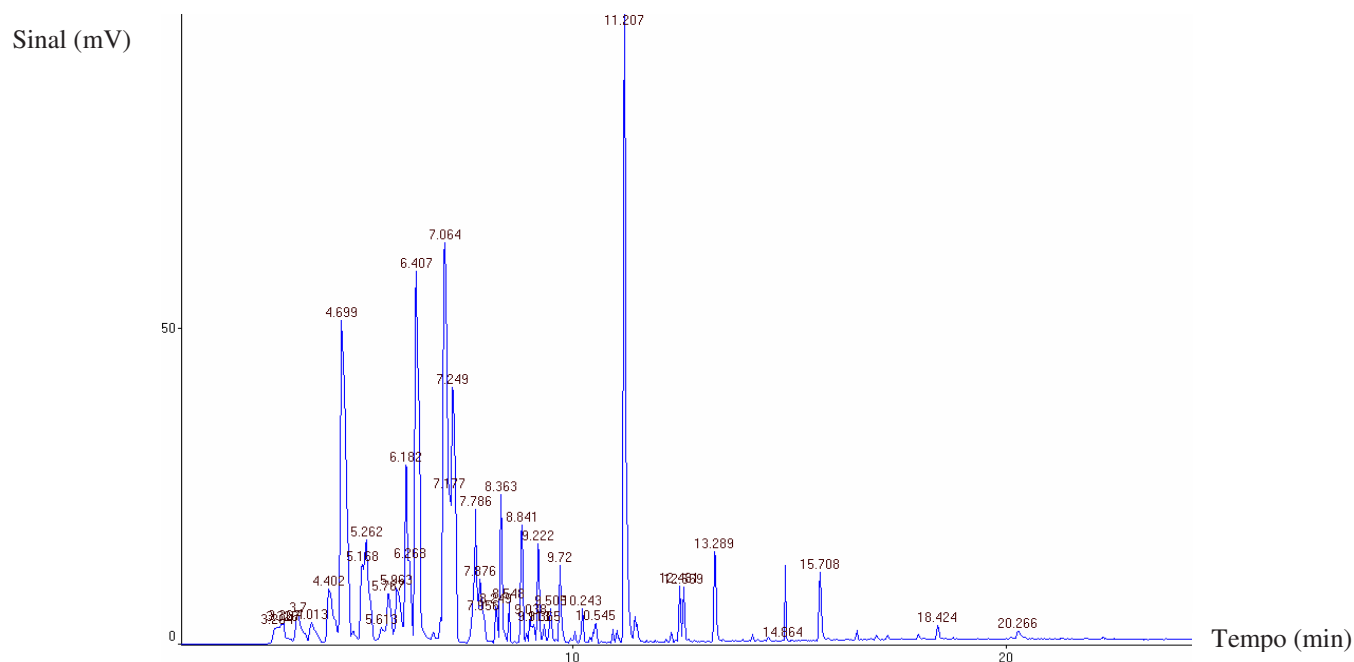


Figura 10 - Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento B (20% de *L. casei*), após 1 dia de maturação.

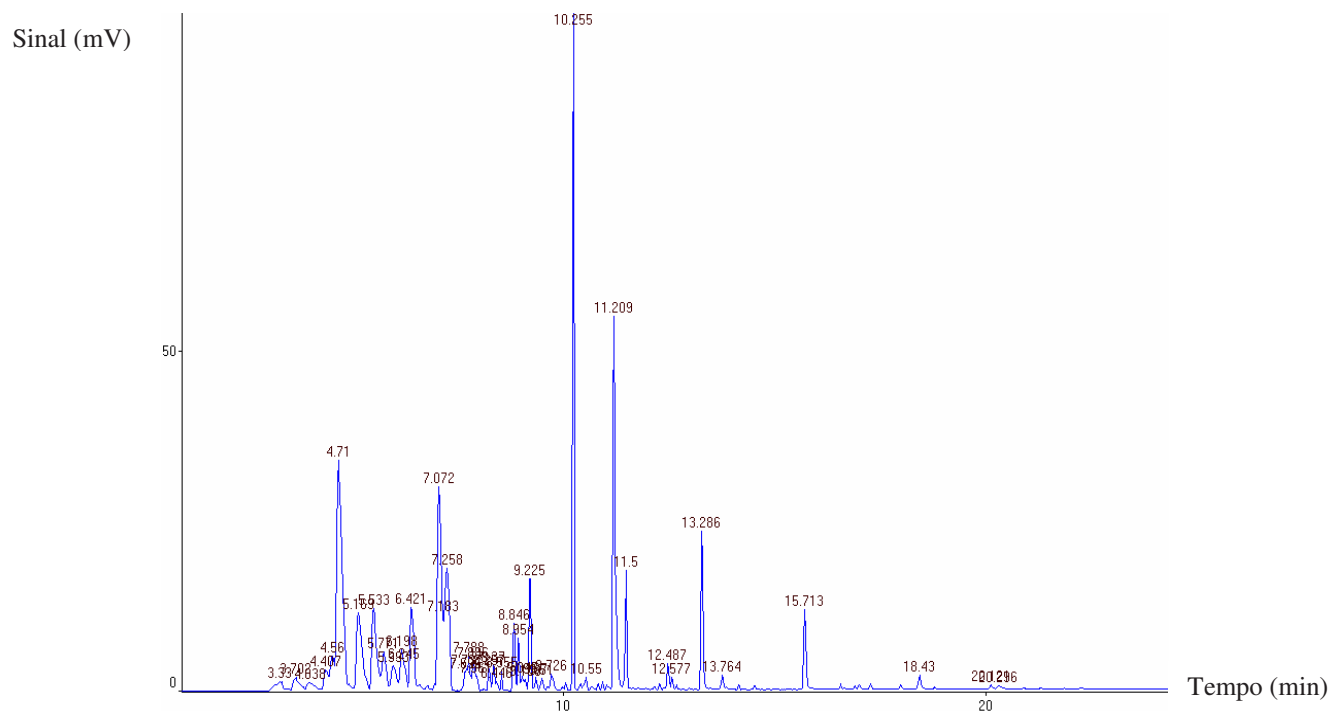


Figura 11 - Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento B (20% de *L. casei*), após 60 dias de maturação.

