UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus Araraquara
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES CULTURAS LÁCTEAS NA FABRICAÇÃO DA MUSSARELA DE LEITE DE BÚFALA.

LUIS EDUARDO FAGIAN SERRANO

ARARAQUARA - SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES CULTURAS LÁCTEAS NA FABRICAÇÃO DA MUSSARELA DE LEITE DE BÚFALA.

LUIS EDUARDO FAGIAN SERRANO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição – Área: Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Profª. Drª. MARIA REGINA BARBIERI DE CARVALHO

ARARAQUARA - SP
2008

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Serrano, Luis Eduardo Fagian
S487u Utilização de diferentes culturas lácteas na fabricação da mussarela de leite de búfala. / Luis Eduardo Fagian Serrano. – Araraquara, 2008.
66 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: Maria Regina Barbieri de Carvalho

. 1.Mussarela. 2.Fermento lácteo. 3.Queijo – Análise sensorial. 4.Proteólise. I.Carvalho, Maria Regina Barbieri de, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Profa. Dra Maria Regina Barbieri de Carvalho
(orientadora)

_____

Prof. Dr. Humberto Tonhati
(membro titular)

_____

Prof. Dr. Felipe Shindy Aiura
(membro titular)

_____

Profa. Dra. Marta Regina Verruma Bernardi
(membro suplente)

_____

Prof. Dr. José Paschoal Batistuti
(membro suplente)

Araraquara, 30 de junho de 2008.

EPÍGRAFE

Imagine que não exista
nenhum paraíso,

É fácil se você tentar.

Nenhum inferno abaixo de nós,

Sobre nós apenas o
firmamento.

Imagine todas as pessoas
vivendo pelo hoje...

Imagine que não exista
nenhum país,

Não é difícil fazê-lo.

Nada porque matar ou pelo
que morrer,

Nenhuma religião também.

Imagine todas as pessoas

vivendo a vida em paz...

Imagine não haver propriedade,

Eu me pergunto, se você
consegue?

Nenhuma necessidade de
ganância ou fome,

Uma fraternidade de homens.

Imagine todas as pessoas

Compartilhando o mundo todo.

Você pode dizer que sou um
sonhador

Mas eu não sou o único!

Eu espero que algum dia você nos
siga!

E o mundo será um só.

John Lennon

DEDICATÓRIA

Aos meus avós,
pelo amor incondicional, ensinamentos
e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A DEUS... por tudo.

A minha mãe e meu pai, sem os quais eu não estaria aqui.

As minhas tias, por terem um dia acreditado em mim.

Aos meus maninhos, Caco, Sabino e Gui, pela confiança e companheirismo que só mesmo os laços de família eterna, configuram. Ainda ao primeiro por ter me propiciado as sobrinhas maravilhosas que tenho e ao segundo por ser eterno conselheiro e ter ouvidos tão atentos e sempre prontos.

Ao Vitor Pansani e Mário Bento pelo bem querer.

À Celi, por motivar-me tanto nessa existência.

A Professora Dra., PhD e Mãe Maria Regina Barbieri de Carvalho pela orientação, atenção, ensinamento, fé e amizade e também ao seu marido "Pepino" pelas horas de paciência e até atoleiros na fazenda.

Ao Professor Dr. Felipe S. Aiura pelo aprendizado e companheirismo no laboratório.

A Professora Dra. Marta R. Verruma Bernardi pelas aulas sobre análise sensorial, auxílio e boa vontade.

À Tânia Mara Azevedo Lima, técnica acadêmica , pelo suporte técnico e pela amizade.

A zootecnista Luciana de Oliveira Lázaro ou "Berla" pelo trabalho árduo e dedicado, simpatia e almoços, bezerros na "casinha tropical" e amizade.

Ao professor Dr. Valdir Neves e seu "afilhado" e meu grande amigo Gengis Kami Ferro Kamimura, que me aproximaram da área de ciências dos alimentos.

A Professora Dra. Edwil Ap. de Lucca Gattás pelos ensinamentos e estágio-docência.

A Professora Dra. Maria da Penha Longo Mortatti Catanozi, pela ajuda e conhecimentos para realizar as análises microbiológicas.

Ao professor Dr. José Paschoal Batistuti, pelo auxílio na qualificação.

Ao Rafael C. Trajano Lopes pela doação do leite de búfala e disponibilidade das instalações para fabricação da mussarela. Ao técnico em laticínio Arlindo Pessoa dos Santos pelo auxílio na elaboração dos queijos.

Às queridas funcionárias e amigas da seção de pós graduação: Cláudia Lúcia Molina, Laura Rosim e Sônia Ornelas Silva, por todas as dicas, aviso, lembretes, emails, duras, toda ajuda, preocupação e, principalmente, por sempre lembrarem que atrás do número de matrícula existem pessoas.

Ao amigo e phD Leandro Seiji pelos conselhos sinceros, ouvidos atentos e ajuda.

À amiga e doutoranda Ana Claudia Elias pela amizade sincera, pelas dicas e pelos adoráveis bate-papos.

Às amigas mestras, Francine Sobral e Érika B. Jung pela valiosa amizade e pelos aprendizados conjuntos.

À amiga e Dra. Natália S. Koyama, que muito me ensinou na época de escrever o projeto.

Aos Professores do DAN, por tudo que me ensinaram não só nas disciplinas.

Aos funcionários da Biblioteca da FCFAr_UNESP: Moacir, Ana Cristina, Sônia, Maximiliano, Irani e Maria Júlia.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição da FCFAr-UNESP, especialmente às porteiras Tiana e Olívia.

Às empresas: Chr-Hansen(em especial à Simone Campos) e Danisco pela atenção e fermentos fornecidos em quantidade adequada à realização do projeto.

A Deus, novamente, por ter colocado tais pessoas em meu caminho.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS..... XI
LISTA DE FIGURAS..... XIV
RESUMO..... XV
SUMMARY..... XVI
1. INTRODUÇÃO..... 17
2. REVISÃO DA LITERATURA..... 18
2.1. Bubalinocultura..... 18
2.2. Composição e contaminação microbiana do leite de búfala..... 19
2.3. Mussarela de leite de búfala..... 21
2.4. Culturas lácteas..... 23
2.5. Transformações bioquímicas do queijo..... 27
2.6. Alterações na textura..... 30
3. OBJETIVOS..... 32
3.1. Gerais..... 32
3.2. Específicos..... 32
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 33
4.1. Material..... 33
4.2. Métodos..... 33
4.2.1. Preparo das culturas lácteas..... 33
4.2.2. Preparo da salmoura..... 33
4.2.3. Preparo líquido de armazenamento..... 33
4.2.4. Fabricação dos queijos..... 34
4.2.5. Análises físicas e químicas..... 34
4.2.6. Análise instrumental de textura..... 36

4.2.7. Recuperação de gordura e proteína e rendimento dos queijos 36

4.2.8. Análises microbiológicas..... 37

4.2.9. Análise sensorial..... 37

4.2.10- Análise estatística..... 38

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 39

5.1. Composição do leite, soro, água de filagem e queijo e rendimentos..... 39

5.2. Análise do líquido de armazenamento..... 41

5.3. Composição dos queijos..... 43

5.4. Evolução da proteólise..... 48

5.5. Avaliação instrumental da textura..... 52

5.6. Análise microbiológica..... 54

5.7. Análise sensorial..... 55

6. CONCLUSÕES 58

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 59

LISTA DE TABELAS

Tabela **Página**

1 Principais características dos *Lactobacillus e Streptococcus* **24**

2 Composição física e química do leite de búfala utilizado na fabricação da mussarela..... **39**

3 Porcentagens de proteína e gordura do soro, da água de filagem e da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos lácteos..... **40**

4 Recuperação de gordura e proteína do soro, da água de filagem e da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos lácteos..... **40**

5 Análise de variância e coeficiente de variação (CV) do pH e cloreto do líquido de armazenamento da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenada durante trinta e quatro dias..... **42**

6 Valores de pH e porcentagem de cloreto do líquido de armazenamento da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenada durante o período de trinta e quatro dias..... **42**

7 Análise de variância e coeficiente de variação (CV) para pH e para as porcentagens de cinzas e de cloreto da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenada por trinta e quatro dias..... **44**

8 Análise de variância e coeficiente de variação (CV) para umidade, extrato seco total (EST), gordura, gordura no extrato seco (GES), proteína total da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenadas por 34 dias..... **44**

9 Valores médios obtidos para as porcentagens de umidade, extrato seco total (EST), gordura, gordura no extrato seco (GES), proteína e cinzas da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenada por 34 dias..... **47**

10 Análise de variância e coeficiente de variação (CV) para nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel (NS), nitrogênio não protéico (NNP), índice de proteólise (IP) e índice de profundidade da proteólise (IPP)

da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos, durante 34 dias de armazenamento..... **49**

11 Análise de variância e coeficiente de variação (CV) para os atributos de textura da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos, durante 34 dias de armazenamento..... **52**

12 Resultados das análises microbiológicas de amostras de mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenadas por 34 dias..... **55**

13 Valores médios para a avaliação sensorial de amostras de mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenadas por 34 dias..... **56**

LISTA DE FIGURAS

Figura **Página**

1 Evolução do pH dos queijos elaborados com diferentes fermentos durante 34 dias de armazenamento..... **45**

2 Índice de proteólise da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos durante 34 dias de armazenamento..... **50**

3 Índice de profundidade da proteólise da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos durante 34 dias de armazenamento..... **51**

4 Valores médios para o parâmetro dureza da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos durante 34 dias de armazenamento..... **53**

5 Valores médios para o parâmetro elasticidade da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos durante 34 dias de armazenamento..... **54**

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a utilização de diferentes fermentos lácteos sobre a qualidade da mussarela de leite de búfala durante o processamento e armazenamento, determinando-se a composição e o rendimento dos queijos e as mudanças ocorridas nas características físicas e químicas e sensorial. Os queijos foram elaborados em forma de bola (80 g) em laticínio especializado. Foram considerados três fermentos lácteos na fabricação dos queijos.- Fermento 1 - *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbruckii* subesp. *bulgaricus* (TM81 - 50μ - Danisco); Fermento 2 - *Streptococcus salivarius* subesp *thermophilus* (STM4 - 200μ - Christian Hansen) e Fermento 3 - *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus helveticus* (TCC20 - 50μ - Christian Hansen) e quatro tempos de armazenamento a 8º C (4, 14, 24 e 34 dias). As porcentagens de gordura e proteína do leite, soro, água de filagem foram determinadas. Os queijos foram analisados quanto ao pH, composição física e química, frações nitrogenadas, índices de proteólise, índice de profundidade da proteólise e textura instrumental durante o armazenamento e análise microbiológica e teste de aceitação no final do período. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4, com três repetições. Os fermentos influenciaram significativamente ($p<0,05$) a composição dos queijos, mas não o rendimento. Todos os queijos apresentaram aumento do pH no final do armazenamento. As alterações no índice de proteólise foram significativas até 34 dias de armazenamento, e o índice de profundidade da proteólise foi dependente do tipo de fermento durante o armazenamento. A qualidade microbiológica dos queijos embalados com líquido e armazenados por 34 dias enquadrou-se nos padrões vigentes. Dentre os três fermentos utilizados, os queijos elaborados com o fermento 1 foram os que apresentaram maior acidez, umidade, menor teor de gordura e, associado à menor aceitação, parece ser o menos indicado para a fabricação da mussarela de leite de búfala.

Palavras chaves: mussarela, fermento lácteo, proteólise, armazenamento, análise sensorial.

SUMMARY

This paper had assessed the exploitation of different milky yeast about buffalo mozzarella cheese during the processing and storage, being determined the cheese composition, yield income and physical-chemical and sensorial changes occurred. The cheeses were produced on ball shaped of 80g in especialized dairy. Were taked into consideration three milky yeasts on cheese draw: Yeast 1 (F1) - *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* (TM81 - 50μ - Danisco); Yeast 2 (F2) - *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* (STM4-200μ - Cristian Hansen) and Yeast 3 (F3) - *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* (TCC20 -50μ - Cristian Hansen) and three times of storage at 10 ^{o}C (4, 14, 24 and 34 days). The fat and protein percentages of milk, whey and stretching of the curd were determined. In the cheese samples were determinated the pH, physical-chemical composition, nitrogenous fractions, proteolysis index, index of depth of proteolysis and instrumental texture during the storage and microbiological analysis and test of acceptance in the end of period. Experimental design was completely randomized in factorial analysis 3x4 (yeasts and storage days) with three repetitions. The yeasts influenced significantly the cheese composition, but not yield income. All cheese showed a rise in pH values at the end of storage. The alterations on the proteolysis index were significant up to 34 storage days, and the proteolysis depht index was dependent of yeast kind during the storage. The microbiological quality of cheeses packed with liquid and storage per 34 days followed the legal standards. Out of the three used yeasts, the cheese elaborated with the yeast 1 were the ones that presented higher acidity, humidity and lower fat, with associated to a minor acceptance, seems to be the least indicated for the manufacture of buffalo mozzarella cheese.

Key words: mozzarella cheese, milky yeast, proteolysis, storage, sensorial analysis.

1. INTRODUÇÃO

O queijo mussarela começou a ser produzido na Itália após o século XII com uso de leite de búfala e atualmente está difundido por todo o planeta. No Brasil, corresponde ao principal produto obtido a partir da bubalinocultura e possui um mercado específico com grande potencial de ampliação, e a otimização do processamento visa a melhoria na qualidade e redução de custos.