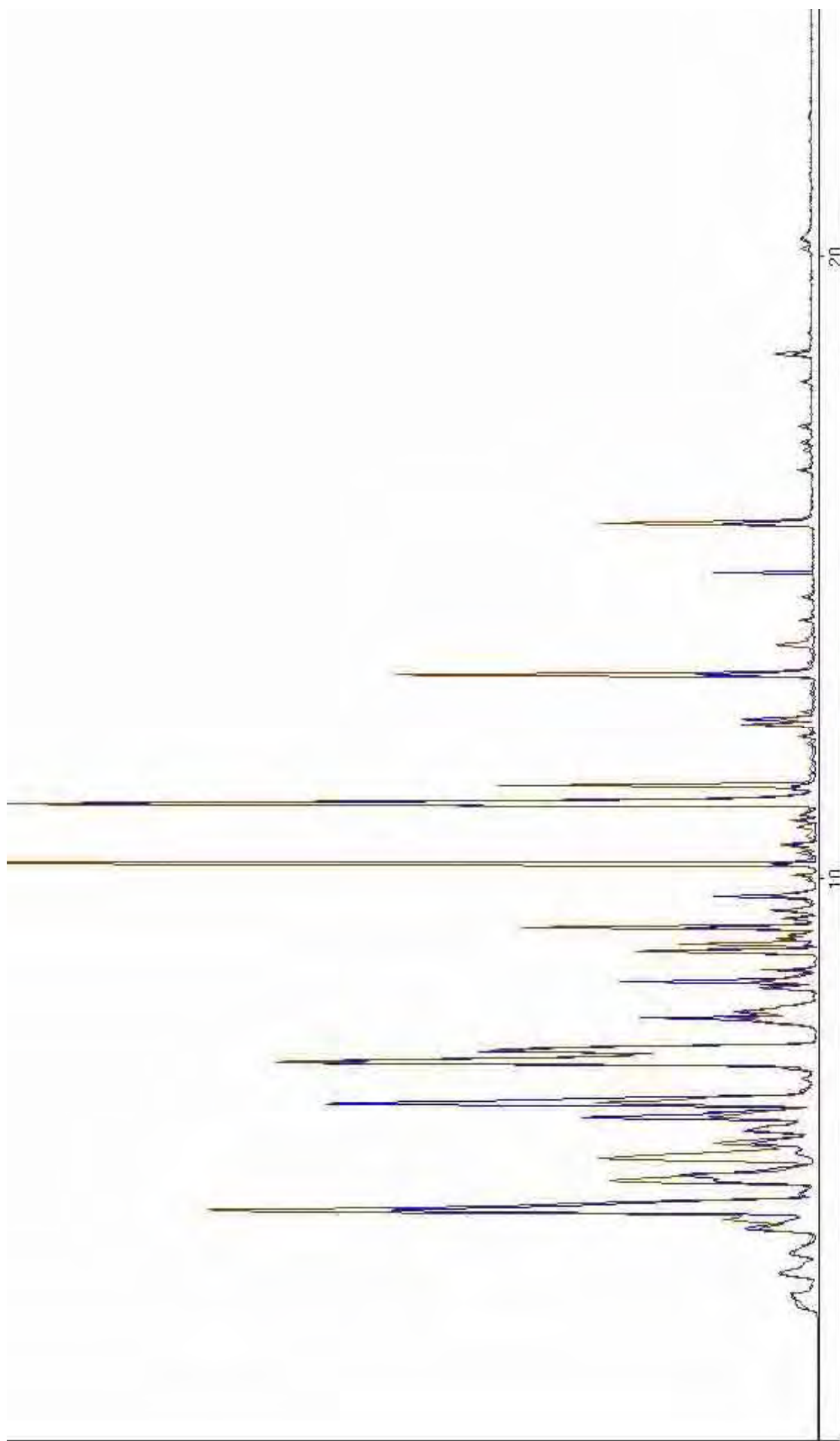


Figura 12 - Comparação entre os cromatogramas do queijo elaborado conforme o tratamento B (20% de *L. casei*), após 1 dia (azul) e 60 dias (marrom) de maturação.

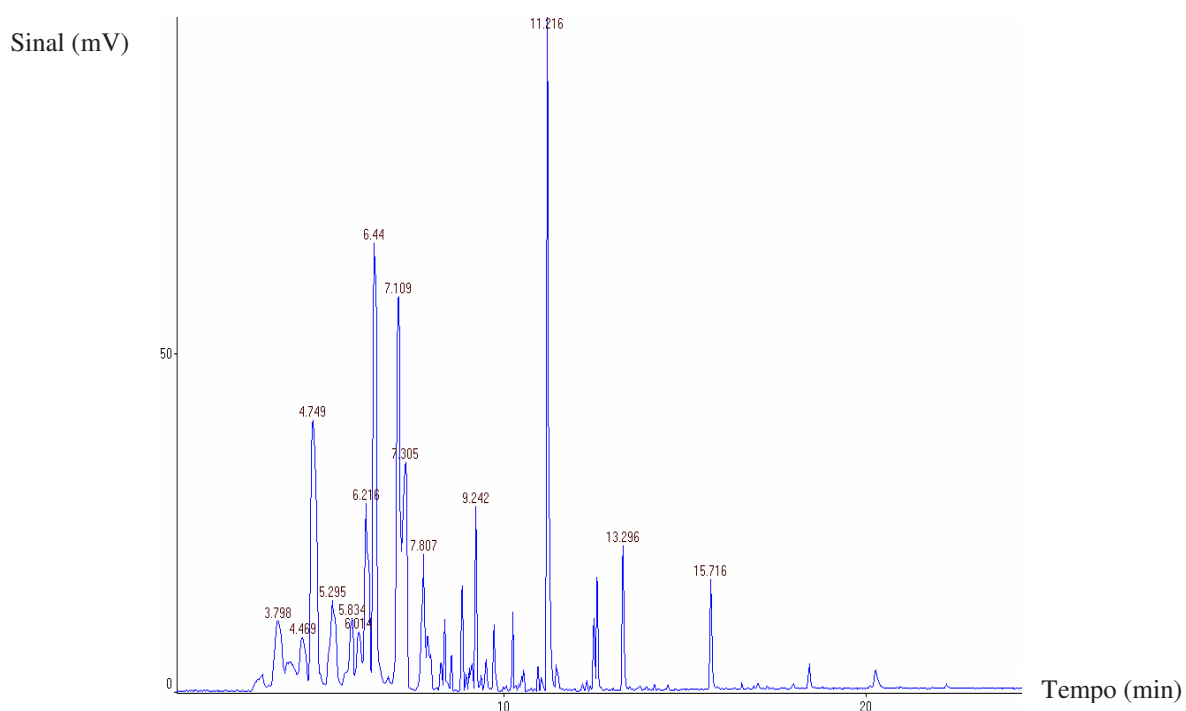


Figura 13 - Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento C (30% de *L. casei*), após 1 dia de maturação.

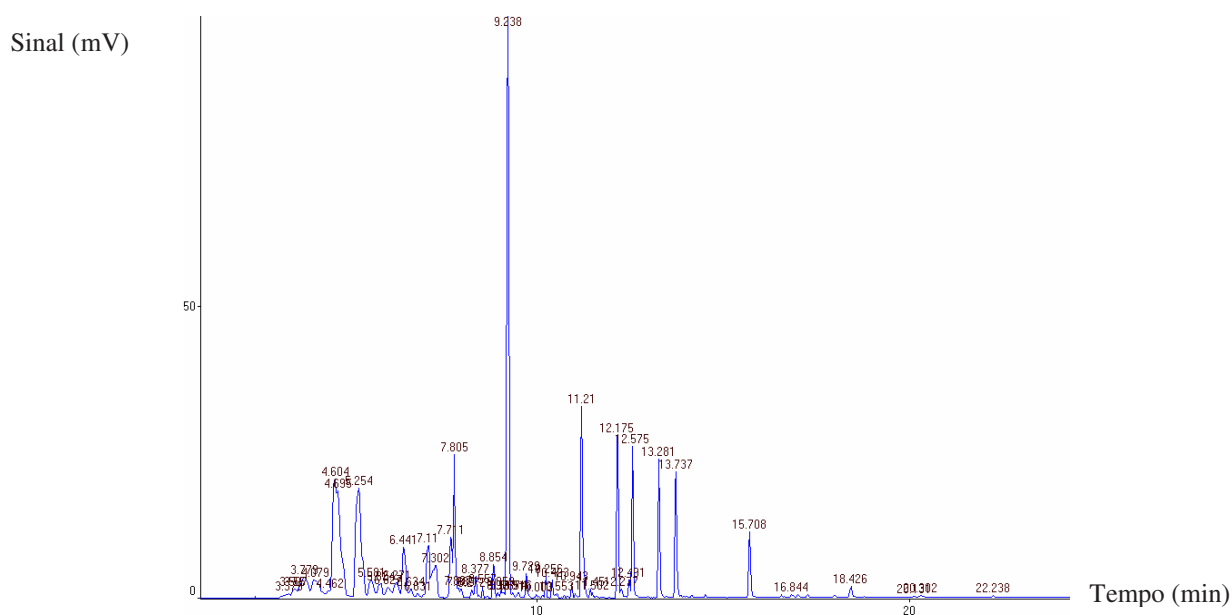


Figura 14 - Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento C (30% de *L. casei*), após 60 dias de maturação.