O fermento ou cultura láctea possui papel fundamental na fabricação de queijos. É o primeiro ingrediente adicionado ao leite e consiste em cultivos de bactérias convenientes, que proporcionam características próprias aos diferentes tipos de queijos.

Os efeitos do fermento lácteo sobre as características da mussarela de leite de búfala durante o processamento e armazenamento são avaliados com base em tentativas de erros e acertos na própria indústria. Esta realidade vem prejudicando o sistema de produção deste queijo devido às alterações na qualidade do produto acabado.

Do ponto de vista econômico, a utilização do soro-fermento elimina a aquisição de fermento lácteo, reduzindo os custos de produção. Entretanto, com o uso desta técnica não se obtêm uniformidade na produção, em função das alterações ocorridas na microbiota natural do soro-fermento, além deste ser veículo de contaminação.

Assim, é oportuno a avaliação dos processamentos com diferentes fermentos na qualidade da mussarela de leite de búfala, a fim de otimizar o processo de obtenção de um queijo com sabor típico de origem e com tecnologia apropriada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Bubalinocultura

A finalidade principal da criação de búfalos em algumas regiões do Brasil é a produção leiteira (VERRUMA & SALGADO, 1994). O Brasil é um dos países que consome internamente sua produção de leite, principalmente na forma de derivados. Impulso decisivo na ampliação dessa exploração reside na utilização de tecnologias de ponta, avaliando o comportamento do leite e a elaboração de novos produtos derivados para criar mercados potenciais (PRUDENCIO, 2006).

O rebanho bubalino mundial desempenha importante papel na produção de proteína de origem animal, especialmente nos países do terceiro mundo. Estima-se que o aumento deste rebanho seja da ordem de 10% ao ano, o que reflete o crescente interesse mundial nesta espécie (SAMPAIO NETO et al, 2001). A produção mundial de leite de búfala aumentou 48,5% no período de 1992 a 2002. Estima-se que a produção anual seja de 70,7 milhões de toneladas, encontrando-se mais concentrada na Índia, Paquistão e Nepal, que respondem por 94% da produção mundial (IDF, 2002). Quantidades significativas de leite também são produzidas na China e no Egito, sendo que neste país, a produção supera a de leite de vaca (BOMFIM, 2005).

Com relação a América do Sul, o Brasil ocupa o primeiro lugar quanto ao tamanho do rebanho (GUTIERREZ et al, 2005), com aproximadamente 1,15 milhões de cabeças, concentrado majoritariamente na região Norte, com especial destaque aos Estados do Pará e Amapá e apresenta uma trajetória muita lenta de crescimento desde 1997, ano em que foi observada a menor população de bubalinos desde 1990 no Brasil (IBGE, 2005).

Os bubalinos diferem de taurinos e zebuínos em vários aspectos, como os hábitos comportamentais e as características de interação com o meio ambiente. As funções metabólicas desses animais não estão bem descritas como nos bovinos, havendo carência de informação (SOUZA et al, 2000). Entre as características inerentes a espécie, destacam-se a produtividade em leite, carne e utilização para o trabalho na propriedade (MOREIRA et al, 1994).

A raça Murrah é a de maior aptidão leiteira na Índia e no Paquistão, sendo considerada a mais importante e eficiente produtora de leite e gordura. No Brasil, esta raça é amplamente criada, entretanto, poucos são os relatos sobre os fatores de ambiente que influenciam sua produção (SAMPAIO NETO et al, 2001).

O aumento da demanda de derivados de leite de búfala nas últimas décadas valorizou a espécie bubalina na pecuária leiteira mundial. Os produtores brasileiros notaram o potencial de mercado e passaram a investir nesta criação. Basicamente, os investimentos foram aplicados em melhorias nas condições e/ou práticas de manejo, que resultaram em melhor desempenho das características produtivas e reprodutivas (SENO et al, 2007). A industrialização do leite bubalino no Brasil é uma realidade, pois, além do queijo mussarela, diversos laticínios têm elaborado vários derivados (queijo frescal, ricota, bebida láctea) a partir deste leite (GUERRA, 2005).

2.2. Composição e contaminação microbiana do leite de búfala

A composição física e química do leite de búfala tem sido estudada em diversos países, como a Índia (DUBEY et al, 1997), Itália (SPANGHERO & SUSMEL, 1996), Bulgária (PEEVA, 1997), Venezuela (BRIÑEZ, 2000) e Brasil (MACEDO et al, 1997; FARIA et al, 1997; TONHATI, 1999). As suas características permitem fácil identificação sob o ponto de vista físico e químico e organoléptico. Seu sabor é peculiar, ligeiramente adocicado, é mais branco do que o leite bovino, em virtude da ausência quase que total de caroteno (COELHO et al, 2004). As quantidades elevadas de proteínas (3,9 a 4,5%) e gordura (6,9 a 8,6%) presentes no leite de búfala, fazem deste, matéria prima excelente para a produção de derivados, em especial a mussarela (TONHATI et al, 2000).

A característica nutricional do leite de búfala pode ser avaliada pelo perfil da proteína e gordura. A proteína é constituída por nitrogênio protéico (89 a 96%), representado pela caseína e outras proteínas do soro, enquanto o nitrogênio não protéico (4 a 11%) é composto por aminoácidos livres, uréia, ácido úrico, creatina e produtos do metabolismo do corpo do animal. Devido a

alta quantidade de caseína no leite de búfala, ele se torna um alimento de digestão mais difícil. A gordura do leite é constituída por uma mistura de ácidos graxos e glicerol (96 a 98%) e por pequenas quantidades de fosfolipídios, esteróis, carotenóides, vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos livres. O colesterol está presente em pequenas e variáveis quantidades no leite de búfala, porém em menor quantidade quando comparada a outras fontes de proteínas animais como carne e ovos (PRASAD & PANDITA, 1990). A acidez titulável no leite de búfala pode apresentar maiores variações em relação ao leite bovino, em função de seu teor protéico (BENEVIDES et al, 2001).

As características microbiológicas do leite de búfala são relativamente pouco conhecidas, quando comparado ao leite bovino, sobretudo no Brasil. É importante ressaltar que o leite bubalino *in natura* apresenta também, elevada perecibilidade e está sujeito às mesmas fontes de contaminação microbiana que podem existir na bovinocultura leiteira, principalmente, na ordenha e no transporte do leite até a usina de processamento. Algumas peculiaridades do manejo e do comportamento das búfalas entre outros fatores, podem contribuir para aumentar significativamente a carga microbiana inicial do leite cru, diminuindo assim a qualidade e a validade do produto e, por último, limitando seu emprego pela indústria (CUNHA NETO & OLIVEIRA, 2003).

Contagens elevadas de microrganismos no leite cru acarretam problemas, não apenas para a conservação do produto antes de chegar ao laticínio, mas também para a produção de derivados. Originam perdas por acidificação e outras alterações, afetando a qualidade sensorial, microbiológica, além da diminuição da validade do produto (OLIVEIRA et al, 1999). Apesar destes fatos, não existe atualmente no Brasil, regulamento que defina limites máximos para a contagem de microrganismos no leite de búfala entregue aos laticínios (CUNHA NETO & OLIVEIRA, 2003). Com relação aos aspectos qualitativos do leite pode-se considerar o método da contagem de células somáticas (CCS), que serve para avaliar a saúde do úbere, sendo que em bubalinos, considera-se normal o leite cuja CCS esteja entre 50.000 e 100.000 células/ml (FERNANDES et al, 2005).

2.3. Mussarela de leite de búfala

No Brasil, o queijo mussarela corresponde ao principal produto obtido a partir do leite de búfala, e os Estados da região Sudeste têm se destacado no desenvolvimento desta atividade, que tem mercado assegurado e com preços compensatórios (MELICIO, 2005). Atualmente, são produzidas cerca de cinco mil toneladas de mussarela de leite de búfala por mês, com grande potencial, ainda, a ser explorado neste mercado (MARCHIORI, 2006).

O queijo é um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, carboidratos, cálcio, fósforo e vitaminas, entre elas A e B. Os minerais participam do processo de coagulação do leite, influenciando a textura do queijo. O líquido residual, cujo teor varia com o tipo de queijo, é chamado lactosoro; boa parte dele é eliminada durante o processo de fabricação e aproveitada como matéria-prima na produção de iogurtes, ricota e outros produtos (PERRY, 2004).

Por mussarela entende-se o queijo obtido pela filagem de uma massa acidificada (produto intermediário obtido por coagulação de leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas), complementada pela ação de bactérias lácticas específicas. É um queijo de média, alta ou muita alta umidade e extragordo, gordo ou semigordo e com denominações de "queijo mussarela", "queijo muzzarella" ou "queijo mussarela" (MERCOSUL, 1996). É produzido com leite pasteurizado, normalizado em teor de gordura, cor esbranquiçada e sabor levemente ácido. Os formatos e pesos são variáveis e deve ser conservado sob refrigeração, em temperaturas de até 10°C (PERRY, 2004).

Embora ocorram variações específicas entre os processos de fabricação dos diferentes tipos de queijos, de um modo geral tais procedimentos envolvem as fases de seleção e pasteurização do leite, coagulação, corte do coágulo, dessoragem, enformagem, salga, maturação ou não e embalagem (AMARAL et al, 1992). O processo comumente utilizado para a elaboração do queijo mussarela é o método tradicional, onde ocorre a fermentação da massa, que propicia a redução do pH e a precipitação da coalhada (BERNARDI et al, 2000), a acidificação, a fusão em água quente, o estiramento até a obtenção de uma massa macia e homogênea (filagem), o corte, a moldagem da massa, o

resfriamento e a salga em salmoura fria. Este queijo pode se apresentar com forma e peso variados, sendo consumido puro ou na culinária (VALLE, 1989).

O queijo mussarela de búfala é um queijo fresco, de elaboração artesanal ou industrial, de forma e tamanhos variados, úmido, de aspecto brilhante e cor branco-porcelana. Deve ser flexível, não pastoso e possuir certo grau de umidade em sua estrutura, crosta muito delgada (menos de 1 mm), disposto em camadas finas, superpostas. É vendido em embalagens à vácuo ou em meio ao soro. O sabor é *sui generis* (FERRARA & INTRIERI, 1975).

Atualmente, a mussarela é fabricada com leite de vaca, porém a mussarela típica e original é preparada com leite de búfala integral. O sul da Itália apresenta o maior consumo médio *per capta* deste queijo, estimado em 7,4 kg/ano, entretanto, a manufatura e o consumo desse queijo, não está mais restrita ao seu local de origem (OLIVIERI, 2004). Devido às peculiaridades da tecnologia de preparo, a mussarela de leite de búfala é produzido no Brasil principalmente por pequenas indústrias e a nível artesanal, sendo distribuído por quase todo o país (VALLE, 1989). É um produto bem aceito e bem remunerado pelo consumidor, o que torna a criação de búfalos leiteiros uma boa fonte de renda para o produtor (MACEDO et al, 2001).

A Portaria n° 286, da Inspeção de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, permite a mistura do leite de búfala com o leite de vaca a ser distribuído ao consumo, na proporção de 30%. O custo da mussarela de leite de búfala é normalmente 20% a 50% maior em relação ao de vaca, diferença essa que pode estimular o uso fraudulento de mussarela produzida a partir do leite de vaca ou ainda de queijos híbridos. Há várias metodologias e relatos envolvendo a detecção de caseína bovina em meio à mussarela de leite de búfala (OTAVIANO, 2005).

Embora a pasteurização seja uma etapa essencial na elaboração de queijos, a mussarela de leite de búfala vem sendo produzida a partir de leite cru (OLIVIERI, 2004). A fase de filagem, durante a elaboração de mussarela com leite cru de búfala, quando em temperatura superior a de pasteurização, pode ter ação microbiocida e atuar sobre as enzimas fosfatase e peroxidase, no entanto, é necessário estabelecer se a temperatura mínima da água a ser utilizada e relacioná-la ao tempo do processo de filagem (SILVA et al, 1999). O baixo valor do pH conferido pela fermentação lática (abaixo de 4,95) aliado a

combinação tempo/temperatura durante a filagem, permitem considerar o efeito desta fase, comparável ao obtido pela pasteurização (OLIVIERI, 2004).

A pasteurização é um processo térmico que visa destruir os patógenos e reduzir o número de microrganismos em geral, presentes no leite e derivados. A pasteurização de curta duração, que consiste no aquecimento do leite em camada laminar de 72 a 75ºC, por 15 a 20 segundos, em aparelhagem própria, é o processo de pasteurização mais utilizado. Imediatamente após o aquecimento, o leite é resfriado entre 2 a 5ºC e, em seguida, mantido sob refrigeração (BRASIL, 1997).

O leite destinado à fabricação de queijos deve ser de boa qualidade e, tanto quanto possível, livre de contaminação bacteriana ou por agentes químicos como antibióticos, herbicidas, pesticidas. No caso dos antibióticos, quando administrados aos animais, passarão ao leite e poderão inibir a sua coagulação ou alterar o tempo de maturação dos queijos devido a alterações na microbiota láctica dos queijo. No que se refere ao tempo de coagulação, a literatura mostra que o leite bubalino requer menos tempo do que o leite bovino, representando melhor aproveitamento industrial (FURTADO, 1990).