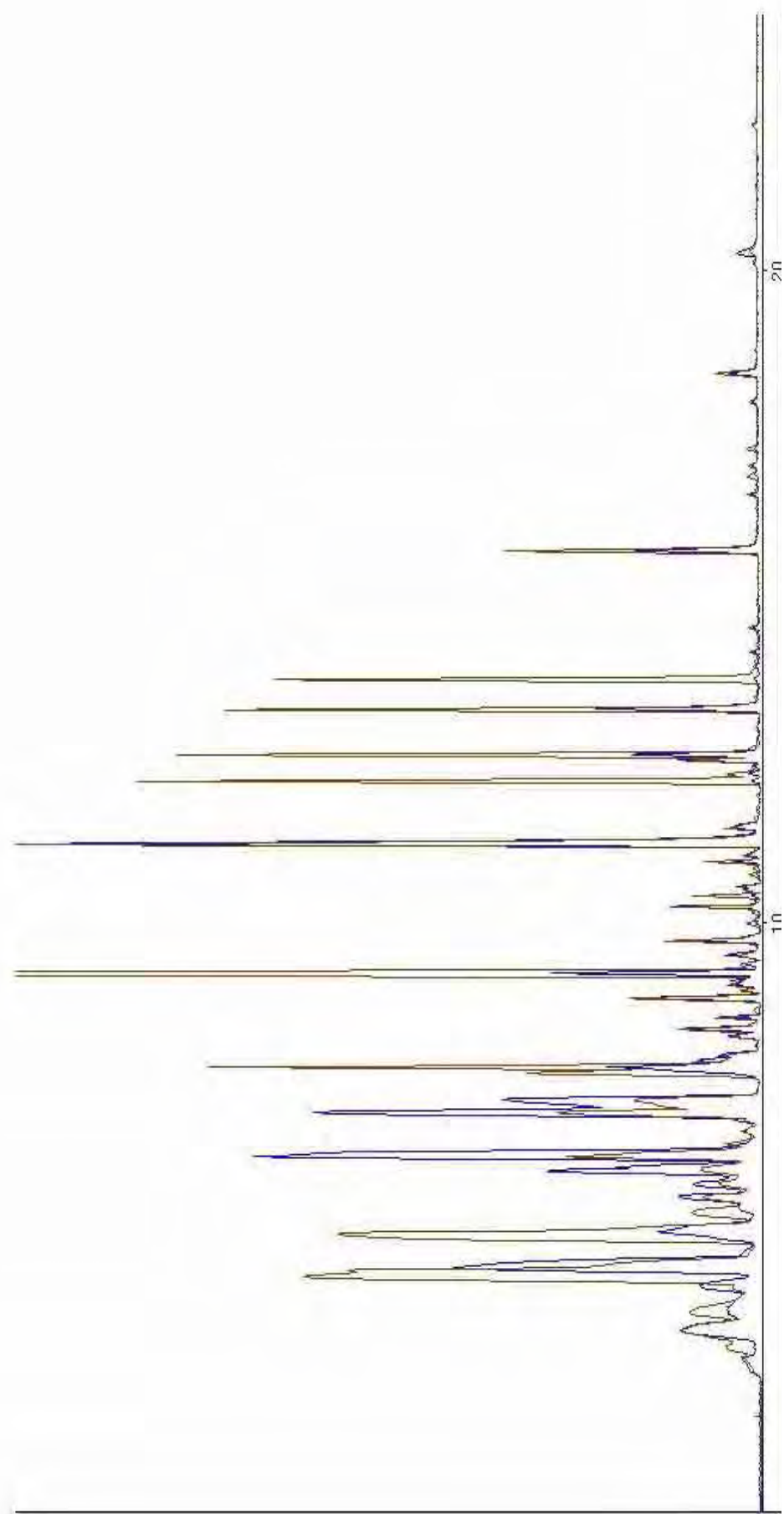


Figura 15 - Comparação entre os cromatogramas do queijo elaborado conforme o tratamento C (30% de *L. casei*), após 1 dia (azul) e 60 dias (marrom) de maturação.

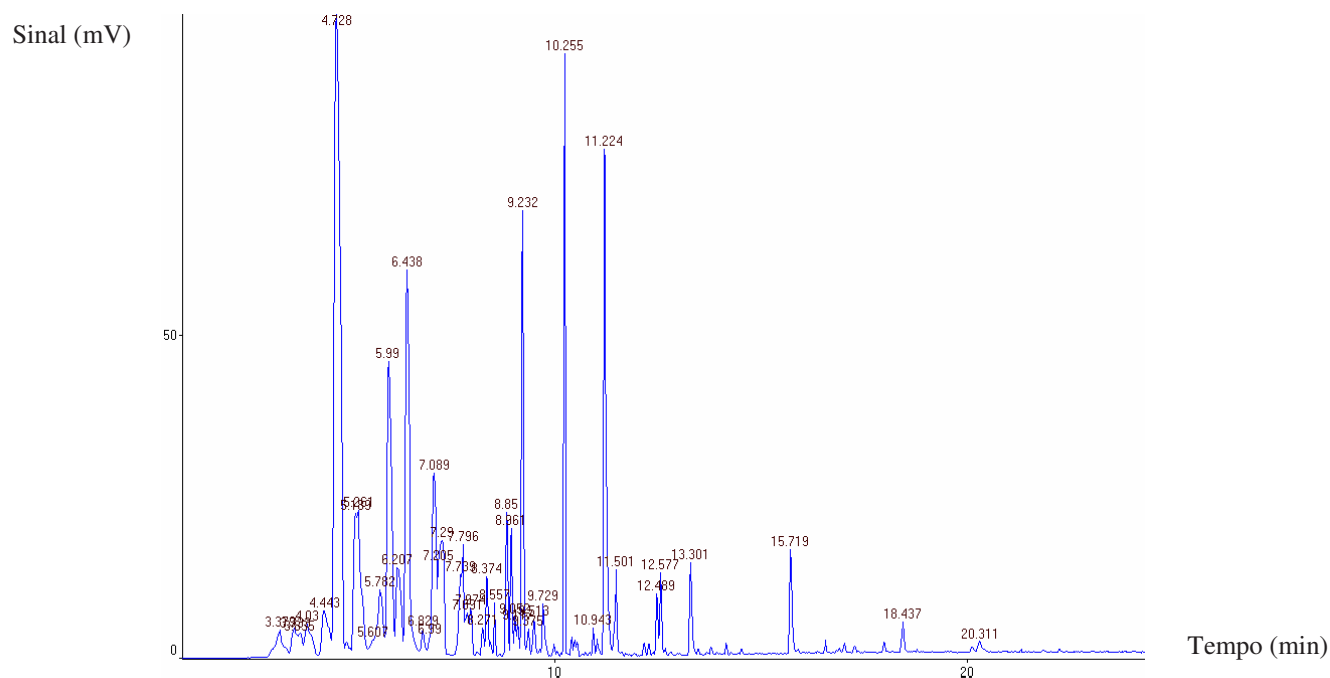


Figura 16 - Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento D (40% de *L. casei*), após 1 dia de maturação.

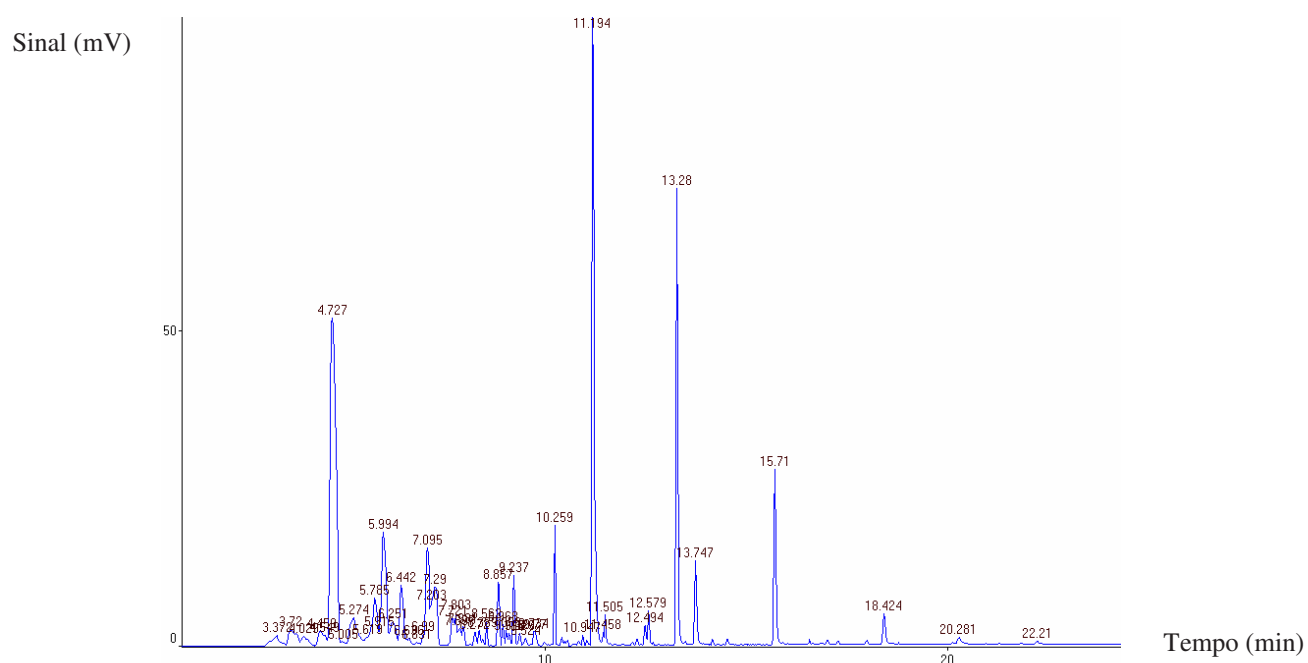


Figura 17 - Cromatograma do queijo elaborado conforme o tratamento D (40% de *L. casei*), após 60 dias de maturação.