2.4. Culturas lácteas

Fermento, inóculo e culturas lácteas são sinônimos de culturas *starters*, usadas na elaboração de produtos lácteos fermentados. Essas culturas são microrganismos ativos, que crescem em leite ou soro (SALMINEN, 1998), sendo o primeiro ingrediente adicionado ao leite destinado à fabricação de queijos. Fermentam a lactose com produção de ácido lático, sendo as bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Streptococcus* as mais utilizadas. (AQUARONE et al, 2001)

A cultura pode ser constituída de uma só estirpe de uma espécie bacteriana, conhecida por cultura simples, ou pode reunir várias estirpes e, ou espécies, sendo chamada assim, de cultura mista ou múltipla (SALMINEN, 1998). O fermento lático pode ser obtido adquirindo-o no comércio especializado ou isolando as bactérias do próprio leite (GUIMARÃES, 2007).

A pasteurização destrói os microrganismos prejudiciais ao queijo, mas destrói também aqueles que são necessários à boa maturação do produto. Por

isso, deve-se adicionar ao leite pasteurizado, culturas com bactérias selecionadas, que permitam conseguir queijos mais uniformes, com melhor sabor, melhor qualidade e maior conservação. O fermento é uma cultura de bactérias conveniente, que favorecem características próprias aos diferentes tipos de queijos (AQUARONE et al, 2001).

As bactérias ácido lático (BAL) apresentam como principais características: gram-positiva, microaerofílicas, não esporuladas, catalase-negativa e apresentam colônias pequenas e apigmentadas. São nutricionalmente exigentes para o crescimento e são tolerantes a baixos valores de pH (SALMINEN, 1998).

Importantes características têm sido propostas para diferenciação das BAL. Podem ser divididas em dois grupos bioquímicos de acordo com os produtos formados a partir de glicose: as homofermentativas que convertem a glicose em ácido lático pela via glicolítica e heterofermentativas, que fermentam a glicose a ácido lático, etanol/ácido acético e CO_2 pela via oxidativa das pentoses fosfato. A temperatura de crescimento, tolerância ao sal e a acidez também são características de diferenciação, conforme SALMINEN (1998) e sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais características do *Lactobacillus e Streptococcus.*

Características	*Lactobacillus*	*Streptococcus*
Produção de CO_2	±	-
Crescimento a 10ºC	±	-
Crescimento a 45ºC	±	±
Crescimento a 6,5% NaCl	±	-
Crescimento a pH 4,4	±	-

± respostas variadas entre espécies.

A caracterização e identificação das bactérias lácteas segundo manual Bergey´s (BERGEY´S, 1975) estão descritas abaixo:

Streptococcus salivarus subesp. *thermophilus***:** cocos gram-positivo, termofílico, crescendo na faixa de 20 até 50°C, não se desenvolvendo a 10°C. Resiste a pasteurização sendo destruído a 90°C por 20 segundos. Apresenta grande sensibilidade ao sal, sendo inibido em meios que contenham acima de 2%. É homofermentador de lactose e glicose, porém não fermenta galactose. Produz ácido lático rapidamente, mas só até concentrações de aproximadamente 1,1%. Cresce bem em simbiose com *Lactobacillus delbrueckii* subesp.

bulgaricus, produtor de aminoácidos que são estimulantes, ajudando no crescimento desta cultura, iniciando a produção de ácido lático e reduzindo o nível de oxigênio. Devido a sua termorresistência, é amplamente empregado na fabricação de queijos de massa cozida e semi cozida.

Lactobacillus delbrueckii subesp. *bulgaricus***:** bactéria gram-positiva, termofílica e em forma de bastão; heterofermentadora, produzindo ácido lático a partir da lactose. Resistente a elevadas concentrações de ácido lático, podendo produzi-lo até aproximadamente 2% (200°D). Produz acetaldeído que confere sabor típico ao iogurte. É baixa sua resistência ao sal, não crescendo em concentrações superiores a 2%. Destrói-se no aquecimento a 65°C por 30 minutos. Cresce bem a 45°C, mas não se desenvolve em temperaturas inferiores a 20°C.

*Lactobacillus helveticus***:** bactéria gram-positiva, termofílica e em forma de bastão. Forte produtora de ácido, capaz de fermentar rapidamente a lactose e produzir ácido lático até concentrações de aproximadamente 2,7% (270°D). Homofermentador, resiste a 60°C por 90 minutos. Cresce bem a 45°C, mas não se desenvolve em temperaturas inferiores a 15°C.

O fermento lático termofílico utilizado na fabricação do queijo mussarela é composto de cultura mista de *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus,* podendo ser utilizada cultura simples de *Lactobacillus helveticus* (FURTADO & LOURENÇO NETO, 1994).

O emprego de variedades diferentes de culturas lácteas na fabricação de queijos foi estudado por HOSKEN & GAUDERETO (1973). Visando obter um queijo prato com qualidade superior, verificaram que a combinação de 0,5% de cultura de *S. lactis* e *S. cremoris* mais 0,5% de *L. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* favoreceu o desenvolvimento das características organolépticas desejadas.

As bactérias do ácido lático têm várias funções no processamento de queijos. O ácido lático formado reduz o pH, colaborando com a saída do soro durante o processo de fabricação. Exerce efetiva inibição no crescimento de microrganismos indesejáveis e ajuda na ação do coalho e na coagulação da massa (BONASSI et al, 1981). Confere, ainda, firmeza ao coágulo e afeta o rendimento final do queijo. A acidez determina a quantidade de coalho residual,

influenciando a maturação do queijo, uma vez que, a massa ácida retém mais renina. Atua ainda na dissociação do fosfato de cálcio coloidal, o qual, influi na proteólise (AQUARONE et al, 2001).

A escolha do agente coagulante na produção de queijos é relevante porque ao lado de enzimas produzidas por bactérias, láticas ou não, as enzimas do agente coagulante influenciam na degradação protéica e umas são mais proteolíticas que outras (FOX & LAW, 1991). A pepsina bovina, por exemplo, é uma das mais proteolíticas, é menos específica que a quimosina e, pode hidrolisar excessivamente as caseínas, contribuindo com a diminuição do rendimento e promovendo sabor amargo ao produto, além de causar redução da vida-útil do queijo (NEVES-SOUZA & SILVA, 2005).

Tradicionalmente os coalhos são de origem animal, principalmente bezerros e suínos, mas para atender às necessidades especiais de grupos como os vegetarianos e os muçulmanos, foram desenvolvidos coalhos de origem vegetal e microbiana. Coalhos de origem vegetal têm, em geral, bom desempenho, mas os queijos fabricados com eles costumam apresentar sabor amargo depois de algum tempo de armazenamento. Já os coalhos de origem microbiana têm características bastante semelhantes aos de origem animal (PERRY, 2004). O coalho bovino ainda é o mais utilizado no processamento de queijos, entretanto algumas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de comparar a influência dos diferentes tipos de agentes coagulantes, ¾ bovino e ¾ microbiano exercida sobre os parâmetros físicos e químicos e sobre o rendimento de alguns tipos de queijos (COPPOLA et al, 1988).

A baixa diversidade de fermentos usados na indústria laticinista está sendo impulsionada por uma crescente demanda dos fabricantes de queijo por novas cepas de bactérias láticas para serem usadas como cultivos iniciadores nativos. O desenvolvimento de culturas autóctones específicas à fabricação de um dado queijo pode assegurar proteção às características sensoriais e ao mesmo tempo, garantir um produto homogêneo e seguro do ponto de vista microbiológico (LOCCI, 2008).

2.5. Transformações bioquímicas do queijo

As condições de processamento, armazenamento e comercialização podem alterar as características organolépticas do produto, e ainda, durante as etapas de manufatura, pode haver o risco de contaminação por microrganismos. Assim, a vida-útil dos queijos é limitada por alterações microbiológicas, físicas e químicas que podem ser retardadas pela manutenção do produto em temperaturas de refrigeração e emprego de um sistema de embalagem adequado (ALVES,1994).

A temperatura recomendada para o armazenamento refrigerado de produtos lácteos situa-se entre 4 a 8ºC, sendo 10ºC a temperatura máxima admissível para a estocagem de todos os alimentos perecíveis (HOBBS & ROBERS, 1993).

A mussarela de búfala, conforme a Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos (ABCB, 2003) pode ser armazenada nas seguintes condições: em barra: conservada em geladeira (4 a 8ºC) por 30 dias a partir da data de fabricação; em bolas: fabricada com as características necessárias para ser utilizada em saladas, aperitivos e churrascos, conservada em geladeira por 30 dias a partir da data de fabricação; bola no soro: conservada em geladeira (4 a 8º C) por 30 dias a partir da data de fabricação (ABCB, 2003).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), por meio da Resolução RDC nº 12 de 02/01/2001, estabeleceu padrões microbiológicos para diversos alimentos. Os limites de tolerância adotados para o queijo tipo mussarela são: coliformes a 45^{o}C igual a 5x10^{3} NMP/g, *Staphylococcus aureus* igual a 10^{3} UFC/g e *Salmonella* ssp ausente em 25g.

OLIVIERI (2004) observou que a mussarela de leite de búfala embalada com soro e a vácuo atenderam as especificações dos padrões microbiológicos vigentes, porém, indicou que o soro pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos.

A presença de coliformes fecais em queijos já elaborados ou na massa durante o processo de fabricação da mussarela de leite de búfala foram detectadas por SILVA et al. (1997), CORTESI et al. (1997) e SILVA et al. (1999).

Os valores de pH dos queijos sofrem alterações durante o armazenamento por ação da cultura láctea. BONASSI et al. (1982) obtiveram valor médio de 5,48 em mussarela de leite de búfala logo após a sua fabricação, e para os queijos armazenados por 7 dias a 6ºC em salmoura e avaliados por CORTESI et al. (1997) apresentaram valores de pH de 5,54 e 5,63. As mussarelas de leite de búfala avaliadas por OLIVIERI (2004) apresentaram valores médios de pH 4,9 para a embalada com soro e 5,0 para a embalada à vácuo.

A adição de BAL no leite destinado a fabricação de queijo, além de fermentar a lactose também é de extrema importância para prover enzimas proteolíticas que favoreçam a degradação protéica durante ao processos de maturação (VISSER, 1998). As frações α_{S1}, α_{S2} e β-caseína não são hidrolisadas durante a coagulação do leite, mas podem ser hidrolisadas durante a maturação do queijo (FOX et al, 1996). O *L. helveticus* degrada preferencialmente a α_S-caseína e parcialmente a β-caseína, e *L. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* degrada mais facilmente a β-caseína (CHANDAN et al, 1982). A atividade proteolítica do *S. salivarus* subesp. *thermophilus* é menor do que o *Lactococci* e não afeta a hidrolise da caseína nos queijos (THOMAS & PRITCHARD, 1987). O uso de cultura de *L. helveticus* foi proposto por ARDO & PETTERSSON (1988) para aumentar a proteólise do queijo. Assim, a proteólise tem sido confirmada como o evento mais importante, pois não somente intervêm no desenvolvimento do sabor como também contribui para as mudanças texturais do queijo (SOUZA et al, 2001).

A produção de peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos livres é resultante das proteinases e peptidases das bactérias lácteas sobre os peptídeos de alto e baixo peso molecular produzidos a partir da hidrólise da α_{S1}-caseína pela quimosina (FOX & McSWEENEY, 1996). Os compostos resultantes que se acumulam na massa além dos peptídeos e aminoácidos livres são aminas, amoníaco, ácidos voláteis, aldeídos e cetonas, os quais, caracterizam organolepticamente cada tipo de queijo (ENGEL et al, 2001) e são, também, responsáveis pelo aparecimento de sabor amargo nos queijos (SALLES et al, 2000).

A quantificação dos produtos de degradação das proteínas do queijo são usados como parâmetros para expressar o índice de proteólise ou índice de maturação e é um fator de grande importância na composição final e nos atributos sensoriais do produto. Caracteriza-se pela quantidade de substâncias nitrogenadas solúveis na fase aquosa dos queijos, produzidas a partir da degradação da caseína por ação do coalho. O acompanhamento do índice de proteólise permite conhecer a atividade proteolítica do coalho, do fermento e das enzimas (SILVA, 1998).

A determinação analítica do índice de proteólise é baseada na solubilização em tampão citrato de uma amostra diluída do queijo, seguida por precipitação isoelétrica da caseína em pH 4,6 e quantificação das substâncias solúveis através do método de Kjeldahl (WOLSFSCHOON-POMBO, 1983). De acordo com SILVA (1998) este índice aumenta com o avanço da maturação.

A evolução do índice de proteólise durante a conservação da mussarela elaborada com leite bovino foi avaliada por LOURENÇO NETO et al. (1988). Verificaram no decorrer da estocagem a tendência de aumento da quantidade de nitrogênio solúvel, o que consequentemente acarretou um aumento do índice de proteólise. Observaram também que, quanto mais baixa a temperatura de estocagem menor foi a proteólise, em consequência das menores atividades microbiana e enzimática.

As transformações bioquímicas conferem à massa características novas, uma vez que a massa inicialmente dura e compacta é modificada em relação à composição, estrutura, aspecto, consistência e cor. Uma proteólise intensa resulta numa maior degradação de α_{s1}-caseína e num maior amolecimento do queijo (LOURENÇO NETO et al, 1988).

As transformações bioquímicas ocorridas durante o processamento e armazenamento de produtos lácteos podem melhorar as propriedades organolépticas. Entretanto, o tratamento pelo calor, a exposição à luz e ao oxigênio podem causar danos oxidativos aos lipídios e às proteínas, diminuindo o valor nutricional (MOREAUX & BIRLOUEZ-ARAGON, 1997). BALESTRIERI et al. (2002) ao avaliarem as mudanças oxidativas da mussarela produzida com leite bovino e bubalino, concluíram que a proteína e a gordura da mussarela de leite de búfala são mais protegidas contra alterações oxidativas do que a de leite bovino.

O índice de profundidade da proteólise dos queijos indica a formação de substâncias de baixo peso molecular acumuladas durante o período de maturação devido, principalmente, à ação proteolítica das enzimas microbianas sobre os compostos nitrogenados oriundos da degradação da caseína. Compostos característicos desta degradação são os aminoácidos, oligopeptídeos, aminas e outros compostos (WOLSFSCHOON-POMBO, 1983).

A profundidade da proteólise pode ser quantificada considerando-se o teor de nitrogênio não protéico (NNP) solúvel em solução de ácido tricloroacético e quantificado pelo método de Kjeldahl (WOLSFSCHOON-POMBO, 1983).

2.6. Alterações na textura

A textura pode ser definida como a manifestação sensorial e funcional das propriedades mecânicas e estruturais dos alimentos percebidas pelos sentidos da visão, audição e tato (SZCZESNIAK, 2002). As propriedades mecânicas são manifestadas pela reação do alimento quando submetido a uma pressão, como por exemplo, na mastigação e a resistência ao corte. Essas propriedades envolvem as características mecânicas as quais foram propostas e definidas por SZCZESNIAK (1963) como sendo: A) Parâmetros primários: 1) dureza: é a força requerida para comprimir o queijo entre o dente molar; 2) coesividade: é a proporção pela qual um queijo pode ser deformado antes da ruptura; 3) elasticidade: é o grau de recuperação de uma parte deformada do queijo após a remoção da força de deformação; 4) adesividade: é a força requerida para remoção do queijo que adere ao palato durante o processo de mastigação. B) Parâmetros secundários: 1) fraturabilidade: é a força pela qual um queijo desintegra, despedaça, racha ou quebra quando deformado; 2) mastigabilidade: é o número de mastigadas requeridas para mastigar um queijo pronto para ser engolido; 3) gomosidade: é a energia requerida para desintegrar um pedaço de queijo pronto para ser engolido.

A textura está diretamente relacionada à quantidade de α_{S1}-caseína não hidrolisada, e essa propriedade varia de acordo com o tipo de queijo e pode se alterar durante o processo de maturação. Conseqüentemente, a textura é um importante símbolo de qualidade e pode ser afetada pela proporção de gordura

e proteína, pois, o aumento do teor de gordura tende a enfraquecer a estrutura protéica. Pode ser afetada também pelo conteúdo de água, uma vez que o aumento da umidade reduz a resistência e, ainda pelo teor de sal, que pode cristalizar-se na matriz do queijo. O pH também influencia a textura e se inferior a 5,5 pode ocorrer uma dissociação progressiva das submicelas em pequenos agregados de caseína. As condições de fabricação; a composição do queijo e a degradação de proteínas estão também relacionadas à textura (VISSER, 1991; AUGUSTO, 2003).

A estrutura do queijo é um arranjo espacial de seus componentes e a textura é a percepção visível das manifestações da estrutura interna. A avaliação da textura pode ser obtida por métodos tradicionais de graduação (avaliação sensorial do queijo) ou pelo uso de equipamentos (LAWRENCE et al, 1983).

A textura é expressa por um conjunto de características físicas, sendo a dureza o parâmetro avaliado com maior freqüência. Correlações satisfatórias foram obtidas com relação ao parâmetro de dureza do *Texture Profile Analyses*, como sendo a máxima força da curva de compressão. A adesividade, no entanto, é de difícil correlação entre as análises instrumental e sensorial (ZOON, 1991).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a utilização de diferentes fermentos lácteos sobre a qualidade da mussarela de leite de búfala durante o processamento e armazenamento.

3.2. Específicos

Avaliar o rendimento dos queijos, as características físicas e químicas e sensorial e as mudanças ocorridas durante o armazenamento refrigerado da mussarela de leite de búfala.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

As amostras de leite de búfala pasteurizado utiulizado na fabricação da mussarela foram colhidas em frasco de vidro de 500 mL, em triplicata e mantidas refrigeradas.

Os queijos foram elaborados em forma de bola de aproximadamente 80g em laticínio especializado, localizado no município de Ribeirão Preto- SP, com registro no Serviço de Inspeção Federal (S.I.F) e portador do "Selo de Pureza".

Foram utilizados três fermentos lácteos na elaboração dos queijos.- Fermento 1 (F1) - *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* (TM81 - 50μ - Danisco); Fermento 2 (F2) - *Streptococcus salivarius* subesp *thermophilus* (STM4-200μ - Cristian Hansen) e Fermento 3 (F3) - *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus helveticus* (TCC20 -50μ - Cristian Hansen).

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo das culturas lácteas

O conteúdo de cada embalagem foi dissolvido em um litro de leite bovino UHT desnatado e armazenado em frascos esterilizados. Foram utilizados 0,05% de cada cultura no preparo dos queijos.

4.2.2. Preparo da salmoura

A salmoura, preparada na concentração 20% utilizando-se sal refinado, foi fervida por 20 minutos e filtrada para remoção de impurezas.

4.2.3. Preparo do líquido de armazenamento

O líquido de armazenamento dos queijos foi elaborado contendo 0,46% de sal refinado e 0,2% de ácido cítrico.

4.2.4. Fabricação dos queijos

Os queijos foram elaborados com leite pasteurizado (65ºC/30min) conforme procedimento adotado pelo laticínio, utilizando-se os diferentes fermentos lácteos para acidificação da massa. A temperatura de inoculação foi 38ºC e foram utilizados 33 litros de leite para cada processamento, realizado em três repetições (11 litros cada uma). Transcorridos 20 minutos da adição da cultura (0,05%), colocou-se o coalho (coagulo líquido Três Coroas- preparação enzimática à base de protease) com poder coagulante 1:10.000 diluído em água e agitou-se por um minuto.

Efetuou-se o primeiro corte da massa após 1 hora e 10 minutos, o segundo corte foi realizado após mais 10 minutos de repouso e o terceiro com mais 5 minutos, seguido de agitação por 5 minutos e repouso a 39ºC para acidificação da massa (pH 5,1). Verificado o ponto, a massa foi filada em água quente, elaborados os queijos manualmente em forma de bolas, transferidos para a salmoura (20 min) e colocados com o líquido de armazenamento (500 mL) em embalagens plásticas seladas manualmente. Os procedimentos de preparo dos queijos com as diferentes culturas foram realizados com intervalos de 30 minutos.

Todo o soro e água de filagem foram recolhidos, pesados e amostrados para efeito dos cálculos de rendimento e recuperação de gordura e proteína.

Para cada cultura foram utilizadas 99 embalagens com duas amostras de queijo cada, sendo 72 para as análises físicas e químicas, 9 para as análises microbiológicas e 18 embalagens para a análise sensorial, totalizando 198 amostras de queijo. Após preparo, as amostras foram transportadas para o Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP - Câmpus de Jaboticabal para o armazenamento sob refrigeração (8ºC ± 1ºC) durante 34 dias.

4.2.5. Análises físicas e químicas

As análises das amostras do leite utilizado na elaboração dos queijos (acidez, densidade, extrato seco total, gordura e proteína), do soro e água de filagem (proteína e gordura), do líquido de armazenamento (pH e cloreto) e dos

queijos durante o armazenamento refrigerado (4, 14, 24 e 34 dias) foram realizadas em triplicata, de acordo com os métodos descritos a seguir:

- amostragens - o líquido de armazenamento contido nas embalagens foi recolhido e as amostras de queijo, após a avaliação do pH, foram trituradas e homogeneizadas em um multiprocessador;
- pH - do soro e do líquido de armazenamento foi determinado em potenciômetro pH-Metro Digimed DM 20 e o do queijo em potenciômetro digital portátil Testo, previamente calibrados;
- densidade - determinada no leite pela leitura em termolactodensimetro de Quevenne, com valores corrigidos à temperatura de 15^{o}C (IAL, 1985);
- acidez - no leite foi determinada pelo método de Dornic, e os valores expressos em graus Dornic (^{o}D) (IAL, 1985);
- cloreto de sódio - determinado pelo método de Mohr (IAL, 1985);
- umidade - determinada pela secagem da amostra em estufa a 105º C até peso constante (IAL, 1985);
- gordura (G) - a porcentagem de gordura do leite, soro, água de filagem e do queijo foi determinada pelo método butirométrico, descrito no IAL (1985), especificamente para leite (amostra diluída leite:água 2:1) e para queijo;
- extrato seco total (EST) - obtido subtraindo-se de 100 a quantidade de água da amostra;
- gordura no extrato seco (GES) - a porcentagem de gordura no extrato seco foi calculada pela equação: GES = (% G / % EST) x 100;
- cinzas - o teor de cinzas foi determinado pela incineração em mufla a 550^{o}C (IAL, 1985);
- nitrogênio total (NT) - a determinação do nitrogênio total foi feita a partir do método semi-micro Kjeldahl, utilizando-se o fator 6,38 para a obtenção do teor de proteína (IDF, 1962; IDF, 1964);
- nitrogênio solúvel em pH 4,6 - o teor de nitrogênio solúvel foi determinado pela dosagem do nitrogênio do filtrado obtido após a precipitação isoelétrica das caseínas (WOLFSCHOON-POMBO, 1983);
- índice de extensão da proteólise - foi obtido pela relação entre os teores de nitrogênio solúvel em pH 4,6 e o nitrogênio total (WOLFSCHOON-POMBO, 1983);

- nitrogênio não protéico (NNP) - foi determinado pela dosagem de nitrogênio total no filtrado após a precipitação das proteínas em ácido tricloroacético a 12% (SILVA et al, 1997);
- índice de profundidade da proteólise (IPP) - foi obtido pela relação entre os teores de nitrogênio não protéico e nitrogênio total (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

4.2.6. Análise instrumental de textura

A textura dos queijos foi avaliada durante o armazenamento utilizando-se o texturômetro TA-XT2 Stable Micro Systems. Foram realizadas seis determinações em cada amostra de queijo e o procedimento adotado foi o de dupla compressão, utilizando-se o probe Warner-Bratzler Blade (HPP/BS), com velocidade de deslocamento de 2,0 mm/s e distância percorrida de 6,0 mm. Foram determinados os parâmetros: dureza e elasticidade (GONZÁLES et al, 1998).

4.2.7. Recuperação de gordura e proteína e rendimento dos queijos

A porcentagem de recuperação de gordura e proteína nas amostras foi calculada conforme FERREIRA (2004).

- porcentagem de recuperação de gordura no soro, água de filagem e queijos:
  peso dos componentes X % de gordura/peso do leite X % gordura leite.
- porcentagem de recuperação de proteína no soro, água de filagem e queijos:
  peso dos componentes X % de proteína/peso do leite X % proteína leite.
- A recuperação nem sempre é total devido aos erros experimentais. Para neutralizar as pequenas diferenças ocorridas durante o processamento dos queijos os valores foram padronizados para 100% de recuperação (FERREIRA, 2004).
- rendimento : calculado, em cada processamento, pela relação:
  massa queijo (kg)/massa inicial de leite (Kg).

4.2.8. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas após 34 dias de armazenamento e seguiram o descrito nos métodos analíticos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985), para avaliação da presença e quantificação de *Salmonella,* coliformes totais *e Staphylococcus* coagulas*e* positiva, conforme exigido no regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo mussarela do MERCOSUL (1996).

As embalagens contendo os queijos foram desinfetadas externamente com iodo e abertas com tesoura esterilizada. De cada amostra foram retiradas 25g, segundo metodologia padronizada e, foi preparada a primeira amostragem diluída, obtida pela adição de 225mL de água tamponada fosfatada, obtendo-se assim a diluição 10^{-1}, a partir da qual, foram obtidas as diluições seriadas 10^{-2}, 10^{-3} e 10^{-4}, compostas sempre por 1ml da diluição anterior adicionada de 9ml de água tamponada fosfatada. Estas diluições foram utilizadas para a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva e contagem de coliformes totais. Para a pesquisa de *Salmonella sp*., uma amostra de 25g foi diluída em 225 mL de caldo lactosado.

4.2.9. Análise sensorial

A avaliação sensorial foi realizada após o período de 34 dias de armazenamento, para avaliar a aceitação dos queijos, empregando-se escala hedônica de 9 pontos, variando de "gostei extremamente" a "desgostei extremamente" (FIL, 1987). Os 30 provadores não treinados foram selecionados ao acaso para assinalarem sua preferência em ficha apropriada. A classificação dos julgadores na escala foi transformada em escores para a análise de aceitação.

As amostras foram apresentadas aleatorizadas, de forma monádica, codificadas em algarismos de três dígitos. Os atributos avaliados foram aroma, sabor, maciez e impressão global.

4.2.10. Análise estatística

A análise estatística dos resultados das avaliações físicas e químicas do soro, da água de filagem, do rendimento e da porcentagem de recuperação foi realizada utilizando o delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Para a análise dos queijos e líquido de armazenamento utilizou-se DIC em esquema fatorial 3x4 (3 tipos de fermento e 4 períodos de armazenamento), com três repetições. A análise de variância e a comparação de médias pelo teste de Tukey (5%) foram obtidas utilizando-se o programa Statistical Analysis System (SAS, 1992).