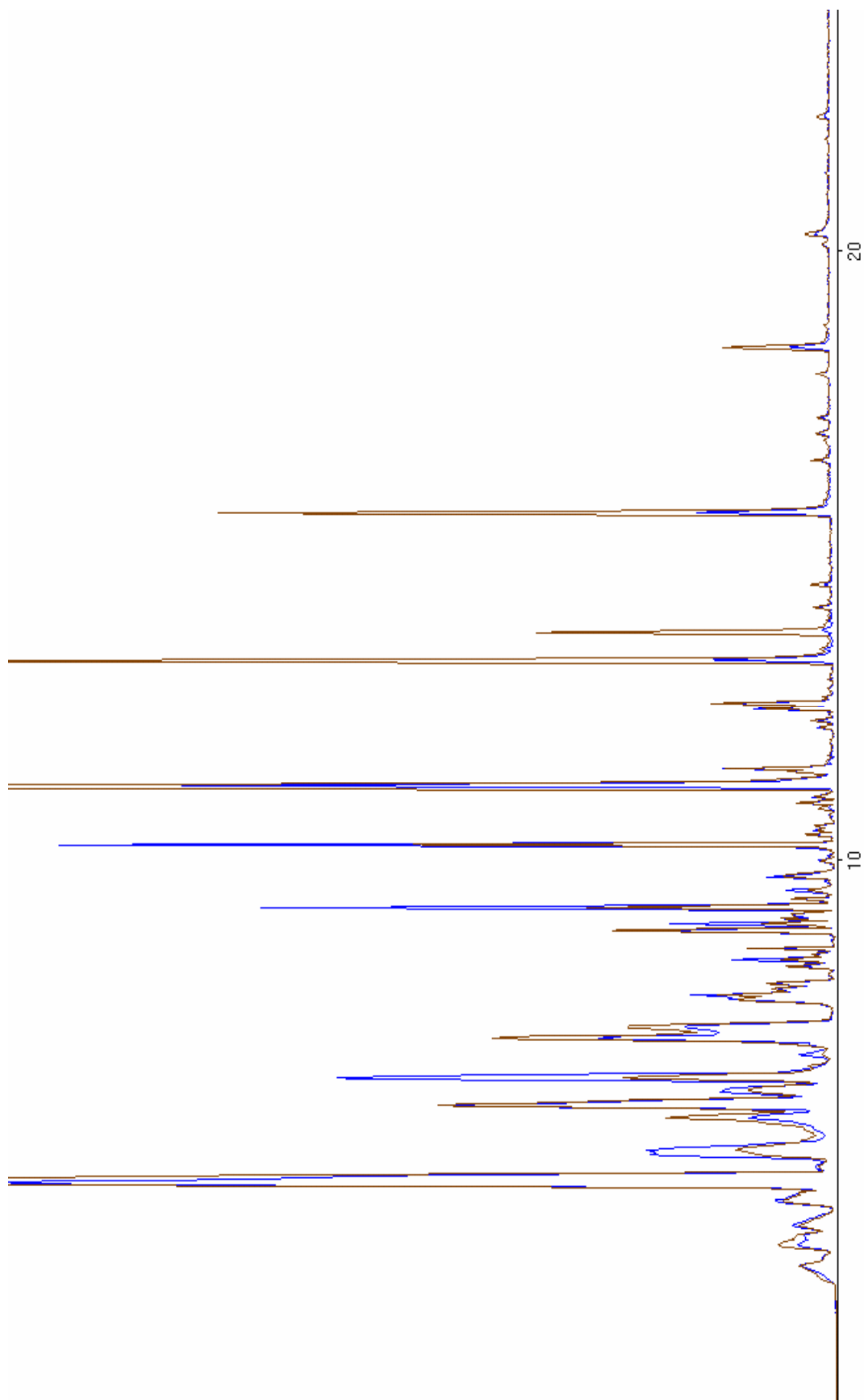


Figura 18 - Comparação entre os cromatogramas do queijo elaborado conforme o tratamento D (40% de *L. casei*), após 1 dia (azul) e 60 dias (marrom) de maturação.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- houve uma redução de pelo menos 25% de gordura em todos os queijos, o que permitiu classificá-los em “light”.
- os índices de extensão e profundidade da maturação foram mais elevados nos queijos em que foi utilizada a cultura adjunta do que no queijo controle, evidenciando a degradação contínua das proteínas em substâncias nitrogenadas solúveis e de baixo peso molecular.
- a proporção entre a cultura tradicional e a cultura adjunta utilizada no tratamento C (70 e 30%, respectivamente), resultou na maior proteólise durante a maturação, e conseqüentemente, em queijos com melhores características de textura quando comparados aos queijos controle.
- a adição da cultura adjunta influenciou positivamente na maturação dos queijos, sendo uma alternativa viável para melhorar a qualidade dos queijos com teor reduzido de gordura.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJOS. **Produção Brasil-queijos comuns em estabelecimentos sob inspeção federal em toneladas**. São Paulo, 2004. Não paginado.

AGRIDATA. **Tecnologia de fabricação de queijo Prato**. [Banco de Dados- Internet: www.agridata.mg.gov.br/pesquisas/tecnologia_queijo/patic_prato.htm acesso em 14/05/04].

ALAIS, C. **Science du Lait**: principes de techniques laitières. 3 ed. Paris: Societé D'Édition et Publicité Agricoles, Industrielles et commerciales, 1975. 608p.

ALBUQUERQUE, L.C. **Queijos no Brasil**. Juiz de Fora: EPAMIG/CEPE/ILCT, 1986. 140p.

AL-HOOTI, S.N.; SIDHU, J.S.; AL- SAQER, J.M.; AL-OTHMAN, A. Chemical composition and quality of date syrup as affected by pectinase/cellulase enzyme treatment. **Food Chemistry**, London, v. 79, n. 2, p. 215-220, 2002.

ALTING, A.C.; ENGELS, W.J.M.; van SCHALKWIJK, S.; EXTERKATE, F.A. Purification and characterization of cystathionine β -lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78; its possible role in flavor development in cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 4037-4042, 1995.

ALVES, G. **Parâmetros físico-químicos envolvidos na padronização e no rendimento do queijo Prato**: modelagem matemática. 1995. 136f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1995.

ANDRIOLI, A.S. Padrões físico-químicos de identidade e qualidade do “leite longa vida” (UHT) comercializado na cidade de Juiz de Fora. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, n. 321, p. 50-54, 2001.

ARDÖ, Y. Flavour and texture in low fat cheese. In: **Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk**. London: Chapman & Hall, 1997. p. 207-218.

ARORA, G.; LEE, B.H. Comparative studies on peptidases of *Lactobacillus casei* subspecies. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 2, p. 274-279, 1990.

ARORA, G.; CORMIER, F.; LEE, B. Analysis of odor active volatiles in Cheddar cheese headspace by multidimensional GC/MS/Sniffing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 3, p. 748-752.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Dairy Products. In: **Official Methods of Analysis**. 16. ed. Arlington: 1997.

AWAD, R.A.; ABDEL-HAMID, L.B.; EL-SHABRAWY, S.A. Texture and

microstructure of block type processed cheese with formulated emulsifying salt mixtures. **Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie**, London, v. 35, n. 1, p. 54-61, 2002.

BALDINI, V.L.S.; CAMPOS, S.D.S.; SILVA, A.T.; VAN DENDER, A.G.F.; LAJOLO, F.M. Alterações das características químicas e de textura do queijo tipo Prato ao longo do processo de maturação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, n. 304, p.53-59, 1998.