Os resultados da avaliação sensorial para os atributos aroma, sabor, maciez e impressão global foram analisados pela análises de variância ANOVA. Para comparação das médias foi utilizado o teste Tukey ao nível de 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição do leite, soro, água de filagem e queijo e rendimentos

O resultado da análise física e química do leite de búfala utilizado na fabricação da mussarela está apresentado na Tabela 2. Os parâmetros avaliados encontram-se dentro das médias observadas para esta espécie por DUARTE et al, (2001) e MELÍCIO et al, (2005). COELHO et al, (2004) determinou o perfil físico e químico do leite bubalino produzido no Estado de São Paulo e salientou a necessidade da realização de estudos regionais para o estabelecimento e adoção dos valores padrões para as características físicas e químicas e seus limites de variação, sobrepondo-se às limitações de uso simplesmente de um valor médio, aceito como padrão.

Tabela 2. Composição física e química do leite de búfala utilizado na fabricação da mussarela.

Parâmetros	Valores
Proteína (%)	4,62 $\pm$ 0,058
Gordura (%)	6,10 $\pm$ 0,01
Extrato seco total (%)	15,97 $\pm$ 0,23
Densidade (g/cm^3)	1,0315
Acidez (ºD)	20,0

Os valores médios obtidos para as porcentagens de proteína e gordura no soro, água de filagem e queijo estão apresentados na Tabela 3.

Os teores de proteína do soro não foram alterados com as culturas utilizadas, porém, as porcentagens de gordura foram maiores com o uso do fermento 1 para acidificação da massa. A água de filagem dos queijos fabricados com fermento 1 apresentou valores maiores de gordura e proteína em comparação com os queijos elaborados com os demais fermentos, nos quais, os teores foram semelhantes. As porcentagens de proteína foram maiores para os queijos elaborados com fermento1 e as de gordura foram as menores.

A concentração dos componentes no soro e na água de filagem dos queijos apresentaram-se superiores ao obtidos por FERREIRA (2004) ao elaborar mussarela com leite de vaca pelo método tradicional. As técnicas

utilizadas na fabricação dos queijos e a composição do leite podem ser fatores que interferem no teor de componentes no soro e na água de filagem. Os resultados obtidos foram utilizados para a análise de recuperação dos componentes, uma vez que na fabricação de queijos se espera menores perdas de sólidos no soro e na água de filagem para se obter melhores rendimentos dos queijos.

Tabela 3. Porcentagens de proteína e gordura do soro, da água de filagem e da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos lácteos[1].

Componentes (%)	Amostras	Fermento 1	Fermento 2	Fermento 3
Gordura	Soro	2,38[a]	2,08[b]	1,92[b]
	Água de filagem	1,00[a]	0,80[b]	0,77[b]
	Queijo	17,94[b]	22,28[a]	20,58[a]
Proteína	Soro	1,63[a]	1,61[a]	1,51[a]
	Água de filagem	0,49[a]	0,37[b]	0,36[b]
	Queijo	20,88[a]	16,28[b]	17,43[b]

[1]Fermento 1: *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus;* Fermento 2*: Streptococcus salivarius* subesp *thermophilus;* Fermento 3 : *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus helveticus.*
[a,b] Médias seguidas de letra iguais, numa mesma linha, não diferem entre si (p>0,05)

Na Tabela 4 estão apresentadas as porcentagens médias de recuperação de gordura e proteína no soro, água de filagem e queijo para os fermentos utilizados.

Tabela 4. Recuperação de gordura e proteína do soro, da água de filagem e da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos lácteos[1].

Componentes (%)	Amostras	Fermento 1	Fermento 2	Fermento 3
Gordura (%)	Soro	30,21[a]	24,55[b]	25,37[b]
	Água de filagem	18,84[a]	14,14[a]	14,49[a]
	Queijo	50,95[b]	61,31[a]	60,14[a]
Proteína (%)	Soro	22,15[a]	23,60[a]	25,61[a]
	Água de filagem	5,25[b]	6,68[ab]	8,67[a]
	Queijo	72,60[a]	66,72[ab]	65,72[b]

[1]Fermento 1: *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp*. bulgaricus;* Fermento 2*: Streptococcus salivarius* subesp *thermophilus;* Fermento 3 .*Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus helveticus.*
Médias seguidas de letra iguais, numa mesma linha, não diferem entre si (p>0,05).

Observou-se maior perda de gordura no soro dos queijos elaborados com cultura láctea contendo *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e

Lactobacillus delbrueckii subesp*. bulgaricus* (fermento 1), proporcionando menor recuperação de gordura no queijo elaborado com este fermento. Na água de filagem as porcentagens de recuperação de gordura não foram influenciadas pelos tipos de fermento.

A baixa recuperação de gordura em todos os queijos pode estar associada às perdas deste componente no soro e na água de filagem, o que concorda com as observações de FERREIRA (2004) que obteve 68,73% de recuperação de gordura para mussarela elaborada com leite de vaca. A retenção da gordura nos queijos pode estar associada ao tipo de acidificação da massa, se direta ou indireta (METZGER et al, 2000) e a quantidade de coagulante utilizado (OLIVEIRA, 2001) uma vez que pequeno volume poderá levar à formação de um coágulo mais grosseiro e poroso, com uma menor capacidade de reter a gordura (FERREIRA, 2004).

As porcentagens de recuperação de proteína no soro e no queijo foram similares às reportadas por METZGER et al, (2000) e por FERREIRA (2004) para queijo mussarela com reduzido teor de gordura, porém, na água de filagem os teores obtidos foram superiores.

Embora as porcentagens de perdas de gordura no soro e de proteína na água de filagem foram influenciadas pelo tipo de fermento utilizado, estas perdas não afetaram o rendimento dos queijos obtendo-se os valores médios de 17,2%, 17,9% e 17,4% ($p>0,05$), respectivamente, para os fermentos 1, 2 e 3. A tecnologia de preparo da mussarela em forma de bola e a embalagem com o soro possibilitam a obtenção de queijos com maior teor de umidade o que pode colaborar com o rendimento dos mesmos.

5.2. Análise do líquido de armazenamento.

Na Tabela 5 está apresentada a análise de variância para pH e cloreto (%), determinados em amostras de líquido de armazenamento da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos, durante o período de 34 dias. Os resultados mostraram que os efeitos observados para fermentos (F) e armazenamento (A) afetaram significativamente o pH e o cloreto do líquido. A interação F x A indicou que houve respostas diferentes e significativas dos

fermentos, conforme os dias de armazenamento, para os parâmetros avaliados.

Tabela 5. Análise de variância e coeficiente de variação (CV) do pH e cloreto do líquido de armazenamento da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenada durante 34 dias.

Causas de variação	Valores de F	
	pH	Cloreto (%)
Fermento (F)	448,95**	4,46*
Armazenamento (A)	331,86**	92,85**
Interação F x A	9,40**	19,52**
CV (%)	1,54	9,70

**- significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01)
*- significativo ao nível de 5% de probabilidade (p<0,05)

Os valores médios obtidos para pH e cloreto do líquido contido nas embalagens dos queijos elaborados com diferentes fermentos e armazenados durante o período de 34 dias estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de pH e porcentagem de cloreto do líquido de armazenamento da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenada durante o período de 34 dias.

Fermento[1]	Parâmetros	4 dias	14 dias	24 dias	34 dias
1	pH	$3,90^{Cd}$	$4,05^{Cc}$	$4,16^{Cb}$	$4,49^{Ca}$
2		$4,14^{Bd}$	$4,31^{Bc}$	$4,50^{Bb}$	$4,78^{Ba}$
3		$4,26^{Ad}$	$4,71^{Ac}$	$4,87^{Ab}$	$5,14^{Aa}$
1	Cloreto (%)	$0,56^{Aa}$	$0,36^{Ab}$	$0,28^{Bc}$	$0,25^{Bc}$
2		$0,41^{Ba}$	$0,33^{ABb}$	$0,25^{Cc}$	$0,34^{Ab}$
3		$0,39^{Ba}$	$0,31^{Bb}$	$0,30^{Ab}$	$0,34^{Aab}$

[1]Fermento 1: *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus;* Fermento 2*: Streptococcus salivarius* subesp *thermophilus;* Fermento 3 .*Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus helveticus.*
Médias seguidas de letras diferentes maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (p<0,05).

Observou-se aumento (p<0,05) do pH do soro durante o período de armazenamento para todos os fermentos. estudados. As amostras de soro com pH inicial de 3,90, 4,14 e 4,26 apresentaram, após 34 dias de armazenamento, pH igual a 4,49, 4,78 e 5,14, respectivamente, para os fermentos 1, 2 e 3. Os valores de pH do soro para amostras elaboradas com fermento 3 foram

superiores ($p<0,05$) durante todo o período de armazenamento em relação aos outros fermentos, enquanto que, para o fermento 1 os valores foram sempre menores. De acordo com SCOTT (1986) a hidrólise da proteína dos queijos durante a maturação e/ou armazenamento leva à formação de compostos alcalinos solúveis. A migração destes compostos para o soro favorece a sua neutralização e consequente elevação do pH durante o armazenamento dos queijos.

As porcentagens de cloreto variaram significativamente em função do fermento utilizado na fabricação dos queijos. As maiores porcentagem foram observadas no início do armazenamento para todas as amostras e a maior porcentagem foi verificada para o líquido do queijo elaborado com *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* (F1). No final do período (34 dias) as porcentagens de cloreto foram inferiores às porcentagens iniciais. Esta observação também foi verificada por CARVALHO et al, (2005) durante o armazenamento no soro da mussarela de leite de búfala. A diferença na pressão osmótica entre o soro e a massa do queijo favorece a absorção do cloreto de sódio, ocorrendo a troca de íons nas moléculas de *para*-caseína, o que pode levar à diminuição do teor de cloreto no líquido de armazenamento (PERRY, 2004).

5.3. Composição dos queijos.

Os resultados da análise estatística dos parâmetros pH, cloreto e cinzas da mussarela de leite de búfala, elaborada com diferentes fermentos e armazenadas por 34 dias estão apresentados na Tabela 7, e na Tabela 8 estão os resultados para os parâmetros umidade, extrato seco total (EST), gordura, gordura no extrato seco (GES) e proteína total.

Tabela 7. Análise de variância e coeficiente de variação (CV) para pH e para as porcentagens de cloreto e de cinzas da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenada por 34 dias.

Causas de variação	Valores de F		
	pH	Cloreto	Cinzas
Fermento (F)	30,28**	23,15**	44,64**
Armazenamento (A)	59,99**	44,20**	35,09**
Interação F x A	7,16**	8,54**	3,21**
CV (%)	0,67	4,57	7,55

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01).

Os valores de pH, cloreto e cinzas da mussarela sofreram variações significativas durante o período de armazenamento e a interação (FxA) indicou que o tipo de cultura afetou esses parâmetros, ao longo do armazenamento.

Os queijos apresentaram diferenças significativas (p<0,05) para a composição química (Tabela 8) indicando que a mesma foi afetada pelos fermentos utilizados na fabricação. Somente a porcentagem de GES e proteína não sofreram alterações durante o período de armazenamento. A ausência de interação significativa indica independência dos fatores sobre a composição química o que é concordante com os resultados obtidos por GALLINA et al, (2002), GOMES et al, (2003) e por BARROS (2005), que mostraram que a composição de diferentes variedades de queijos não foi afetada pelo uso de cultura adjunta composta por *L. casei, L. helveticus e Micrococcus* durante a maturação.

Tabela 8. Análise de variância e coeficiente de variação (CV) para umidade, extrato seco total (EST), gordura, gordura no extrato seco (GES), proteína total da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenadas por 34 dias.

Causas de variação	Valores de F				
	Umidade	EST	Gordura	GES	Proteína
Fermento (F)	42,30**	42,87**	39,35**	6,87**	3,86*
Armazenamento (A)	3,57*	3,50*	3,32*	$1,19^{ns}$	$0,84^{ns}$
Interação F x A	$1,76^{ns}$	$1,89^{ns}$	$1,55^{ns}$	$1,51^{ns}$	$1,50^{ns}$
CV (%)	3,01	4,60	7,22	7,99	10,17

^{ns} - não significativo * - significativo ao nível de 5% de probabilidade (p<0,05). ** - significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01).

Os valores iniciais do pH dos queijos (5,23, 5,23 e 5,33) variam significativamente em função do fermento, observando-se acréscimo no final do armazenamento (Figura 1). Os resultados aproximaram-se dos obtidos por OLIVIERI (2004) e por CARVALHO et al, (2005) para a mussarela de leite de búfala armazenada no soro, cujos valores de pH estiveram entre 4,6 a 5,67.

A acidez do queijo é decorrente da ação do fermento utilizado na fabricação, com produção de ácido lático a partir da degradação da lactose residual (FERREIRA, 2004) e o fermento 1 apresentou maior capacidade acidificante que o fermento 3 até 24 dias de armazenamento. A acidez promovida pelo fermento 2, que é composta somente de *S. salivarius* subesp. *thermophilus*, foi menos intensa no final do período, assemelhando-se à cultura constituída, além desta bactéria, por *L. helveticus*.

O aumento do pH pode estar associado com a formação de compostos nitrogenados como aminoácidos, aminas e/ou amônia, oriundos da proteólise que ocorre com o tempo (BARROS, 2005). YUNES & BENEDET (2000) citaram que queijos frescos obtidos a partir do leite de búfala apresentaram valores de pH superiores aos obtidos a partir do leite de vaca, devido fundamentalmente pela tendência dos produtos fermentados de leite de búfala acidificarem-se mais lentamente.

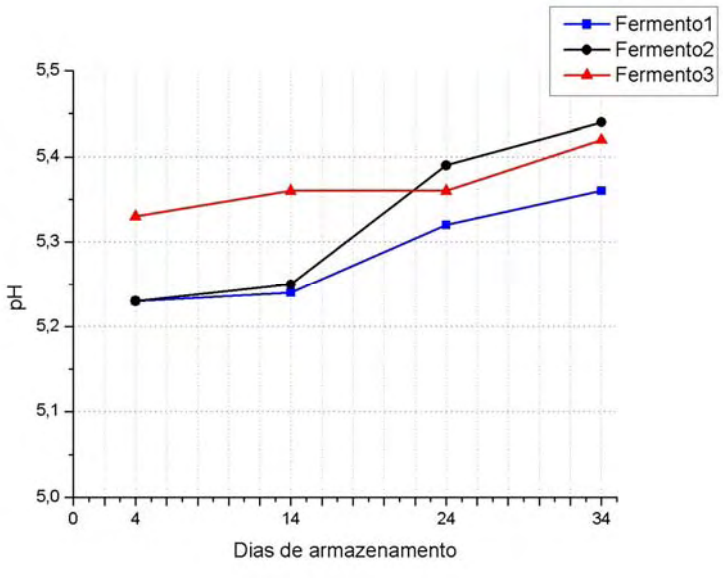


Figura 1. Evolução do pH dos queijos elaborados com diferentes fermentos durante 34 dias de armazenamento.

Os resultados das análises da composição química da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenadas por 4, 14, 24 e 34 dias no líquido estão apresentados na Tabela 9.

Os teores de umidade foram superiores aos valores médios citados para a mussarela brasileira, que situa-se entre 43-46% (FURTADO & LOURENÇO NETTO, 1994). Porém, para a mussarela embalada no soro a legislação vigente estabelece teores compreendido entre 52 e 60%, e assim os valores obtidos aproximaram-se aos da ANVISA (2001). São concordantes também com os teores encontrados por VERRUMA et al, (1993) e CARVALHO et al, (2005). Os queijos mais úmidos foram os obtidos com o uso do fermento 1 apresentando-se acima dos valores permitidos pelo regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo mussarela. Os principais efeitos provocados pelos altos teores de umidade nos queijos incluem a diminuição do valor nutritivo e o favorecimento da multiplicação bacteriana decorrente da elevada atividade de água no produto (OLIVEIRA, 2001).

As porcentagens de extrato seco total (EST) das amostras de queijo sofreram influência dos fermentos ($p<0,05$) e as variações observadas foram decorrentes das alterações nos teores de umidade. VALLE (1991) destacou que o teor de sólidos totais dos queijos pode ser influenciado por vários fatores como temperatura de coagulação, corte, temperatura e velocidade de aquecimento. O conteúdo de gordura no extrato seco variou com o fermento mas não com o armazenamento e as porcentagens atenderam a especificação mínima da legislação vigente que é de 35% (BRASIL, 2001). O elevado teor de gordura no queijo é decorrente do alto teor de gordura do leite de búfala utilizado na fabricação, uma vez que o mesmo não foi padronizado.

As porcentagens de proteína variaram não significativamente durante o período de armazenamento, com porcentagens de 20,84, 20,16 e 20,43 aos 34 dias, para os fermentos 1, 2 e 3, respectivamente. De acordo com VERRUMA et al. (1993) o teor de proteína na mussarela de leite de búfala está em torno de 19%.

Tabela 9. Valores médios obtidos para as porcentagens de umidade, extrato seco total (EST), gordura, gordura no extrato seco (GES), proteína e da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenada por 34 dias.

Fermento[1]	Parâmetro	4 dias	14 dias	24 dias	34 dias	Média
F1	Umidade (%)	62,07	64,00	64,34	62,37	63,19^{a}
F2		59,09	60,72	62,06	60,59	59,91^{b}
F3		57,83	57,47	58,72	59,85	58,46^{c}
	Média	59,33^{b}	60,73^{ab}	61,71^{a}	60,94^{ab}	-
F1	EST (%)	37,93	36,01	35,68	37,63	36,81^{c}
F2		41,85	39,28	40,38	39,40	40,08^{b}
F3		42,16	42,69	41,28	40,15	41,57^{a}
	Média	40,66^{a}	39,33^{ab}	39,11^{ab}	39,06^{b}	-
F1	Gordura (%)	17,56	16,80	15,79	17,23	16,85^{b}
F2		21,15	19,49	19,34	19,60	19,79^{a}
F3		20,02	19,26	20,48	20,36	19,93^{a}
	Média	19,57^{a}	18,52^{b}	18,54^{ab}	19,06^{ab}	-
F1	GES (%)	46,28	46,80	44,46	45,89	45,86^{b}
F2		51,88	47,56	50,38	49,80	49,95^{a}
F3		47,99	44,37	50,84	50,73	47,99^{ab}
F1	Proteína (%)	19,91	21,00	22,19	20,84	20,98^{a}
F2		19,11	19,65	19,87	20,16	19,38^{b}
F3		21,58	19,14	18,49	20,43	19,87^{ab}
F1	Cinzas (%)	0,84^{Aa}	0,73^{Bb}	0,69^{Bb}	0,68^{Bb}	-
F2		0,94^{Aa}	0,80^{Bb}	0,68^{Bc}	0,67^{Bc}	-
F3		0,94^{Aa}	0,94^{Aa}	0,86^{Aa}	0,83^{Aa}	-
F1	Cloreto (%)	0,087^{Ab}	0,089^{Bb}	0,096^{Aa}	0,093^{Ba}	-
F2		0,074^{Bc}	0,081^{Cb}	0,099^{Aa}	0,100^{Aa}	-
F3		0,089^{Ab}	0,097^{Aa}	0,100^{Aa}	0,099^{Aa}	-

[1]F1: *S. salivarius* subesp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subesp. *bulgaricus;* F2*: S. salivarius* subesp *thermophilus;* F3 .*S. salivarius* subesp. *thermophilus* e *L. helveticus.* Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Os teores de cinzas variaram de 0,84% a 0,68% para as amostras elaboradas com fermento 1, de 0,94 a 0,67% para as elaboradas com fermento 2 e de 0,94 a 0,83% ($p<0,05$) para as elaboradas com fermento 3. O conteúdo de cinzas diminuiu durante o armazenamento indicando ao final do período, a perda de minerais do queijo em consequência da desmineralização durante o armazenamento.

As concentrações de cloreto variaram significativamente em função do fermento e as maiores porcentagens foram observadas no final do período com valores médios ($p<0,05$) respectivos 0,093, 0,100 e 0,099%, para os fermentos 1, 2 e 3. Os valores para cloreto em NaCl foram baixos, quando comparados com teor desejado de sal nos queijos que situa-se em torno de 1,5% (FERREIRA, 2004).

5.4. Evolução da proteólise.

Os resultados da análise estatística aplicada às frações nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel (NS), nitrogênio não protéico (NNP), o índice de proteólise (IP) e índice de profundidade da proteólise (IPP) da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos, durante o armazenamento estão apresentados na Tabela 10. Os diferentes fermentos alteraram as porcentagens das frações nitrogenadas NT e NS, e somente os teores de nitrogênio total não sofreram alterações durante o armazenamento. O índice de profundidade da proteólise foi influenciado pelo fermento durante o período de armazenamento.

Os resultados obtidos para o índice de proteólise (IP) e índice de profundidade da proteólise (IPP) da amostra de mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenada durante 34 dias estão apresentados nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

Tabela 10. Análise de variância e coeficiente de variação (CV) para nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel (NS), nitrogênio não protéico (NNP), índice de proteólise (IP) e índice de profundidade da proteólise (IPP) da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos, durante 34 dias de armazenamento.

Causas de variação	Valores de F				
	NT	NS	NNP	IP	IPP
Fermento (F)	4,33*	4,01*	1,02^{ns}	6,17**	1,05^{ns}
Armazenamento (A)	1,06^{ns}	5,79**	29,29**	7,80**	26,63**
Interação F x A	2,12^{ns}	1,77^{ns}	1,04^{ns}	1,18^{ns}	2,34*
CV (%)	10,10	16,76	18,50	17,04	20,99

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p<0,01$), * - significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p<0,05$). ^{ns}- não significativo

A evolução dos níveis de nitrogênio solúvel a pH 4,6 é um indicativo da proteólise primária e, na mussarela, ocorre fundamentalmente pela ação proteolítica do coalho ou coagulante residual no queijo, em especial sobre a α_{s1}-caseína e, em menor escala sobre a β-caseína, dando origem à formação de peptídeos de alto e médio peso molecular (FOX, 1998) e a sua quantificação determina o índice de proteólise nos queijos.

O uso dos fermentos influenciou significativamente o índice de proteólise dos queijos, e observou que as proteólises daqueles elaborados com fermento 1 (*S. salivarius* subesp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subesp. *bulgaricus*) e com o fermento 2 *(S. salivarius* subesp *thermophilus*) foram maiores. No final do armazenamento observou menores valores para o índice de proteólise dos queijos (Figura 2). A pequena evolução do índice de proteólise ao longo do período de armazenamento pode ser devido à quantidade e ao tipo de coalho utilizado na fabricação dos queijos, uma vez que o agente coagulante é o principal responsável pela proteólise primária. As frações de caseína são degradadas de maneira diferente pelas bactérias ácido lático, devido a ação preferencial por uma ou outra fração (CHANDAN et al, 1982; THOMAS & PRITCHARD, 1987; ARDO & PETTERSSON, 1988) o que pode levar às alterações na proteólise dos queijos com o uso das diferentes culturas.

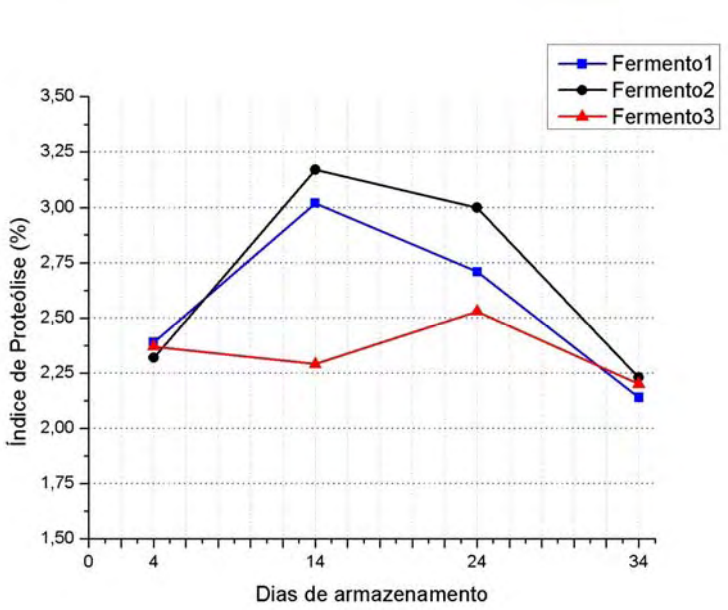


Figura 2. Índice de proteólise da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos durante 34 dias de armazenamento.

De acordo com SILVA (1998) o índice de proteólise é considerado índice bruto, não refletindo a totalidade das transformações que as proteínas sofrem durante o processo de maturação. WOLFSCHOON-POMBO (1983) determinando o índice de proteólise de alguns queijos brasileiros encontrou valores entre 5,1 a 8,2% para o queijo Prato após 4 dias de maturação, indicando que a menor firmeza do queijo pode ser atribuída à maior proteólise dos mesmos.

A determinação do índice de profundidade da proteólise (relação NNP/NT) tem como finalidade verificar a formação de peptídeos de baixo peso molecular e substâncias nitrogenadas (aminoácidos, aminas entre outros) acumulados durante o período de armazenamento ou de maturação (SILVA, 1998), oriundos principalmente da ação de exo e endopeptidades de microrganismos. Os níveis de nitrogênio solúvel em TCA 12% são úteis para avaliar a atividade de enzimas do fermento láctico e de outros microrganismos presentes no queijo (FERREIRA, 2004).

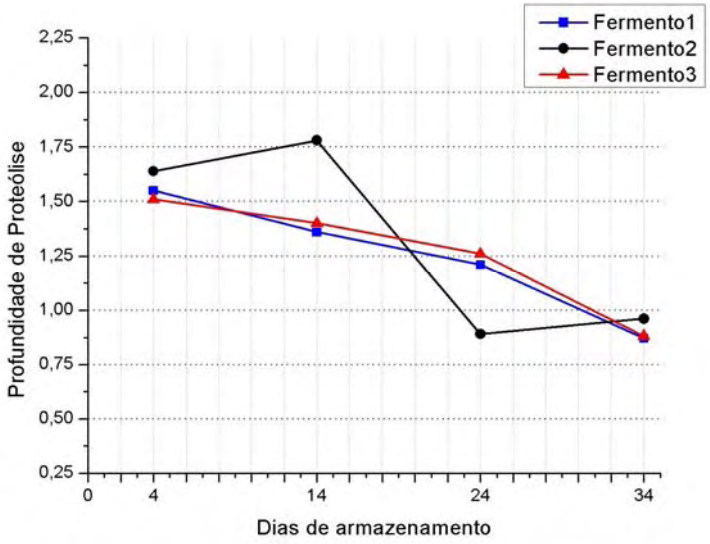


Figura 3. Índice de profundidade da proteólise da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos durante 34 dias de armazenamento.

O uso de *S. salivarius* subesp. *thermophilus* e *L. delbrueckii* subesp. *bulgaricus* (F1)*; S. salivarius* subesp *thermophilus* (F2) e *S. salivarius* subesp. *thermophilus* e *L. helveticus* (F3) como fermento não afetou significativamente o índice de profundidade da proteólise dos queijos (Figura 3). A atividade dos sistema proteolítico do *L. helveticus* sobre o aumento no índice de profundidade da proteólise do queijo Prato foi verificado por BARROS et al. (2004), indicando uma proteólise secundária mais pronunciada com o uso desta cultura, em comparação com queijo controle.