BANKS, J.M. Elimination of the development of bitter flavour in Cheddar cheese made from milk containing heat denatured whey protein. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Wembley, v. 41, n. 2, p. 37-41, 1988.

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

BANKS, J.M.; BRECHANY, E.; CHRISTIE, W.W. The production of low fat Cheddar type cheeses. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Wembley, v. 42, n. 1, p. 6-9, 1989.

BANKS, J.M.; HUNTER, E.A.; MUIR, D.D. Sensory properties of low fat cheddar cheese: effect of salt content and adjunct culture. **Journal of the Society of Dairy Technology**, Wembley, v. 46, n. 4, p. 119-123, 1993.

BARBIERI, G.; BOLZONI, L.; CARERI, M.; MANGIA, A.; PAROLI, G.; SPAGNOLI, S.; VIRGILI, R. Study of volatile fraction of Parmesan cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 5, p. 1170-1176, 1994.

BARROS, C.M.; CUNHA, C.R.; GALLINA, D.A.; VIOTTO, L.A.; VIOTTO, W.H. Efeito do uso de cultura adjunta (*Lactobacillus helveticus*) na proteólise, propriedades visco-elásticas e aceitação sensorial de queijo Prato light. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 11-18, 2006.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Food Chemistry**. D.Hadziyev (Ed). New York: Springer. 1986.

BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L.; COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4 – 7, p. 259-274, 1991.

BORGES, G.T.; SANTANA, A.P.; MESQUITA, S.Q.P.; SILVA, L.A.F.; NUNES, V.Q. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado, produzido e comercializado no estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 59-63, 2000.

BOSSET, J.O.; GAUCH, R.; MARIARCA, R.; KLEIN, B. Comparison of various sample treatments for the analysis of volatile compounds by GC-MS: application to Swiss Emmental cheese. **Mitteilungen aus dem Gebiete der**

Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, v. 86. p. 672-698, 1995. Apud: 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.

BOSSET, J.O.; SIEBER, R.; GALLMANN, P.U. Light transmittance: Influence on the shelf life of milk and milk products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, v. 300, p. 19 –39, 1995.

BOZZOLA, J.J.; RUSSEL, D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**, 2.ed., Boston: Jones & Bartlett, 1999. 670p.

BRASIL. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p. 3977, 11 mar. 1996.

BRASIL. Portaria nº 358 de 4 de setembro de 1997. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n.172, p.19690, 8 set.1997.

BRASIL. Portaria nº 29 de 13 de janeiro de 1998. **Regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 30 mar. 1998.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. **Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leite tipo “A”**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 20 set. 2002.

BRITO, M.P.; BRITO, J.R.; ARCURI, E.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. **Densidade Relativa**. [Bancodedadosinternet:www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/MAR1/arvore/MAR1/arvore/MAR1_196_21720039246.html] acesso em 20/03/06].

BRITO, M.A.V.P. Perigos dos resíduos antimicrobianos. **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA, p. 67-74, 1998.

BROOME, M.C.; HICKEY, M.W. Proteinase activity of selected non-starter lactobacilli. **Australian Journal Dairy Technology**, Highett, v. 46, n. 1, p. 12-18, 1991.

BUFFA, M.N.; TRUJILLO, A.J.; PAVIA, M.; GUAMIS, B. Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized, or high-pressure-treated goat's milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 11-12, p. 927-934, 2001.

CASE, R.A.; BRADLEY JR., 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: APHA, p. 327-404, 1985.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Ed Unicamp, 1999. 212p.

CHAPMAN, H.R. Standardization of milk for cheesemaking at research level. **Journal of the Society and Dairy Tecnology**, Londres, v. 34, n. 4, p. 147-152, 1981.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentárias**. Zaragoza: Ed Acibia, 1989. 346p.

CHRISTENSEN, J.E.; DUDLEY, E.G.; PEDERSON, J.A.; STEELE, J.L. Peptidases and amino acids catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, Amsterdam, v. 76, n. 1- 4, p. 217- 246, 1999.

CHRISTENSEN, T. M.I.E.; BECH, A.M.; WERNER, H. Methods for crude fractionation (extraction and precipitation) of nitrogen components in cheese. **In: Bulletin of The International Dairy Federation**. Chemical methods for evaluating proteolysis in cheese maturation. Bruxelas, n. 261, p. 4-9, 1991.

CICHOSCKI, A.J.; VALDUGA, E.; VALDUGA, A.T.; TORNADIJO, M.E.; FRESNO, J.M. Characterization of Prato cheese, a Brazilian semi-hard cow variety: evolution of physicochemical parameters and mineral composition during ripening. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 4 – 5, p. 329-336, 2002.

COGAN, T.M.; ACCOLAS, J.P. **Dairy Starter Cultures**. New York: WILEY-VCH, 1995. 277p.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução à Cromatografia em Fase Gasosa**. 4 ed. Campinas: UNICAMP, p. 141-174, 1990.

COLLIN, S.; OSMAN, M.; DELCAMBRE, S.; EL-ZAYAT, A.I.; DUFOUR, J.P. Investigation of volatile flavor compounds in fresh and ripened Domiati cheeses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 41, n. 10, p. 1659-1663, 1993.

COSTA, R.G.B.; LOBATO, V. Impactos tecnológicos causados na fabricação de queijos com resíduos de antibióticos no leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 336, p. 87-95, 2004.

COSTA, R.G.B.; LOBATO, V.; DE ABREU, L.R.; MAGALHÃES, F.A.R. Salga de queijos em salmoura: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 336, p. 41-49, 2004.

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.

CRITES, S.G.; DRAKE, M.A.; SWANSON, B.G. Microstructure of low-fat Cheddar cheese containing varying concentrations of sucrose polyesters. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 30, n. 7, p. 762-766, 1997.

DALGLEISH, D.G.; SPAGNUOLO, P.A.; GOFF, H.D. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, n. 12, p. 1025-1031, 2004.

DEAN, M. R.; BERRIDGE, N.J.; MABBITT, L.A. Microscopical observations on Cheddar cheese and curd. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 26, n. 1, p. 77-82, 1959.

DE JONG, L. Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency of "Noorhollandse Meshanger" cheese. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 30, n. 2/3, p. 242-253, 1976.

DELAHUNTY, C.M.; PIGGOT, J.R.; CONNER, J.M.; PATERSON, A. Low-fat Cheddar cheese flavour: flavour release in the mouth. **Trends in Flavour Research**, p. 47-53, 1994.

DIMOS, A.; URBACH, G.E.; MILLER, A.J. Changes in flavour and volatiles of full fat and low fat cheeses during maturation. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 10, p. 981-995, 1996.

DRAKE, M.A.; BOYLSTON, T.D.; SPENCE, K.D.; SWANSON, B.G. Improvement of sensory quality of reduced fat Cheddar cheese by *Lactobacillus* adjunct. **Food Research International**, v. 30, n. 1, p. 35-40, 1997.

ELABBOUDI, M.; ELSODA, M.; PANDIAN, S.; BARREAU, M.; TREPANIER, G.; SIMARD, R.E. Peptidase activity in debittering and non debittering strains of lactobacilli. **International Dairy Journal**, Barking, v. 2, p. 55-64, 1992

EL SODA, M.; MADKOR, S.A.; TONG, P.S. Adjunct cultures: recent developments and potencial significance to the cheese industry. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 609-619, 2000.

ENGELS, W.J.; VISSER, S. Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavour of different types of cheese. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 127-140, 1994.

ENGELS, W.J.M.; DEKKER, R.; JONG, C.; NEETER, R.; VISSER, S. 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.

EXTERKATE, F. A.; ALTING, A. C.; SLANGEN, C. J. Conversion of α_{s1} -casein (24-199) fragment and β -casein under cheese conditions by chymosin and starter peptidases. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 18, n. 1, p. 7-12, 1995.

FARKYE, N.Y.; FOX, P.F. Objective indices of cheese ripening. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 1, n. 2, p. 37-40, 1990.

FARKYE, N.Y.; FOX, P.F.; FITZGERALD, G.F.; DALY, C. Proteolysis and flavour development in Cheddar cheese made exclusively with single strain proteinase - positive or proteinase negative starters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 4, p. 874 – 880, 1990.