As transformações bioquímicas ocorridas durante a proteólise modificam a massa do queijo em sua composição, estrutura, aspecto, consistência e cor (LOURENÇO NETO et al, 1988). No queijo mussarela destinado à fatiagem, estas transformações devem ser evitadas ao máximo, caso contrário, a massa perde suas características de fatiagem em função do amolecimento consequente da proteólise (LORENÇO NETO et al, 1988).

5.5. Avaliação instrumental da textura

As propriedades de textura dos queijos elaborados com os diferentes fermentos foram significativamente afetadas (p<0,05) pelo período de armazenamento, conforme Tabela 11. A interação dos fatores fermento e armazenamento influenciaram os parâmetros de textura, indicando dependência dessas variáveis. As variações observadas até o final do armazenamento foram significativas.

Tabela 11. Análise de variância e coeficiente de variação (CV) para os atributos de textura da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos, durante 34 dias de armazenamento.

Causas de variação	Valores de F	
	Dureza	Elasticidade
Fermento (F)	24,46**	24,62**
Armazenamento (A)	198,49**	101,12**
Interação F x A	2,64*	12,30**
CV (%)	6,70	2,94

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01). *significativo ao nível de 5% de probabilidade (p<0,05).

Os resultados obtidos para os parâmetros de textura da amostra de mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenada durante 34 dias estão apresentados nas Figuras 4 e 5.

A dureza (resistência a ruptura) aumentou com o tempo de armazenamento para todos os queijos e os elaborados com o fermento 1 (*Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) apresentaram-se mais macios em relação aos elaborados com fermento 3 (*Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus helveticus*) em qualquer período de armazenamento avaliado (Figura 4).

Normalmente, a dureza dos queijos tende a diminuir com o armazenamento em razão da atividade proteolítica do coalho e do fermento. Como para o índice de profundidade da proteólise, neste estudo, não foi observada alteração em função do fermento utilizado, pode-se assim, atribuir a

maior maciez dos queijos elaborados com fermento1 ao maior conteúdo de água.

Os valores de dureza do queijo podem estar relacionados ao conteúdo de proteína uma vez que o seu aumento leva a obtenção de uma textura mais firme (ADDA et al, 1982). Para De Jong (1976) citado por AUGUSTO (2003) o aumento da firmeza dos queijos pode ser consequência das variações de pH, dos teores de sal e umidade durante a maturação.

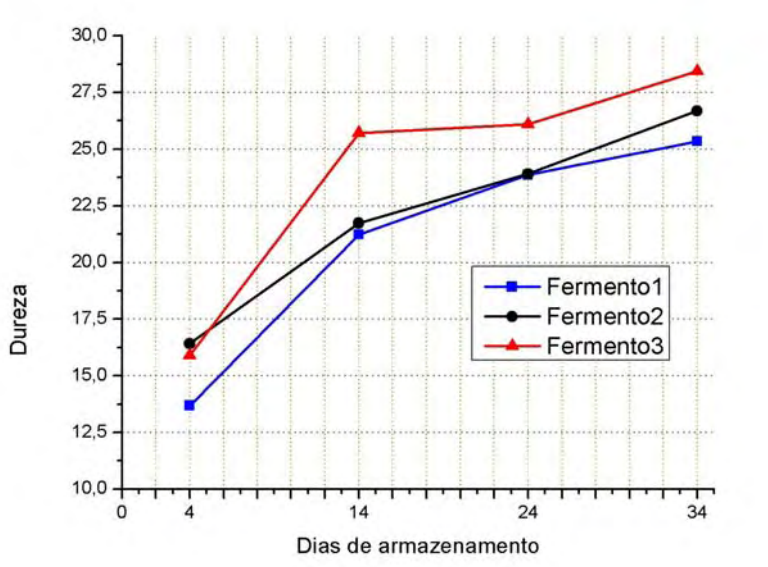


Figura 4. Valores médios para o parâmetro dureza da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos durante 34 dias de armazenamento.

A elasticidade dos queijos variou em função do fermento durante o armazenamento. Este parâmetro de textura é dependente do pH e da proporção de fosfato de cálcio coloidal removido durante o processo de fabricação (LAWRENCE et al, 1987).

Os queijos elaborados com fermento 1 foram mais elásticos em relação aos demais ($p<0,05$) e apresentaram menores valores de pH (5,36) no final do armazenamento (Figura 5). Isto significa que quando uma tensão aplicada sobre eles for removida eles apresentam maior tendência a recuperar a sua forma original (FERREIRA, 2004). AUGUSTO (2003) também relacionou a maior elasticidade com o menor valor de pH do queijo Prato durante a maturação.

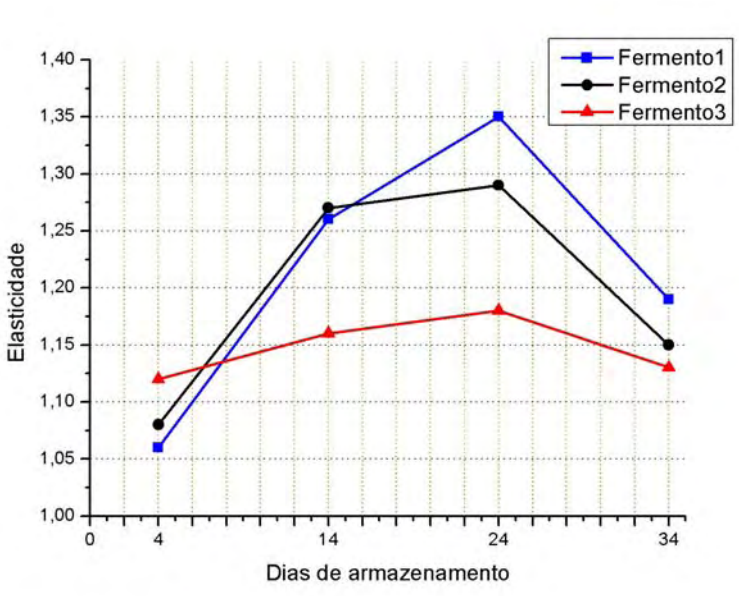


Figura 5. Valores médios para o parâmetro elasticidade da mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos durante 34 dias de armazenamento.

5.6. Análise microbiológica

Os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras de mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenadas por 34 dias estão apresentados na Tabela 12.

Com base nos resultados obtidos para as análises microbiológicas pode-se afirmar que as amostras de queijos analisadas encontram-se dentro do padrão estabelecido pela Resolução RDC nº 12 de 02/01/01, a qual fixa 5,0 x 10^3 como sendo o NMP de coliformes tolerável, 10^3 UFC/g para *Staphylococcus aureus* e ausência em 25g para *Salmonella* ssp na mussarela. Os resultados são concordantes com os obtidos por OLIVIERI (2004) ao observar que a mussarela de leite de búfala, comercializada em embalagem com o soro não apresentou contaminação por bactérias patogênicas.

Tabela 12. Resultados das análises microbiológicas de amostras de mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenadas por 34 dias.

Fermento[1]	Parâmetros	34 dias
F1	Coliformes totais (NMP)	< 0,30
F2		< 0,30
F3		< 0,30
F1	*Staphilococcus* coagulase positiva (UFC/g)	$< 10^2$
F2		$< 10^2$
F3		$< 10^2$
F1	*Salmonella* (em 25g)	Ausente
F2		Ausente
F3		Ausente

[1]Fermento 1: *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus;* Fermento 2*: Streptococcus salivarius* subesp *thermophilus;* Fermento 3 .*Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus helveticus.*
NMP - número mais provável UFC - unidades formadoras de colônia

A intensa manipulação durante a fabricação da mussarela de leite de búfala e do preparo para o armazenamento não proporcionaram a contaminação microbiológica dos queijos, o que pode ter sido favorecida pelo controle sanitário do rebanho e uso de leite pasteurizado para elaboração dos queijos, além dos cuidados básicos de higiene durante todo o processamento.

5.7. Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada utilizando-se amostras de mussarela de leite de búfala armazenadas a 8º C no soro por 34 dias. Os resultados para o teste de aceitação com relação aos atributos aroma, sabor, maciez e impressão global estão apresentados na Tabela 13.

Analisando os resultados verificou-se que o uso das diferentes culturas não prejudicou a qualidade sensorial quanto aos atributos aroma, sabor e maciez do queijo mussarela de leite de búfala, visto que não houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os queijos. A impressão global foi significativamente afetada pelos fermentos.

Em relação ao atributo aroma, os queijos elaborados com fermento 2 e 3 apresentaram aceitação similar e as diferenças não foram significativas aos elaborados com fermento 1.

Tabela 13. Valores médios para a avaliação sensorial de amostras de mussarela de leite de búfala elaborada com diferentes fermentos e armazenadas por 34 dias.

Fermento[1]	Aroma	Sabor	Maciez	Impressão Global
F1	6,18^{A}	6,33^{A}	6,26^{A}	6,00^{B}
F2	7,11^{A}	6,63^{A}	6,92^{A}	7,11^{A}
F3	7,00^{A}	6,93^{A}	7,11^{A}	7,07^{A}
Média	6,76	6,63	6,76	6,73
CV	24,18	22,94	25,22	24,18

[1]Fermento 1: *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus;* Fermento 2*: Streptococcus salivarius* subesp *thermophilus;* Fermento 3 .*Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* e *Lactobacillus helveticus.*
Médias seguidas de letras iguais maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Quanto ao atributo sabor, a aceitação foi semelhante para todos os queijos com notas ligeiramente menores, em relação aos demais atributos, para os elaborados com fermento 2 e 3. O baixo teor de sal pode ter influenciado negativamente na avaliação do sabor dos queijos, fato este detectado pelos provadores. De acordo com FERREIRA (2004) o gosto salgado é um atributo importante na aceitação do queijo.

A maciez dos queijos também não foi influenciada pelos fermentos, porém, uso do fermento 1 apresentou nota mais baixa para este atributo, provavelmente pelos queijos apresentarem uma textura muito macia em função do alto teor de umidade, não sendo assim, preferido pelos provadores.

Quanto à impressão global, tantos os queijos elaborados com fermento 2 e 3 tiveram uma boa aceitação, diferindo ($p<0,05$) do elaborado com fermento 1, que obteve a pior avaliação. A menor aceitação global deste queijo foi provavelmente resultado da menor aceitação quanto ao aroma e sabor.

As características bioquímicas das BAL envolvem os produtos formados a partir da glicose. Dentre as bactérias utilizadas na elaboração dos queijos o *L bulgaricus* é classificado como heterfermentativo com produção de compostos que favorecem o sabor e aroma dos produtos. Esta característica não foi bem desenvolvida, uma vez que não houve favorecimento na aceitação dos queijos elaborados com fermento contendo esta bactéria em relação aos demais. Porém, dentre todos os atributos foi ao sabor que os provadores atribuíram as maiores notas para este queijo.

Os valores obtidos pelos provadores para os atributos avaliados foram superiores aos observados por BOMFIM et al, (2005) para mussarela de leite de búfala armazenada no soro com variações no pH e por YUNES & BENEDET (2000) para queijo fresco de leite de búfala, os quais consideraram o sabor como fator limitante para aceitação deste produto. No entanto, segundo BOMFIM (2005) o queijo mussarela de leite de búfala, apesar de ocupar posição mediana na escala hedônica por degustadores não habituados ao seu consumo, possui um alto valor de mercado e demanda muito superior à oferta.

6. CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- os fermentos utilizados não interferiram no rendimento dos queijos,
- as diferentes culturas afetaram as características físicas e químicas dos queijos, mas os teores de gordura no extrato seco e proteína não foram alterados durante o armazenamento por 34 dias.
- as alterações no índice de proteólise foram significativas até 34 dias de armazenamento, e o índice de profundidade da proteólise foi dependente do tipo de fermento durante o armazenamento,
- os queijos elaborados com o fermento 1 apresentaram-se mais ácidos, mais úmidos, menor teor de gordura e, associado à menor aceitação, parece ser o menos indicado para a fabricação da mussarela de leite de búfala.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADDA, J. GRIPIND, J.C.; VASSAL, L. The chemistry of flavour and texture generation in cheese. **Food Chem.**, v.9, p.115-29. 1982.

ALVES, R.M.V.; GARCIA, E.E.C.; DANTAS, S.T.; PADULA, M. **Embalagem para produtos alimentícios**. Campinas:ITAL/CTEA. p.21-22, 1994.

AQUARONE, E. **Biotecnologia agroindustrial:** biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.4.

ARDO, Y.; PETTERSSON, H.E. Accelerated cheese ripening with heat treated cells of *Lactobacillus helveticus* and commercial proteolytic enzyme. **J. Dairy Research**, v.55, p.239-245. 1988.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE BÚFALOS - ABCB. **Selo de Pureza**. 2003. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/index2.html> Acesso em: 20 jul. 2007.

AUGUSTO, M.M.M. **Influência do tipo de coagulante e do aquecimento no cozimento da massa na composição, rendimento, proteólise e características sensoriais do queijo Prato**. 2003. 227p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas. 2003.

BALESTRIERI, M.; SPAGNOLO, M.S.; CIGLIANO, L.; STORTI, G.; FERRARA, L.; ABRESCIA, P.; FEDELE E. et al. Evaluation of oxidative damage in mozzarella cheese produced from bovine or water buffalo milk. **Food Chem.**, v.77, p.293-299. 2002.

BARROS, C.M.V. **Uso de culturas adjuntas e ultrafiltração para melhoria de sabor e textura de queijo Prato com reduzido teor de gordura**. 2005. 211p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas. 2005.

BARROS, C.M.V.; CARDELLO, H.M.A. B.; VIOTTO, W.H. Perfil sensorial de queijos Prato de baixo teor de gordura comercializados na cidade de Campinas - SP. Recife: SBCTA. CD-ROM do **19º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2004.

BENEVIDES, C.M.J.; TRIGUEIRO, I.N., SANTOS, M.A.F. Influência do teor de proteína na acidez titulável do leite de búfala (Raça Murrah) na microregião de Catu-Ba em 165 dias de lactação. **Hig. Alim.**, v.15, n.80/81, p.100-106. 2001.

BERGY´S. **Manual of determinative Bacteriology**. 8th. Ed. William and Wilking Co, Baltimore, USA. 1975.

BOMFIM, K.S.L.B. **Qualidade da mussarela de leite de búfala armazenada no soro**. 2005. 52p. Dissertação (Mestre em Alimentos e Nutrição) Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, Araraquara. 2005.

BOMFIM, K. S.L.B.; CARVALHO, M.R.B.; TONHATI, H.; GAVIOLLI, V.R.N.; MODESTO, V.C.; CARDONA, H.C.; AIURA, F.S.; GREGGIO, J.M. Proteólise da mozzarella de leite de búfala armazenada em soro. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v.60, n.346/347, p.47-52. 2005.

BONASSI, I.A., GOLDONI, J.S., GOMES, M.C.G. Influência das bactérias lácticas mesófilas: *Streptococcus cremoris, Streptococcus lactis, Streptococcus diacetilactis e Streptococccus citrovorun* nas características do queijo Minas. Acidez titulável e pH. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v.36, n.214, p.7-14. 1981.

BONASSI, I.A.,CARVALHO, J.B.C., VILLARES, J.B. Utilização do leite de búfala como matéria-prima para elaboração de queijo mozzarella. **Arch. Latinoam. Nutric.**, v.32, n.4. p.903-912. 1982.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**: aprovado pela Resolução RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001. Disponível em: <http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=144>. Acesso em: 18 set. 2005

CHANDAN, R.C., ARGYLE, P.J., MATHISON, G.E. Action of *Lactobacillus bulgaricus* proteinase preprations on milk proteins. **J. Dairy Science**, v.65, p.1408-1418, 1982.

CORTESI, M.L., et al. G. Behaviour of *Salmonella senftenberg* during manufacture of buffalo mozzarella cheese: preliminary reserchs. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5, Caserta, 1997. **Proceedings.** Caserta: s.ed., 1997. p. 266-271.

CUNHA NETO, O.C.; OLIVEIRA, C.A.F. Aspectos da qualidade microbiológica do leite de búfala. **Hig. Alim.**, v.17, n.110, p.18-23. 2003.

DUARTE, J.M.C.; TONHATI, H; CERON-MUÑOZ, M.; CANAES, T. Efeitos ambientais sobre a produção no dia do controle e características físico-químicas do leite em um rebanho bubalino no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Latic. "Candido Tostes"**, v.56, n.5, p.16-19, 2001.

ENGEL, E.; TOURNIER, C.; SALLES, C.; QUÉRÉ, L.L. Evolution of the composition of a selected bitter Camembert cheese during ripening: release and migration of taste-active compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.2940-2947. 2001.

FERNANDES, S. A. A. ; MATTOS, W.R.S. ; MATARAZZO, S.V. ; ROSETO, C.V. ; MACHADO, P.F. Componentes do leite bubalino ao longo da lactação no Estado de São Paulo. **Rev. Inst. Latic. "Candido Tostes"***,* v.60, n.346/347, P.71-78, 2005.

FERNANDES, S.A.A. ; MATTOS, W.R.S. ; TONHATI, H.; OTAVIANO, A.R.; LIMA, A.L.F.; PESCE, M.L.R. Avaliação da produção e qualidade do leite de rebanho bubalinos no Estado de São Paulo. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 60, n.346/347, p.53-58. 2005.

FERREIRA, C.L.L.F. **Produtos lácteos fermentados** (aspectos bioquímicos e tecnológicos). Viçosa: UFV, 2005. 112p.

FERREIRA, D.N. **Influência do uso de retentados de baixo fator de concentração no rendimento e na qualidade da mussarela de reduzido teor de gordura feita por acidificação direta**. Campinas, 2004, 127p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas. 2004.

FOX, P.F.; O'CONNOR, T. P.; MCSWEENEY, P. L. H.; GUINEE, T. P.; O'BRIEN, N. M.et al. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. **Adv. Food Nutrit. Res.**, v.39, p.163-328. 1996.

FOX, P.F., Mc SWEENEY, P.L.H. Proteolysis in cheese during ripening. **Food Rev. Int.**, v.12, n.4, p.457-509. 1996.

FOX, P.F. Developments in the biochemistry of cheese ripening. **Proceeding** of 25 th International Dairy Federation. p.11-38. 1998.

FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M.L. **Tecnologia de Queijos. Manual Técnico para Produção Industrial de Queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994. 118p.

GALLINA, D.A.; BARROS, C.M.V.; VIOTTO, W.H. Aceitação sensorial do queijo Prato *light* com *Lactobacillus helveticus* como cultura adjunta. Porto Alegre: SBCTA, 2002. CD-ROOM do **18º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**.

GOMES, C.S.; BARROS, C.M.V.; VIOTTO, W.H. Uso de *Lactobacillus casei* e *Micrococcus* como cultura adjunta para melhoria de propriedades sensoriais de queijo Prato *light*. Campinas: SLACA, 2003. CD-ROM do **5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**.

GONZALES, 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.

GUERRA, R. B. ; NEVES, E. C. A.; PENA, R. S. Caracterização e processamento de leite bubalino em pó em secador por nebulização. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 25(3): 443-447, jul.-set. 2005.

GUIMARÃES, P. **Fermento lático**. Acessado em 20 de Agosto de 2007. Disponível em: http://www.cienciadoleite.com.br/fermentolatico.htm

GUTIERREZ, C.V.; SENO, L. O. ; CARVALHO, M. R. B.; DRAKSLER, D.; HOLGADO, A. P. R.; OLIVEIRA, J. A.; TONHATI, H. Métodos para determinação de gordura, proteína e sólidos totais em leite de búfalas. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes**, v. 60, n.346/347, p.25-30. 2005.

HOBBS, B.C.; ROBERS, D. **Intoxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos***.* São Paulo: Varela, 1993. p.128-141.

HOSKEN, F.S.;GAUDERETO,, L.Q. A influência da cultura láctica na qualidade do queijo Prato variedade lanche. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes**. v.28, n.167, p.1-8. 1973.

Instituto Adolfo Lutz (IAL). *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz – **métodos químicos e físicos para análises de alimentos***. 3ª ed. São Paulo: IAL, 1985, v.1. 533p.

LAWRENCE, R.C.; CREAMER, L.K.; GILLES, J. Texture development during cheese ripening. **J. Dairy Science**, v.70, n.8, p.1748-1768. 1987.

LAWRENCE, R.C.; GILLES, J.; CREAMER, L.K. The relationship between cheeses texture and flavour. **J. Dairy Sc. Tecnol**., v.18, p.175-190.1983.

LOCCI, F.; GHIGLIETTI, R.; FRANCOLINO, S.; IEZZI, R.; OLIVIERO, V.; GAROFALO, A.; MUCCHETTI, G. Detection of cow milk in cooked buffalo Mozzarella used as Pizza topping. **Food Chem.**, v.107, P.1337–1341, 2008.

LOURENÇO NETO, J.P.; NASCIMENTO JUNIOR, P.N.; FISCHER, R. Evolução de alguns parâmetros físico-químicos durante a conservação da mussarela. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v.43, n.257, p.18-21, 1988.

MARCHIORI, J.M.G. **Qualidade nutricional dos queijos mussarela orgânico e convencional elaborados com leite de búfala e de vaca**. 2006. 54p. Dissertação (Mestrado em Ciências Nutricionais) Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, Araraquara. 2006.

MELICIO, S.P.L. **Características do leite de búfala da raça Murrah na região de São Carlos**. 2004. 47p. Dissertação (Mestre em Zootecnia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP, Jaboticabal, 2004.

MELICIO, S.P.L. ; CARVALHO, M.R.B.; TONHATI, H.; MUNARI, D.P.; PESCE, M.L.R.; LAROSA, A.; AIURA, F.S. Composição química do leite de búfala da raça Murrah na região de São Carlos. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v.60, n.346/347, p.7-12. 2005.

METZGER, L.E.; BARBANO, D.M. RUDAN, M.A.; KINDSTEDT, P.S. Effect of milk preacidification on low fat Mozzarella cheese. in Composition and yield. **J. Dairy Science**. v.83, n.4, p.648-658. 2000.

MOREAUX, V.; BIRLOUEZ-ARAGON, I. Degradation of tryptophan in heated α-lactoglobulin-lactose mistures is assocated with intense Maillard reaction. **Journal Agricultural and Food Chemistry***,* v.45, p.1905-1910. 1997.

NASCIMENTO C. & CARVALHO L. O. M. **Criação de búfalos**: Alimentação, manejo, melhoramento e instalações. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1993. 403p.

OLIVEIRA, A.N. **Influência da concentração de quimosina na composição, rendimento, proteólise e propriedades funcionais do queijo mussarela feito por acidificação direta**. 2001. 85p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas. 2001.

PRASAD, R.; PANDITA, N.N. Colesterol content of milk and its fractionation during processing. **J. Dairy Science**, v. 43, n. 2, p. 190-3, 1990.

PRUDÊNCIO, E. S. comportamento do leite de búfala (*Bubalus bubalis*) desnatado e pasteurizado durante o processo de ultrafiltração. **Bol. CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 99-114, jan./jun., 2006.

SALLES, C.; HERVE, C.; SEPTIER, C.; DEMAIZIERES, I.; LESSCHAEVE, D.; LESSCHAEVE, S.; ISSANCHOU, S.; QUÉRÉ, L.L. Evaluation of taste compounds in water-soluble extract of goat cheeses. **Food Chem.***,* v.68, p.429-435. 2000.

SALMINEN, S. **Lactic acid bacteria**: Microbiology and functional aspects. Edited. Atte von wright - 2th, 607p. 1998.

SAMPAIO NETO, J. C.; MARTINS FILHO, R.; LÔBO, R. N. B.; TONHATI, H. Avaliação dos desempenhos produtivos e reprodutivos de um rebanho bubalino no Estado do Ceará. **Rev. Bras. Zootec.** Viçosa, MG, v. 30, n. 2, p. 368-373, 2001.

SAS INSTITUTE. **SAS: Introductory guide for personal computers***.* version 7. Cary, 1992.

SCOTT, R. **Cheesemaking pratice**. 2.ed., New York: Elsevier Applied Science, 1986. 529p.

SENO, L. O. CARDOSO, V.L.; TONHATI, H. Valores econômicos para as características de produção de leite de búfalas no estado de São Paulo. **Rev. Bras. Zootec.**, v.36, n.6, p.2016-2022 (supl.), 2007.

SOUZA, M.J.; ARDO, Y.; McWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripenung. **International Dairy Journal**, v.11, p.327-345. 2001.

SZCZESNLAK, A.S. Classification of textural characteristics. **J. Food Science**, v.28. p.397-403. 1963.

SZCZESNLAK, A.S. Texture is a sensory property. **Food Quality Prefer.**, v.13, p.215-225.2002

THOMAS, T.D.; PRITCHARD, G.G. Proteolytic cuzymes of dairy starter cultures. **FEMS Microbiol.** Ver., v.46, p.245-255. 1987.

TONHATI, H. Resultados do controle leiteiro em bubalinos. In: Barnabe, V.H.; Tonhati, H. Baruseli, P.S. (Ed). **Bubalinos**: Sanidade, Reprodução e Produção. Jaboticabal: Funep, 1999. 202 p.

TONHATI, H. MUÑHOZ, M.F.C.; OLIVEIRA, J.A.; DUARTE J.M.C.; FURTADO, T.P.; TSEIMAZIDES, S.P. Parâmetros genéticos para produção de leite, gordura e proteína em bubalinos. **Rev. Bras. Zootec.**, v.29, n.6, p. 2051-2056, 2000.

VERRUMA, M.R.; OLIVEIRA, A.J.; SALGADO, J.M. Avaliação nutricional do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Sci. Agr.**, v.50, n.3, p.444-450.1993.

VERRUMA-BERNARDI, M.R. ; DAMÁSIO, M.H. ; VALLE, J.L.E. ; OLIVEIRA, A.J. Elaboração do queijo mozarela de leite de búfala pelos métodos tradicional e da acidificação direta. **Ciên. Tecn. Alim.***,* v.20, n.2, p.1-8. 2000.

VISSER, S. Enzymatic breakdown of milk proteins during cheese ripening. **Bul. Intern. Dairy Fed.**, n.332, p.20-24. 1998.

YUNES, V.M.; BENEDET, H.D. Desenvolvimento experimental de queijo fresco de leite da espécie bubalina. **Ciênc. Tecnol. Alimen.**, v.20, n.3, p.1-8. 2000.

ZOON, P. The relationship between instrumental and sendory evaluation of the rheological and fracture properties of cheese. **Bull. International Dairy Federation***,* n.268, p.30-35, 1991.