FENELON, M.A.; GUINEE, T.P. Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. **International Dairy Journal**, Barking, v. 10, n. 3, p. 151-158, 2000.

FERNANDEZ, L.; STEELE, J.L. Glutathione content of lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 5, p. 1233-1242, 1993.

FOLKERTSMA, B.; FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 11-12, p. 1117 – 1134, 1996.

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

FOX, P.F. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening: review. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 10, p. 522-535, 1988.

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

FOX, P.F. **Food chemistry**. Cork: University College, 1991. 201p.

FOX, P.F. Exogenous enzymes in dairy technology: a review. **Journal of Food Biochemistry**, Trumbull, v. 17, n. 2, p. 173- 199, 1993.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg Maryland: Aspen Publishers, Inc. 2000. 587p.

FOX, P.F.; LAW, J.; McSWEENEY, P.L.H.; WALLACE, J. Biochemistry of Cheese Ripening, In: FOX, P.F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**, v.1, London: Chapman & Hall, 1997, p. 389-439.

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

FOX, P.F., 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, 365p.

FOX, P.F.; O'CONNOR, T.P.; McSWEENEY, L.H.; GUINEE, T.P.; O'BRIEN, N.M.

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

FOX, P.F.; SINGH, T.K.; MCSWEENEY, P.L.H. Biogenesis of flavor compounds in cheese. In: MALIN, E.L.; TUNICK, M.H. (eds.). **Chemistry of structure – function relationships in cheese**. New York: Plenum Press, 1995. p. 59-98.

FOX, P. F.; STEPANIAK, L. Enzymes in cheese technology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 3, n. 4 – 6, p. 509-530, 1993.

FURTADO, M.M. **Desenvolvimento de um novo método analítico para a determinação de soro adicionado ao leite pasteurizado**. 1989. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1989.

FURTADO, M.M. **A Arte e a Ciência do Queijo**. São Paulo: Globo, 1991. 297p.

FURTADO, M.M.; CHANDAN, R.C. Efeito do teor de gordura na maturação de um queijo por *Penicillium caseicolum*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 38, n. 225, p. 19-22, 1983.

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

GINZINGER, W.; JAROS, D.; LAVANCHY, P.; ROHM, H. Raw milk flora affects composition and quality of Berg Kase. 3. Physical and sensory properties, and conclusions. **Lait**, Paris, v. 79, n. 4, p. 411 - 421, 1999.

GONZÁLEZ, V.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N.; BARUFFALDI, R. Influência do tamanho da amostra e da lubrificação na determinação da textura de queijo tipo Minas Frescal. XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Rio de Janeiro. **Anais**, v. 3, p. 2067-2069, 1998.

GOROSTIZA, A.; CICHOSKI, A.J.; VALDUGA, A.T.; VALDUGA, E.; BERNARDO, A.; FRESNO, J.M. 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.

GRIFFITH, R.; HAMMOND, E.G. Generation of Swiss cheese flavor compounds by the reaction of amino acids with carbonyl compounds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 3, p. 604-613, 1989.

GUINEE, T.P.; FOX, P.F. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In: FOX, P.F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. London: Elsevier, 1987, v. 1, p. 251-297.

HABIBI – NAJAFI, M.B.; LEE, B.H. Bitterness in cheese: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Lauderdale, v. 36, n. 5, p. 397-411, 1996.

HACHENBERG, H.; SCHMIDT, A.P. **Gas Chromatographic Headspace Analysis**, Wiley, New York, 1983. Apud: HARTE, F.; LUEDECKE, L.; SWANSON, B.; BARBOSA-CANOVAS, G.V. Low fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 1074-1082, 2003.

HARTE, F., LUEDECKE, L., SWANSON, B., BARBOSA-CANOVAS, G.V. Low fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 1074-1082, 2003.

HYNES, E.; OGIER, J.C.; BUCHET, A.D. Proteolysis during ripening of miniature .washed-curd cheeses manufactured with different strains of starter bacteria and a *Lactobacillus plantarum* adjunct culture. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 8, p. 587-597, 2001.

HORNE, J.; CARPINO, S.; TUMINELLO, L.; RAPISARDA, T.; CORALLO, L.; LICITRA, G. Differences in volatiles, and chemical, microbial and sensory characteristics between artisanal and industrial Piacentinu Ennese cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 6-9, p. 605-617, 2005

IBRAHIM, M. K. E.; FAHMI, A.H.; AMER, S.N.; MEHRIZ, A.E.M. Effect of increasing milk fat on the percentage distribution of milk constituents and added salt between Domiati cheese and whey. **Egyptian Journal of Dairy Science**, Cairo, v. 3, n. 1, p. 55- 62, 1957.

IDF– INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination of the total protein content of processed cheese products**. Bruxelles: FIL/ IDF, 1964, 3p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. v. 1. 533p.

IZCO, J. M.; IRIGOYEN, A.; TORRE, P.; BARCINA, Y. Effect of the activity levels of the added proteolytic enzyme mixture on free amino acids in ripening Ossau-Iraty cheese. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 881, p. 69–79, 2000.

JACK, F.R.; PATERSON, A. Texture of hard cheeses. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 3, n. 7, p. 160-164, 1992.

JAMESON, G.W. Cheese with less fat. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 45, n. 2, p. 93-98, 1990.

JENNESS, R.; PATTON, S. **Principles of Dairy Chemistry**. New York: John Wiley, 1959. 446p.

JOHNSON, A. E.; NURSTEN, H. E.; SELF, R. Aromatic hydrocarbons in foodstuffs and related materials. **Journal of Chemical Industry and Engineering**, v. 1, p. 10–12, 1969.

KALAB, M. Electron microscopy of foods. In: **Physical properties of foods**. IFT Basic Symposium Series. Ed. PELEG, M.; BAGLEY, E.B. Westport: AVI publishing Company, Inc. p. 43-104, 1983.

KANAWJIA, S. K.; RAJESH, P.; SABIKHI, L.; SINGH, S. Flavour, chemical and textural profile changes in accelerated ripened Gouda cheese. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 28, n. 6, p. 577-583, 1995.

KATSIARI, M.C.; VOUTSINAS, L.P. Manufacture of low-fat Feta cheese. **Food Chemistry**, London, v. 49, n. 1, p. 53-60, 1993.

KATSUDA, M.S.; MIGLIORANZA, L.H.S.; FERREIRA, S.H.P.; FONSECA, I.C.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.

KHALID, N.M.; MARTH, E.H. Lactobacilli – their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 10, p. 2669- 2684, 1990.

KLEIN, B.; GAUCH, R.; BOSSET, J.O. Comparison of four extraction, concentration, and injection techniques for volatile compounds analysis by GC-MS: an application to the study of volatile flavour of Swiss. Emmentaler cheese. **Dairy Research Institute**, October, 1990. Apud: 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.

KLEIN, N.; LORTAL, S. Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening. A review. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, n. 11, p. 751-762, 1999.

KONDYLI, E.; MASSOURAS, T.; KATSIARI, M.C.; VOUTSINAS, L.P. Free fatty acids and volatile compounds in low-fat Kefalograviera-type cheese made with commercial adjunct cultures. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n.1, p. 47-54, 2003.

KUNJI, E.R.; MIERAU, A.; HAGTING, B.; POOLMAN, B.; KONINGS, W.N. The proteolytic system of lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 70, n. 2 - 4, p. 187-221, 1996. Apud: LIN, S.Y. D.; CLARK, S.; POWERS, J.R.; LUEDECKE, L.O.; SWANSON, B.G. Thermal, ultra high pressure, and pulsed electric field attenuation of *Lactobacillus*: Part 2. **Agro Food Industry Hi-Tech**, Milano, v. 13, n. 1, p. 6-11, 2001.

KURTZ, F.E. The lipids of milk: composition and properties. In: WEBB, B.H.; JOHNSON, A.H.; ALFORD, J.A. **Fundamentals of Dairy Chemistry**, Westport: AVI, 1974. 873p.

LALOY, E.; VUILLEMARD, J.C.; SODA, M.E.; SIMARD, R.E. 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.

LANE, C.N.; FOX, P.F. Contribution of starter and added lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 7, p. 715-728, 1996.

LANE, C.N.; FOX, P.F.; WALSH, E.M.; FOLKERTSMA, B.; McSWEENEY, P.L.H. Effect of compositional and environmental factors on the growth of indigenous non starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. **Le Lait**, v. 77, p. 561-573, 1997.

LAW, B.A. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. London: Chapman & Hall, 1997.

LAW, B.A. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: **Cheese: chemistry, physics and microbiology**, v.1, London: Chapman & Hall, 1997. p. 365-392.

LAW, B.A. Flavor compounds in cheese organoleptic properties. **Perfumer and Flavourist**, v. 7, p. 9-12, 1982

LAW, B.A.; KOLSTAD, J.L. Proteolytic system in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 225-245, 1983. Apud: LIN, S.D.; CLARK, S.; POWERS, J.R.; LUEDECKE, L.O.; SWANSON, B.G. Thermal, ultra high pressure, and pulsed electric field attenuation of *Lactobacillus*: Part 2. **Agro Food Industry Hi-Tech**, Milano, v. 13, n. 1, p. 6- 11, 2001.

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

LAWRENCE, R.C.; GILLES, J.; CREAMER, L.K. The relationship between cheese texture and flavour. **New Zealand Journal Dairy Science Technology**, Palmerston North, v. 18, n. 3, p. 175-190, 1983.

LEE, S.K.; JOHNSON, M.E.; MARTH, E.H. Characteristics of reduced-fat Cheddar cheese made with added *Micrococcus* species LL3. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 25, n. 6, p. 552-558, 1992.

LEE, K.P.D.; WARTHENSEN, J.J. Preparative methods of isolating bitter peptides from Cheddar cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 4, p. 1058-1063, 1996.

LEITE, T.D.; PITARELLO, J.; PENNA, A.L.B. Avaliação da maturação do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 136-139, 2002.

LELIEVRE, J.; GILLES, J. The relationship between the grade (product value) and composition of young commercial Cheddar cheese. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, Palmerston North, v. 17, n. 1, p. 69-75, 1982.

LEMIEUX, L.; SIMARD, R.E. Bitter flavor in dairy products: a review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. **Lait**, Paris, v. 71, n. 5, p. 599-636, 1991.

LIN, S.D.; CLARK, S.; POWERS, J.R.; LUEDECKE, L.O.; SWANSON, B. G. Thermal, ultra high pressure, and pulsed electric field attenuation of *Lactobacillus*: Part 1. **Agro Food Industry Hi-Tech**, Milano, v. 12, p. 19-23, 2001.

LYNCH, C. M.; MUIR, D. D.; BANKS, J. M.; McSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. Influence of adjunct cultures of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* or *Lactobacillus plantarum* on Cheddar cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 1618-1628, 1999.

LUNA, J.A. CHAVEZ, M.S. Mathematical model for water diffusion during brining of hard and semi-hard cheese. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.1, p. 55-58, 1992.

MARIARCA, R.; BOSSET, J.O. Instrumental analysis of volatile (flavour) compounds in milk and dairy products. **Lait**, Paris, v. 77, n. 1, p. 13-40, 1997.

MARTÍNEZ-CUESTA, M.C.; PALENCIA, P.F.; REQUENA, T.; PELÁEZ, C. Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL 731 for flavor development in cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 8, p. 577-585, 2001.

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

McSWEENEY, P.L.H. The flavour of milk and dairy products. III. Cheese: taste. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 50, n. 4, p. 123-127, 1997.

McSWEENEY, P.L.H.; LYNCH, C.M.; WASH, E.M.; FOX, P.F.; JORDAM, T.M.; DRINAN, F. D. Role of non-starter lactic-acid bacteria in Cheddar cheese ripening. In: 4th Cheese Symposium. COGAN, T.M.; FOX, P.F.; ROSS, R.P. (Eds). **National Dairy Products Research Centre**. Teagasc, Fermoy, Co. Cork. 1995. p. 32-45.

McSWEENEY, P.L.H.; SOUSA, M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: A review. **Lait**, Paris, v. 80, n. 3, p. 293-324, 2000.

MELLO, F. Queijo Prato: Obtendo melhor qualidade e maior rendimento. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, set/out, p. 28-32, 2001.

MICHAELIDOU, A.; KATSIARI, L.P.; VOUTSINAS, L.P.; KONDYLI, E.; ALICHANIDIS, E. Effect of commercial adjunct cultures on proteolysis in low-fat Kefalograviera-type cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 9, p. 743-753, 2003.

MINUSSI, R.C. **Avaliação de métodos para a aceleração da maturação de queijo Prato**. 1994. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1994.

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

MISTRY, V.V. Low-fat fermented milk products. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 13., 2002, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2002.

MISTRY, V.V.; KASPERSON, K.M. Influence of salt on the quality of reduced fat Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 5, p. 1214-1221, 1998.

MOIO, L.; LANGLOIS, D.; ETIEVANT, P.X.; ADDEO, F. Powerful odorants in bovine, ovine, caprine and water buffalo milk determined by means of gas chromatography-olfactometry. **Journal of Dairy Research**, London, v. 60, p. 215-222, 1993.

MOLIMARD, P.; SPINNLER, H. Compounds involved in the flavor surface of mold-ripened cheese: origins and properties. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, p. 169-184, 1996.

MORENO, I.; DESTRO, M. T.; LERAYER, A.L.S.; VIALTA, A.; MAILLARD, M.B.; LORTAL, S. Identificação de compostos voláteis neutros de queijo prato de quatro origens por cromatografia gasosa - espectrometria de massas (GC-MS). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, n. 333, p. 149-153, 2003.

MORENO, I.; VIALTA, A.; LERAYER, A. L. S.; DESTRO, M. T. A importância da microbiota adicionada e autóctone na maturação de queijos Prato. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, Maio/Junho, n. 39, p. 59-62, 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.

NOGUEIRA, M.C.L.; LUBACHEVSKY, G.; RANKIN, S.A. A study of the volatile composition of Minas cheese. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 38, n. 5, p. 555-563, 2005

O' KEEFFEE, R.B.; FOX, P.F.; DALY, C. Proteolysis in cheddar cheese: influence of the rate of acid development during manufacture. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 42, p. 11-122, 1975.

OLIVEIRA, J.S. **Queijos: Fundamentos Tecnológicos**. São Paulo: Ed Unicamp, 1986. 233p.

OLSON, N.F.; JOHNSON, M. Light cheese products: characteristics and economics. **Food Technology**, Chicago, v. 44, n. 10, p. 93-96, 1990.

ORTIGOSA, M.; TORRE, P.; IZCO, J. M. Effect of pasteurization of ewe's milk and use of a native starter culture on the volatile components and sensory characteristics of Roncal cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p.1320–1330, 2001.

PACIULLI, S.O.D.; ABREU, L.R.; PINTO, S.M.; FURTADO, M.M. Proteólise em queijo tipo gorgonzola, elaborado com leite pasteurizado pelos sistemas HTST e ejetor de vapor. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 308, p. 24-30, 1999.

PARENTE, E.; COGAN, T.M. Starter cultures: general aspects. In **Cheese: chemistry, physics and microbiology**, Vol. 1: General Aspects, 3. ed, p. 123 – 148. FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H.; COGAN, T.M.; GUINEE, T.P. ed. London: Elsevier, 2004.

PARLIAMENT, T.H.; KOLAR, M.G.; RIZZO, D.J. Volatile components in Limburger cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 30, p. 1006-1008, 1982.

PEREDA, J.A.O.; RODRÍGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L.H.; CORTECERO, M.D.S. **Tecnología de alimentos: alimentos de origem animal**. v. 2. Porto Alegre: Ed Artmed, 2005. 279p.

PEROTTI, M.C.; BERNAL, S.M.; MEINARDI, C.A.; CANDIOTI, M.C.; ZALAZAR, C.A. Substitution of natural whey starter by mixed strains of *Lactobacillus helveticus* in the production of Reggiano Argentino cheese. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 1, p. 45-51, 2004.

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

PETERSON, S.D.; MARSHALL, R.T. Nonstarter lactobacilli in Cheddar cheese: A

review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 6, p. 1395-1410, 1990.

PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FERREIRA, M. Discriminate analysis of the volatile fraction from “Terrincho” ewe cheese: correlation with flavour characteristics. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, n. 5, p. 455-464, 2004.

PRENTICE, J.H. Cheese rheology. In: FOX, P.H. (Ed), **Cheese chemistry, physics and microbiology**. Vol 1. General Aspects. London: Elsevier Applied Science, 1987, p.299 – 344.

PRIETO, B.; FRANCO, I.; FRESNO, J.M.; PRIETO, J.G.; BERNARDO, A.; CABALLO, J. Effect of ripening time and type of rennet (farmhouse rennet from Kid or commercial calf) on proteolysis during the ripening of León cow milk cheese. **Food Chemistry**, London, v. 85, n. 3, p. 389-398, 2004.

RETIL, C.; SGUEDONI, A.; JULIANO, A.M.M. Coalhos e coagulantes. **Leite e Derivados**, São Paulo, v. 2, n. 7, p. 27-33, 1992.

RIJNEN, L.; BONNEAU, S.Y.; YVON, M. Genetic characterization of major lactococcal aromatic aminotransferase and its involvement in conversion of amino acids to aroma compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 11, p. 4873-4880, 1999.

RODRÍGUEZ, J. Recent advances in the development of low-fat cheeses. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 9, n. 6, p. 249-254, 1998.

ROEFS, S.P.F.M.; WALSTRA, P.; DALGLEISH, D.G.; HORNE, D.S. Preliminary note on the change in casein micelles caused by acidification. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 119 – 122, 1985.

ROHM, H.; JAROS, D. Colour of hard cheese 1. Description of colour properties and effects of maturation. **Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung Forschung**, Berlin, v. 203, n. 3, p. 241-244, 1996.

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

SABLE, S.; COTTENCEAU, G. Current knowledge of soft cheeses flavor and related compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n.12, p. 4825-4836, 1999.

SCOLARI, G.; VESCOVO, M. Lysis of *Lactobacillus casei* 5Mn 373 accelerates Grana cheese ripening. **European Food Research Technology**, v. 220, n. 5-6, p. 477-482, 2005.

SCOTT, R. **Cheesemaking operations**. 2. ed, New York: Elsevier, 1986. 205p.

SCOTT, R.; ROBINSON, R.K.; WILBEY, R.A. **Fabricación de queso**. 2. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 2002. 488p.

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

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.; 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, A.T.; MORENO, I.; VAN DENDER, A.G.F.; VIALTA, A. Efeito da redução do teor de gordura na população microbiana e na formação de “flavour” do queijo. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, Março/ Abril, n. 50, p. 58-61, 2004.

SILVA, A.T.; VAN DENDER, A.G.F.; BALDINI, V.L.S. Perfil eletroforético do queijo tipo Prato obtido com incorporação de enzimas proteolíticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 309, p. 150-156, 1999.

SILVA, A.T.; VAN DENDER, A.G.F.; CAMPOS, S.D.S. Padronização de metodologia para avaliação da textura durante a maturação de queijo tipo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 309, p. 146-150, 1999.

SILVA, C.R.B.; NABUCO, A.C.; MORETTI, B.R.; GARCIA, G.A.C.; PENNA, A.L.B. Caracterização físico-química de queijo prato fabricado a partir de leite semi-desnatado. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 6., 2005, Campinas. **Anais...** São Paulo: UNICAMP, 2005.

SILVA, M.H.; SANTANA, A.F.; MAIA, P.C.C.; FARIAS, L.O.; BENTES, R.M.; MELO, S.A.; JESUS, N.M.; GOUVÊA, J.A.G.; DELFINO, N.C. Avaliação físico-química do leite pasteurizado integral proveniente de micro-usinas e comercializado no estado da Bahia. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, n. 335, p. 25-27, 2003.

SILVA, P.H.F.; PEREIRA, D.B.C.; OLIVEIRA, L.L.; COSTA JÚNIOR, L.C.G. **Físico-Química do Leite e Derivados: Métodos Analíticos**. Juiz de Fora: Oficina de Impressão, 1997. 190p.

SIQUEIRA, J.F.M. **Efeito da variação do teor de gordura do leite na composição e no rendimento do queijo Minas padronizado**. 1984. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.

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

SZCZESNIAK, A.S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 13, n. 4, p. 215-225, 2002.

SZCZESNIAK, A.S. Textural perceptions and food quality. **Journal of Food Quality**, Westport, v. 14, n. 1, p. 75-85, 1991.

THOMAS, T.D.; MILLS, O.E. Proteolytic enzymes of starter bacteria. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 255-273, 1981.

THOMAS, T.D.; PEARCE, K.N. Influence of salt on lactose fermentation and proteolysis in Cheddar cheese. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, Palmerston North, v. 16, n. 3, p. 253 - 259, 1981.

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

TUNICK, M.H.; MACKEY, K.L.; SHIEH, J.J.; SMITH, P.W.; COOKE, P.; MALIN, E.L. Rheology and microstructure of low-fat Mozzarella cheese. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 3, n. 7, p. 649-662, 1993.

TUNGJAROENCHAI, W.; DRAKE, M.A.; WHITE, C.H. Influence of adjunct cultures on ripening of reduced fat Edam cheeses. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 10, p. 2117-2124, 2001.

UNEMOTO, Y.; SATO, Y.; KITO, J. Direct observation of fines structures of bacteria in ripened Cheddar cheese by electron microscopy. **Journal of Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, n. 42, p. 227-232, 1978.

UNESP- FVAV- ESTAT: **Sistema para análises estatísticas** (v. 2.0).Campus de Jaboticabal- Polo Computacional/Departamento de Ciências Exatas.

URBACH, G. The flavour of milk and dairy products. II. Cheese: contribution of volatile compounds. **Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 50, n. 3, p. 79 - 89, 1997.

USTUNOL, Z.; KAWACH, K.; STEFFE, J. Rheological properties of Cheddar cheese as influenced by fat reduction and ripening time. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n. 6, p. 1208-1210, 1995.

VAKALERIS, D.G.; PRICE, W.V. A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 42, n. 2, p. 264-276, 1959.

VAN DENDER, A.G.F.; SEVILHANO, L.A.; YOTSUYANAGI, K.; JARDIM, D.C.P. 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.

VARNAN, A.H.; SUTHERLAND, J.P. Queso. In: **Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. 291-363p.

VECHIA, C.D.; ZAGO, D.; SCHOFFEN, V.; KATSUDA, M.S. Avaliação química e físico-química do queijo tipo Prato adicionado de *Bifidobacterium lactis* durante a maturação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 60, n. 345, p. 268-271, 2005.

VENEMA, D.P.; HERSTEL, H.; ELENBAAS, H.L. Determination of the ripening time of Edam and Gouda cheese by chemical analysis. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 215-226, 1987.

VISSER, S. Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 65-88, 1981.

VISSER, J. Factors affecting the rheological and fracture properties of hard and semi-hard cheese. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 268, p. 49-61, 1991.

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

WALLACE, J.M.; FOX, P.F. Effect of adding free amino acids to Cheddar cheese curd on proteolysis, flavour and texture development. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, n. 2-3, p. 157-167, 1997.

WALLACE, J.M.; FOX, P.F. Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: a review. **Food Chemistry**, London, v. 62, n. 2, p. 217-224, 1998.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 8, p. 1965-1979, 1990.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. New York: John Wiley, 1984. 423p.

WALSTRA, P.; van VLIET, T. Rheology of cheese. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, n. 153, p. 22-27, 1982.

WELSH, F.W.; MURRAY, W.; WILLIAMS, R.E. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 9, n. 2, p. 105-169, 1989.

WIJESUNDRA, C.; WATKINS, P. Milk fat is essential of development of Cheddar cheese flavor. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 55, n. 2, p.86, 2000.

WILKINSON, M.G.; MEEHAN, H.; STANTON, C.; COWAN, C. Marketing cheese with a nutrient content **Bulletin of the International Dairy Federation**, Brussels, v.

363, p. 39-45, 2001.

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

WONG, D.W.S.; CARMIRAND, W.M.; PAVLAT, A.E. Structures and functionalities of milk proteins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Lauderdale, v. 36, n. 8, p. 807-844, 1996.

WOOD, A.F.; ASTON, J.W.; DOUGLAS, G.K. A coldtrap method for the collection and determination of headspace compounds from cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 49, n. 1, p. 42-47, 1994.

YVON, M.; RIJNEN, L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 11, n. 4-7, p. 185-201, 2001.